اثر واکنش میلارد بر خواص آنتی‌اکسیدانی و امولسیون کنندگی محصول هیدرولیز پروتئین عدس (*Lens culinaris*)

صفا فرجی[a]، مهتا میرزایی[b]*، سعید میردامادی[C]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b]* استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۲/۱۷ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۰۵/۱۵
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.2.1.1 DOI:10.30495/JFTN.2022.67292.11205

چکیده

مقدمه: محصولات هیدرولیز پروتئینی و پپتیدهای زیست فعال دارای اثرات سلامت بخش برای مصرف‌کنندگان هستند و واکنش گلیکوزیله شدن پروتئین‌ها یکی از روش‌های مورد توجه در بهبود خواص سلامت بخشی و عملکردی آنهاست. تاثیر دما، pH و نوع قند بر پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن محصول هیدرولیز پروتئین عدس و خواص آنتی‌اکسیدانی و امولسیون‌کنندگی آن موضوع این پژوهش بوده است.

مواد و روش‌ها: پروتئین استخراج شده از دانه عدس تحت فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آنزیم آلکالاز قرار گرفت و محصول هیدرولیز پروتئین به نسبت ۱:۱ با قندهای گلوکز و لاکتوز مخلوط و فرآیند میلارد در دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pHهای ۶/۵ و ۱۱ انجام شد. پیشرفت واکنش میلارد در طی زمان با اندازه‌گیری شدت رنگ در طول موج ۴۲۰ نانومتر و میزان گروه‌های آمین آزاد با روش OPA اندازه‌گیری شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول براساس مهارکنندگی رادیکال ABTS ارزیابی گردید. خواص امولسیون‌کنندگی محصول واکنش میلارد بر اساس اندازه‌گیری میزان جذب نور در نمونه آماده شده از ترکیب آن با روغن در طی زمان ارزیابی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان داد واکنش محصول هیدرولیز پروتئین عدس با قند گلوکز در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۶/۵ باعث بیشترین شدت رنگ قهوه‌ای شده است و تغییر در میزان گروه‌های آمین آزاد نیز تایید کننده پیشرفت واکنش میلارد بود. با این وجود واکنش در شرایط دما و pH مشابه ولی درحضور قند لاکتوز با درجه قهوه‌ای شدن کمتر بیشترین تاثیر را در بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال ABTS داشت بطوریکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس از ۲۴/۱۸ درصد به ۶۰/۹۷ درصد افزایش یافت و محصول تولیدی خاصیت امولسیون کنندگی بالاتری نسبت به نمونه کنترل داشت.

نتیجه‌گیری: در مجموع نتایج نشان داد واکنش میلارد بین پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در محصول هیدرولیز پروتئین عدس منجر به بهبود خواص سلامت بخشی و عملکردی آن می‌گردد و محصول تولیدی دارای پتانسیل کاربرد در فرمولاسیون محصولات غذایی فراسودمند است.

واژه‌های کلیدی: *امولسیون کنندگی، پروتئین عدس، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، واکنش میلارد، هیدرولیز آنزیمی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mahtam86@gmail.com

مقدمه

تمایل به استفاده از محصولات غذایی با ارزش غذایی مناسب و دارای اثرات سلامت بخشی در سال‌های اخیر در بین مصرف‌کنندگان مواد غذایی به طور قابل توجهی افزایش یافته است (Nagpal *at al*, 2011). پروتئین‌ها و پپتیدها از جمله ترکیبات طبیعی سلامت بخش در مواد غذایی هستند و محصولات هیدرولیز پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال با خواص سلامت بخشی می‌باشند که به‌عنوان محصولات غذا – داروها شناخته می‌شوند (Mirdamadi *et al*., 2017; Gheshlaghi Piri *et al*., 2018). مواد غذایی فراسودمند نه تنها نیازهای تغذیه‌ای اولیه بدن را تامین می‌کنند، بلکه باعث افزایش سطح سلامت مصرف کننده و کاهش خطر ابتلا به انواع بیماری‌ها می‌شوند (Delgado-Andrade *et al*., 2010). یکی از روش‌های تولید پپتیدهای زیست فعال فرآیند هیدرولیز آنزیمی می‌باشد. فرآیند هیدرولیز آنزیمی نقش بسزایی در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از منابع مختلف پروتئینی دارد. هیدرولیز آنزیمی بعنوان یک روش موثر برای آزاد سازی پپتیدهای زیست فعال از ساختار اولیه پروتئین و بهبود ویژگی‌های کاربردی و تغذیه‌ای آنها کاربرد فراوان دارد (Hoyle *et al*., 1994).

از جمله خواص مهم در پپتیدهای زیست فعالی که تا به حال شناسایی شده‌اند خواص آنتی‌اکسیدانی آنها می‌باشد (Berlett and Stadtman, 1997). که تا حد زیادی به وزن مولکولی، ساختار، ترکیب اسید آمینه و ماهیت آن‌ها بستگی دارد. خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال به تأثیرات چندگانه نسبت داده می‌شوند که برخی از این ویژگی‌ها شامل قابلیت آنها به عنوان شلاته کننده‌ی فلزات واسطه، مهار رادیکال آزاد ABTS و قدرت احیاء کنندگی یون آهن می‌باشد (Niki *et al*., 1995; Song *et al*., 2013).

علاوه بر آن پروتئین‌ها بعنوان ضروری‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات موجود در رژیم غذایی، جدا از ارزش تغذیه‌ای، دارای ویژگی‌های عملکردی منحصر به فردی نیز هستند که بر سیستم‌های غذایی تاثیر گذار است. از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به خاصیت امولسیون کنندکی، کف کردن، ژله شدن و حلالیت اشاره کرد. بروز و میزان خواص عملکردی پروتئین‌ها به عوامل ذاتی (نظیر ساختار مولکولی، ترکیب) و عوامل خارجی (نظیر دما، محیط شیمیایی و pH) بستگی دارد. خواص عملکردی پروتئین‌ها نتیجه تعاملات پیچیده بین پروتئین، مواد غذایی دیگر و طبیعت محیطی حاوی پروتئین است. تغییر در هر یک از عوامل گفته شده باعث تغییر در خصوصیات عملکردی پروتئین‌ها می‌شود (Joshi *et al*., 2017).

فرآیندهای مختلفی می‌توانند منجر بهبود خواص عملکردی و سلامت بخشی پروتئین‌ها و پپتیدها گردند. یکی از فرآیندهای شناخته شده مهم در این خصوص واکنش گلیکوزیله شدن پروتئین‌ها یا واکنش میلارد می‌باشد (Su *et al*., 2011). واکنش میلارد، از واکنش میان گروه‌های آمینی موجود در ساختار پپتیدها یا پروتئین‌ها با گروه‌های کربونیل قندها شروع می‌شود سپس با تشکیل پلیمرهای نیتروژونی یا ملانوئیدین‌ها پایان می‌یابد. سرعت واکنش میلارد در رتبه اول تحت تاثیر اسیدآمینه یا پپتید و کربوهیدرات‌های شرکت کننده در واکنش می‌باشد (Moscovici *et al*., 2014). عوامل دیگری واکنش قهوه‌ای شدن را تحت تاثیر قرار می‌دهند که عبارتند از دما، میزان رطوبت، اکسیژن، فلزات و فسفات (Mengíbar *et al*., 2017). تولید ترکیبات با خواص آنتی‌اکسیدان در طی واکنش میلارد می‌تواند منجر به بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئینی گردد و از طرفی تغییر در میزان دسترسی به گروه‌های فعال در سطح پروتئین‌ها می‌تواند بر خواص عملکردی محصول نهایی تاثیر بگذارد (Maillard *et al*., 2007; Gu *et al*., 2010).

گرچه در تحقیقات متعددی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصولات هیدرولیز پروتئینی مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند (Cumby *et al*., 2008; Pownall *et al*., 2010). اما در مطالعات کمتری به اثر واکنش میلارد بر خواص سلامت بخش و کاری محصولات هیدرولیز پروتئینی پرداخته شده است (Chang *et al*., 2011; Song *et al*., 2013). تحقیقات قبلی ما نشان داده بودند که هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس با استفاده از آنزیم آلکالاز باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن بواسطه تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌گردد (Yavarnejad *et al*., 2019; Ghasemi *et al*., 2020; Alizadeh *et al*., 2020). اما براساس اطلاعات ما تا به حال اثر واکنش میلارد بر فعالیت

آنتی‌اکسیدانی و کاری محصول هیدرولیز پروتئین عدس بررسی نشده بود بنابراین در این تحقیق محصول هیدرولیز پروتئین عدس حاوی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان بعنوان بخش پروتئینی واکنش میلارد مورد استفاده قرار گرفت و اثر پارامترهای مختلف دما، زمان، نوع قند و pH بر پیشرفت واکنش میلارد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و امولسیون کنندگی محصول نهایی ارزیابی شد.

مواد و روش‌ها

- مواد

عدس (*Lens culinaris*) از بازار محلی تهیه شد، آنزیم آلکالاز بافعالیت ۲/۴ Au/kg protein از شرکت نوونزایم دانمارک خریداری شد، ۲و۲ آزینو بیس ۳-اتیل بنزوتیازولین -۶ سولفونیک اسید (ABTS) و مرکاپتواتانول از شرکت سیگما- آمریکا خریداری شدند. سرم آلبومین گاوی (BSA)، ارتوفتال آلدئید (OPA)، سدیم پتاسیم تارتارات، کربنات سدیم، سولفات مس، سدیم تترا بورات، سود سوزآور، معرف فولین، گلوکز و لاکتوزاز شرکت مرک- آلمان خریداری شدند.

- روش‌ها

- تهیه جدایه پروتئینی عدس

آماده‌سازی جدایه پروتئینی طبق روش Oseguera-Toledo و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. ابتدا عدس توسط آسیاب برقی آرد گردید. سپس ۲۰۰ گرم آرد عدس با ۱۰۰۰میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و pH آن توسط سود ۰/۱ نرمال در ۹ تنظیم شد. سپس مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد توسط انکوباتور شیکردار همزده شد و سپس نمونه در g × ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ و مایع رویی جمع آوری شد. سپس pH مایع رویی با اسید هیدروکلریک ۱ مولار در ۴/۳ تنظیم و مخلوط در g× ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب‌ها جمع آوری شدند و مجددا در آب به صورت سوسپانسیون درآمده و برای هیدرولیز آنزیمی در شرایط یخچال نگهداری شد (Oseguera-Toledo *et al.*, 2011).

- هیدرولیز آنزیمی جدایه پروتئینی عدس با استفاده از آنزیم آلکالاز

در ابتدا به منظور هیدرولیز آنزیمی، به جدایه پروتئینی آماده شده (pH=۸، با استفاده از بافر فسفات ۵ میلی مولار)، آنزیم آلکالاز (با فعالیت ۲/۴ آنسون بر میلی لیتر)، نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰ آنسون / کیلوگرم جدایه پروتئین اضافه شد. سپس هیدرولیز آنزیمی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار (INC108، Memmert آلمان) با ۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد. در فواصل زمانی ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه نمونه‌برداری انجام شد. سپس نمونه به منظور غیر فعال شدن آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه در بن ماری حرارت داده و به منظور حذف رسوبات احتمالی سانتریفوژ (g× ۵۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه) و سپس در دمای یخچال نگهداری شد. ۵ سی‌سی نمونه نیز به عنوان نمونه کنترل و بدون آنزیم مورد بررسی قرار گرفت (Nourmohammadi *et al.*, 2015).

- متصل کردن محصول هیدرولیز پروتئین عدس با گلوکز و لاکتوز

برای تهیه متصل‌های پروتئین عدس، محصول هیدرولیز پروتئین به نسبت ۱:۱ با قندهای گلوکز و لاکتوز مخلوط شد. سپس فرآیند میلارد در دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد، pH های ۶/۵ و ۱۱ انجام شد. در طی فرآیند، پیشرفت واکنش میلارد با اندازه‌گیری شدت رنگ ارزیابی گردید و در طی زمان واکنش، محصول از نظر میزان گروه‌های آمین آزاد، خواص کاری و آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت (Molaeifar *et al.*, 2017).

- اندازه‌گیری میزان پروتئین محلول با روش لوری

در روش لوری، محلول A شامل ۱ سی‌سی سولفات مس (۱٪)، ۱ سی‌سی سدیم پتاسیم تارتارات (۲ ٪) ، ۴۹ سی‌سی سود ۰/۱ نرمال و ۴۹ سی‌سی کربنات سدیم۲ ٪ آماده شد. در زمان آزمون، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۲/۵ سی‌سی از محلول A ترکیب و بلافاصله مخلوط شد و ۱۰دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول فولین رقیق شده (به نسبت ۱:۱ با آب) به هر نمونه اضافه و بلافاصله مخلوط شد. بعد

از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها براساس منحنی استاندارد BSA (در غلظت‌های ۲۰۰- ۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر، R^2= ۰/۹۹۵۸) و بر حسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر گزارش شد (Lowry *et al*., 1951).

- اندازه‌گیری میزان گروه‌های آمین آزاد به روش OPA

پیشرفت واکنش هیدرولیز آنزیمی پروتیین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز و پیشرفت واکنش میلارد با اندازه‌گیری میزان گروه‌های آمین آزاد ارزیابی شد.

محلول ارتو فتال آلدئید (ریجنت) از مخلوط ۲۵ سی‌سی سدیم تترا هیدرابورات (۱۰۰میلی مولار)، ۲/۵ سی‌سی سدیم دسیل سولفات (۲۰٪)، ۴۰ میلی گرم ماده ارتوفتال آلدئید در متانول و ۱۰۰ ماکرولیتر بتامرکاپتواتانول به حجم ۵۰ سی‌سی به صورت تازه تهیه شد. در زمان آزمایش، ۲۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با یک سی‌سی از محلول شیمیایی تهیه شده، ترکیب گردید سپس بلافاصله مخلوط شد و ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۱ سی‌سی آب مقطر به نمونه‌ها اضافه شد. سپس جذب نمونه‌ها در ۳۴۰ نانومتر قرائت شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد لوسین (در غلظت‌های ۴-۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر، R^2= ۰/۹۱۶۹) برمبنای گروه‌های آمین آزاد و براساس میکرومول لوسین به ازای میلی گرم پروتئین گزارش شد (Mirzaei *et al*., 2018).

- تعیین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال ABTS

برای تهیه محلول ABTS ابتدا ABTS (۷ میلی مولار) با پرسولفات پتاسیم (۲/۴۵ میلی مولار) مخلوط شد. سپس در دمای یخچال برای مدت ۱۶-۱۷ ساعت، نگهداری گردید. محلول سبز آبی با بافر فسفات (۵ میلی مولار، pH=۷) تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. در زمان آزمایش ۲۵ میکرولیتر از نمونه با ۱ سی‌سی معرف ABTS مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS بر اساس فرمول زیر و به ازاء وزن مشخص از پروتئین گزارش شد (Re *et al*, 1999).

(رابطه ۱)

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال (\%)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

- اندازه‌گیری ظرفیت امولسیون کنندگی

۱۰ میلی‌لیتر از روغن را با ۳۰ میلی لیتر محلول هیدرولیز شده با غلظت‌های مختلف ۰/۵، ۰/۱، ۱ و ۳ درصد مخلوط شد، سپس مخلوط به مدت یک دقیقه به وسیله هموژناتور با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه هموژن شد. ۵۰ میکرولیتر از امولسیون تولید شده از ته ظرف با ۵ سی سی محلول سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد مخلوط شد و جذب بلافاصله و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون در طول موج ۵۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه کازییات سدیم نیز بعنوان نمونه کنترل درنظر گرفته شد.قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون با استفاده از روابط زیر محاسبه شد (Rajabzadeh *et al*., 2018).

(رابطه ۲)

$$\text{قدرت امولسیون کنندگی} = \frac{A \times 2.303 \times 2}{\mathrm{F} \times \mathrm{Wp}}$$

A: جذب در دقیقه صفر (بلافاصله پس از افزودن SDS)

F: حجم جزء روغن

Wp: وزن پروتئین

(رابطه ۳)

$$\text{پایداری امولسیون کنندگی} = \frac{A0 \times 100}{\mathrm{A0} - \mathrm{At}}$$

At: جذب در ۱۰ دقیقه

- اندازه‌گیری میزان قهوه‌ای شدن

به منظور تعیین پیشرفت و اندازه‌گیری رنگ حاصل از قهوه‌ای شدن نمونه‌ها به غلظت ۰/۲ درصد پروتئین با ۱ درصد سدیم ۲ دسیل سولفات مخلوط شد. سپس میزان

قهوه‌ای شدن با اندازه گیری میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر اندازه گیری شد (Li *et al.*, 2009).

- **تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها**

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شدند. رسم نمودارها و آنالیز آماری (با روش Two-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها توسط تست Turkeys multiple و به کمک نرم‌افزار graphpad prism 8 انجام شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد. Pvalue< 0.05 معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- **هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس**

به منظور استفاده از محصول هیدرلیز پروتئین عدس بعنوان بخش پروتئینی واکنش میلارد، ابتدا پروتئین استخراج شده از عدس توسط آنزیم آلکالاز تحت شرایط بهینه به دست آمده از تحقیقات قبلی (Ghasemi *et al.*, 2020; Alizadeh *et al.*, 2020) هیدرلیز شد و محتوای گروه آمین آزاد آن مورد سنجش قرار گرفت. نتایج مربوط به تغییرات محتوای گروه‌های آمین آزاد بعنوان معیاری از پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در طی زمان در شکل ۱ ارائه شده است.

میزان گروه‌های آمین آزاد از ابتدا تا ۶۰ دقیقه اول واکنش هیدرولیز روند افزایشی داشته است بطوری که بیشترین میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در ۲۰ دقیقه اول اتفاق افتاده است و میزان گروه‌های آمین آزاد از ۳/۱۸ در ابتدای فرآیند به ۴۴/۴۱ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین بعد از ۶۰ دقیقه رسیده است. سپس تا انتهای واکنش روند ثابتی داشته است. علاوه بر آن نتایج نشان می‌دهند که میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه حاوی آنزیم به طور معنی‌داری (P<0.05) بالاتر از نمونه کنترل بدون آنزیم می‌باشد.

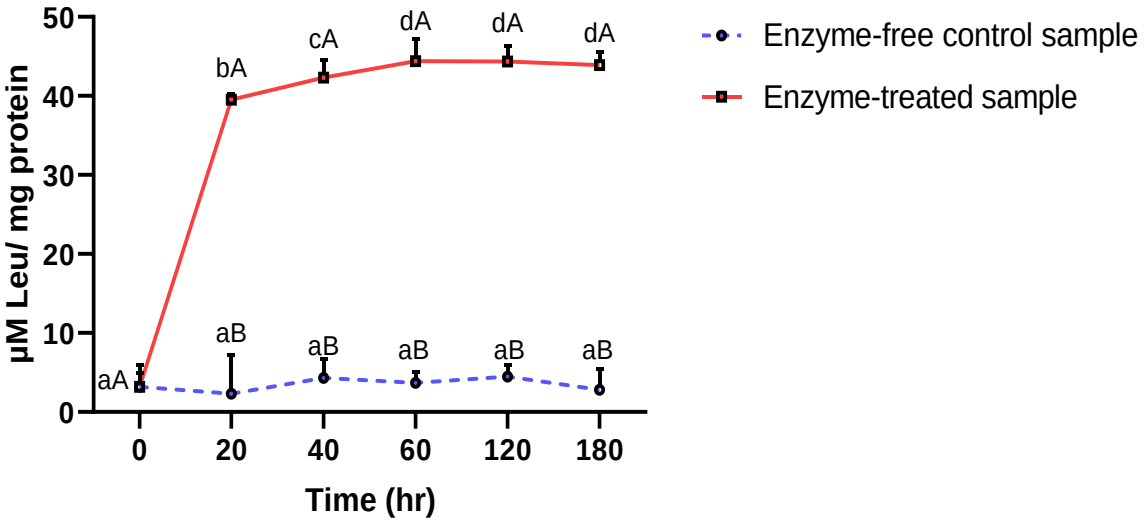

Figure 1- Evaluation of the progress of enzymatic hydrolysis by alkalase enzyme during 3 hours (enzyme treated sample) and its comparison with (enzyme-free control sample) measured by OPA method.
Latin lowercase letters to indicate statistical differences between the data of each treatment over time. Similar letters indicate no statistical difference (p> 0.05) and dissimilar letters indicate a statistically significant difference (p <0.05) between data.

شکل ۱- بررسی پیشرفت هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم آلکالاز در طی ۳ ساعت (نمونه تیمار شده با آنزیم) و مقایسه آن با (نمونه کنترل بدون آنزیم) اندازه‌گیری شده با روش OPA.

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده های هر تیمار در طی زمان می باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری (p>0.05) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار (p<0.05) بین داده هاست.

- اثر پارامترهای دما، pH و نوع قند بر پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن بر اساس میزان جذب نور

برای سنجش پیشرفت واکنش میلارد در شرایط مورد بررسی، میزان گروه‌های آمین آزاد و میزان جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۲ و ۳).

از فاکتورهای مهم و تاثیرگذار بر واکنش میلارد می‌توان به نوع قند، حرارت و pH اشاره نمود. همانگونه که در شکل ۲ (A) مشاهده می‌شود، میزان پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن در نمونه حاوی قند گلوکز و تیمار شده در (۱۱ و pH= ۶/۵ و دمای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد) از همان ابتدا روند افزایشی داشته است بطوری که بعد از ۴ ساعت به بیشترین میزان خود رسیده است. نتایج نشان دادند که بیشترین افزایش واکنش قهوه‌ای شدن مربوط به ۱ ساعت اول واکنش می‌باشد اما با ادامه روند افزایش معناداری در تمامی زمان‌ها مشاهده شد. بطور کلی نتایج نشان دادند که میزان پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن در تمامی نمونه‌ها با نمونه‌های کنترل تفاوت معناداری داشت ($P<0.05$) و تیمار در شرایط pH=۶/۵ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و در حضور قند گلوکز بیشترین تاثیر را بر پیشرفت واکنش میلارد بر اساس شدت رنگ تولیدی داشته است.

نتایج ارائه شده در شکل۲ (B) نیز نشان می‌دهد که تیمار در حضور قند لاکتوز هم در تمام تیمارها (در شرایط ۱۱ وpH=۶/۵ و دمای ۶۰ و۸۰ درجه سانتی‌گراد) باعث افزایش معنی‌دار شدت رنگ در مقایسه با نمونه کنترل شده است. بیشترین افزایش مربوط به ۲ ساعت اول واکنش میلارد بود سپس در زمان‌های پایانی تفاوت معناداری مشاهده نشد ($P>0.05$). در مقایسه‌ای که بین تیمارهای مختلف کانژوگه شده توسط قند لاکتوز صورت گرفت نتایج نشان دادند که به ترتیب نمونه‌های تحت تیمار pH=۶/۵ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۱۱ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۱۱ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۶/۵ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تاثیر در پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن داشتند.

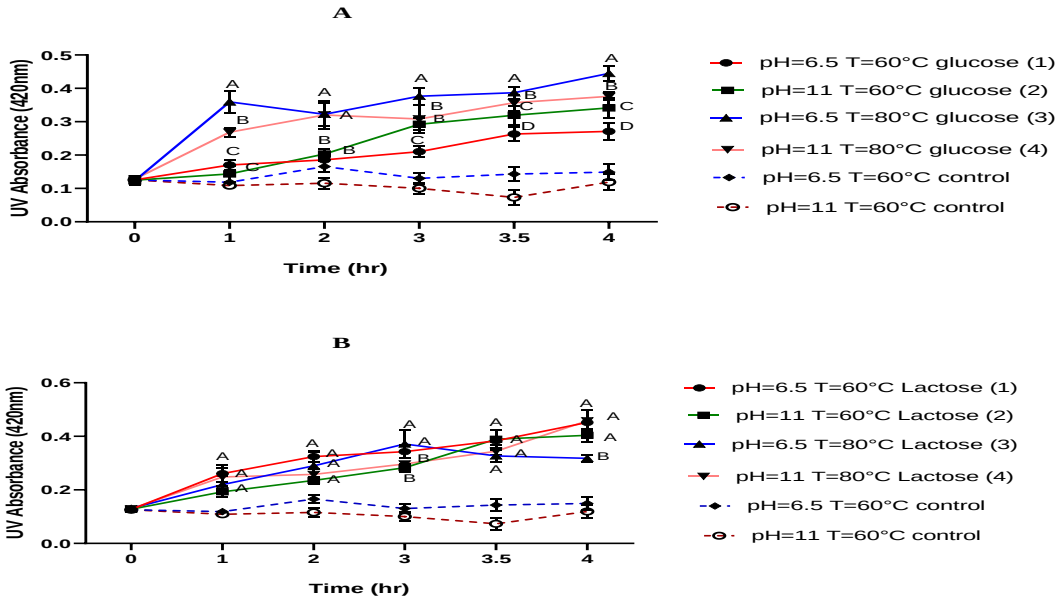

Figure 2 - Effects of temperature, pH and type of sugar on the browning reaction at different times in comparison with control samples, A: treated samples pH = 6.5 and 11 and temperature =. 60 and 80 ° C glucose B: samples treated pH = 6.5 and 11 and temperature = 60 and 80 ° C lactose.

Different letters showed a statistically significant difference between the two treatments at each time ($p<0.05$).

شکل ۲- بررسی اثر پارامترهای دما، pH و نوع قند بر پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن در طی زمان‌های مختلف و مقایسه با نمونه‌های کنترل، A: نمونه‌های تحت تیمار pH = ٦/٥ و ١١ و دما= ٦٠ و ٨٠ درجه سانتی‌گراد قند گلوکز B: نمونه‌های تحت تیمار pH = ٦/٥ و ١١ و دما= ٦٠ و ٨٠ درجه سانتی‌گراد قند لاکتوز.

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار بین دو تیمار در هر زمان می باشد ($p<0.05$).

بطور کلی در مقایسه نمونه‌های تیمار داده شده با نمونه‌های کنترل نتایج نشان دادند که واکنش میلارد اتفاق افتاده است. در مورد قند گلوکز بیشترین شدت واکنش در ۱ ساعت اول و در مورد قند لاکتوز در ۳ ساعت اول واکنش اتفاق افتاده است. قند گلوکز، pH= ۶/۵ و دما ۸۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تاثیر را در پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن داشته است و در مورد قند لاکتوز تفاوت معناداری بین تیمارهای مختلف مشاهده نشد.

- بررسی میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های تیمار شده تحت شرایط واکنش میلارد

به همین منظور اثر پارامترهای نوع قند، دما و pH بر محتوای گروه آمین آزاد در نمونه‌های هیدرولیز شده پروتئینی، میزان گروه‌های آمین آزاد در طی واکنش میلارد با روش OPA بررسی شد (شکل ۳).

نتایج ارائه شده در شکل ۳ نشاندهنده افزایش اولیه میزان گروه‌های آمین آزاد در تمام نمونه‌ها در یک ساعت اولیه واکنش بود اما بعد از آن کاهش در تمام نمونه‌ها مشاهده شد.

علاوه بر آن نتایج نشان دادند که میزان گروه‌های آمین آزاد در تمامی نمونه‌ها و در تمامی زمان‌ها با نمونه‌های کنترل تفاوت معناداری داشتند ($P<0.05$). در ضمن در مقایسه بین دماهای ۶۰ و ۸۰ درجه سانتی‌گراد نتایج نشان دادند که دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تاثیر را در پیشرفت واکنش میلارد داشته است و در بررسی pH های مختلف ۶/۵ و ۱۱ نیز مشاهده شد که pH ۶/۵ بیشترین نقش را در میزان گروه‌های آمین آزاد داشته است. نتایج حاصل از مقایسه دو نمودار نیز نشان دادند که نمونه‌های حاوی قند لاکتوز تاثیر بیشتری بر پیشرفت واکنش قهوه‌ای شدن براساس میزان گروه‌های آمین آزاد نسبت به نمونه‌های حاوی قند گلوکز داشت و به ترتیب نمونه‌های تحت تیمار pH=۶/۵ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۱۱ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، pH=۶/۵ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۱۱ و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین تاثیر در میزان گروه‌های آمین آزاد و پیشرفت واکنش میلارد داشتند.

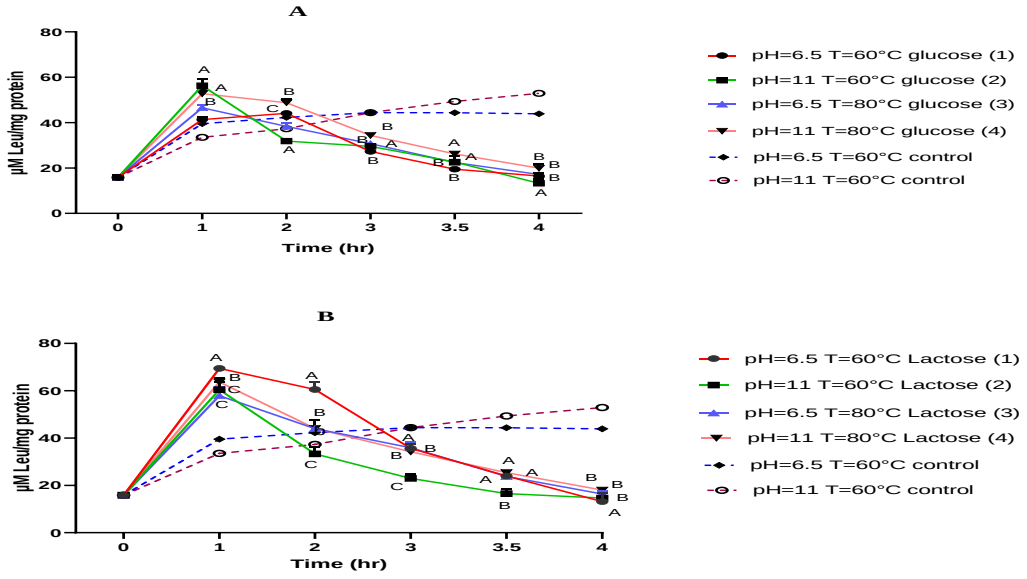

Figure 3 - Investigation of the effect of temperature, pH and type of sugar parameters on the progress of Millard reaction based on the amount of free amine groups by OPA method during different times and comparison with control samples, A: samples treated with pH = 6.5 and 11 and temperature = 60 and 80 ° C glucose glucose B: samples treated pH = 6.5 and 11 and temperature = 60 and 80 ° C lactose.

Different letters showed a statistically significant difference between the two treatments at each time ($p <0.05$).

شکل ۳- بررسی اثر پارامترهای دما، pH و نوع قند بر پیشرفت واکنش میلارد براساس میزان گروه‌های آمین آزاد با روش OPA در طی زمان‌های مختلف و مقایسه با نمونه‌های کنترل، A: نمونه‌های تحت تیمار pH = ٦/٥ و ١١ و دما= ٦٠ و ٨٠ درجه سانتی‌گراد قند گلوکز B: نمونه‌های تحت تیمار pH = ٦/٥ و ١١ و دما= ٦٠ و ٨٠ درجه سانتی‌گراد قند لاکتوز.

حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار بین دو تیمار در هر زمان می باشد ($p<0.05$).

- اثر پیشرفت واکنش میلارد تحت تاثیر پارامترهای دما، pH و نوع قند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی

در ادامه اثر واکنش میلارد تحت تاثیر فاکتورهای نوع قند، دما وpH بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی براساس میزان مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS مورد بررسی قرار گرفت و نتایج در شکل ۴ (A, B , C) ارائه شده‌اند.

نتایج حاصل از شکل ۴ نشان دادند که میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS در نمونه هیدرولیز پروتئین قبل از واکنش میلارد (در زمان صفر) ۲۴/۱ درصد بود و این مقدار در تمامی تیمارها در اثر واکنش میلارد افزایش یافته است. از طرفی واکنش در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد ودر pH ۶/۵ نسبت به pH۱۱ باعث افزایش بیشتری در فعالیت آنتی اکسیدانی محصول نهایی واکنش میلارد شده است. در مقایسه‌ی که بین دو نمودار A و B صورت گرفت نیز مشاهده شد، واکنش در حضور قند لاکتوز نسبت به قند گلوکز نقش موثرتری در بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته است.

نتایج (شکل ۴) نشان داد که عوامل واکنش میلارد همانطور که بر پیشرفت واکنش موثر بودند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول نهایی هم تاثیر گذارند بطوریکه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تقریبا در تمامی تیمارها با پیشرفت واکنش میلارد افزایش یافته است و به حداکثر میزان خود بعد از ۴ ساعت حرارت دهی در دما و pHهای مشخص رسید. اما شرایط دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۱۱، شرایط مناسبی نبوده است و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در این شرایط به شدت کاهش یافته است. در مقایسه بین دو نمودار A و B (شکل ۴) مشاهده می‌شود که نمونه‌های حاوی قند لاکتوز در شرایط دمایی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۶/۵ بیشترین تاثیر در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی شده است. بطوری که مقدار فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد بعد از ۴ ساعت از ۳/۱۸ درصد به ۶۰/۹۷ درصد رسیده است.

- فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون در محصول واکنش میلارد

همانطور که پیش از این توضیح داده شد پروتئین‌ها بعنوان ضروری‌ترین و مهم‌ترین ترکیبات موجود در رژیم غذایی، جدا از ارزش تغذیه‌ای، دارای ویژگی‌های عملکردی منحصر به فردی نیز هستند که بر سیستم‌های غذایی تاثیر گذار است. از جمله این ویژگی‌ها میتوان به خاصیت امولسیون کنندگی، کف کردن، ژله شدن و حلالیت اشاره کرد. نمونه انتخاب شده با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای بررسی پایداری امولسیون مورد بررسی قرار گرفت و با نمونه قبل از واکنش میلارد و با نمونه کازیینات سدیم بعنوان نمونه کنترل مثبت مقایسه گردید. نتایج حاصل از فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون در جدول ۱ گزارش شده است.

نتایج ارایه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد فرآیند متصل کردن سبب افزایش فعالیت امولسیون‌کنندگی پروتئین‌های عدس شده و از طرف دیگر پایداری امولسیون نیز افزایش معناداری داشته است.

بحث

نتایج حاصل از بررسی گروه‌های آمین آزاد (شکل ۱) نشان دادند که میزان گروه‌های آمین آزاد از ابتدا تا ۶۰ دقیقه اول واکنش روند افزایشی داشته است. سپس تا انتهای واکنش روند ثابتی داشته است. علاوه بر آن نتایج نشان دادند که میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه حاوی آنزیم به طور معنی‌داری ($P<0.05$) بالاتر از نمونه کنترل (هیدرولیز نشده) می‌باشد. که بیانگر نقش و توانایی بالای آنزیم آلکالاز در استخراج و پیشرفت هیدرولیز آنزیمی می‌باشد. پیش از این نیز تحقیقات دیگری توسط Hosseini و همکاران (۲۰۱۳) انجام شده و اثر نوع آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بافت بر پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم آلکالاز بطور معناداری سبب افزایش میزان استخراج پروتئین و درجه هیدورلیز نسبت به آنزیم‌های داخلی بافت شد ($P<۰/۰۵$). Ghasemi و همکاران (۲۰۲۰) نیز اثر آنزیم آلکالاز بر هیدرولیز آنزیمی پروئین عدس و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان را گزارش کردند.

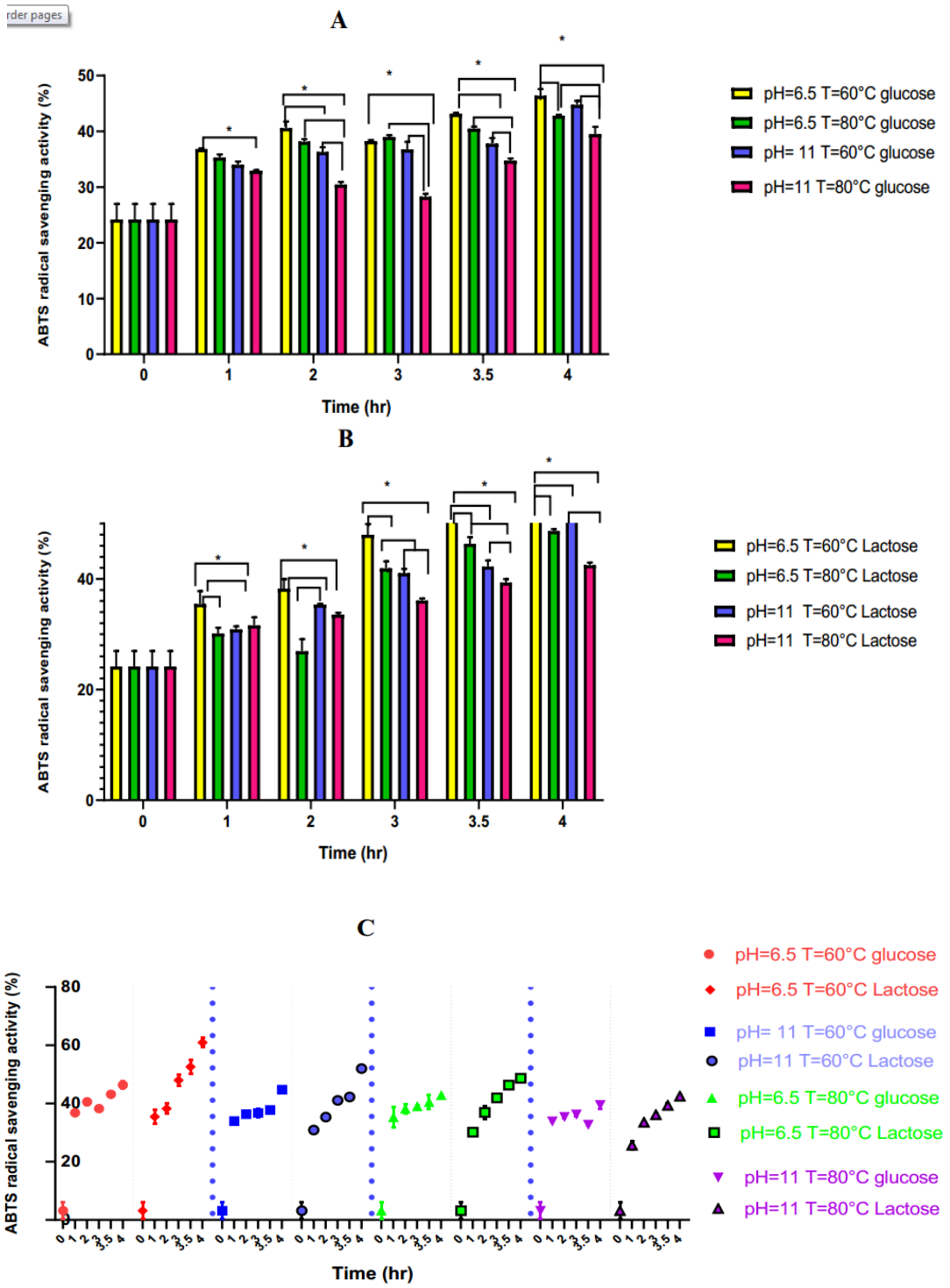

Figure 4- Effect of temperature and pH on the antioxidant activity of the product based on ABTS radical scavenging activity during different times in the presence of glucose (A), lactose (B) and general comparison between all samples (C).

An asterisk (*) indicates a statistical difference between two treatments over time. The sign * indicates a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the data.

شکل ٤- بررسی اثر پارامترهای دما، pH و نوع قند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی براساس مهار کنندگی رادیکال ABTS در طی زمان‌های مختلف در حضور قند گلوکز (A)، قند لاکتوز (B) و مقایسه کلی بین همه نمونه ها (C).

علامت ستاره (*) برای نشان دادن اختلاف آماری بین دو تیمار در طی زمان می باشد. علامت * نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده هاست.

جدول ۱ - فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون تشکیل شده در پروتئین عدس

Table 1 - Emulsion activity and stability of emulsion formed in lentil protein

Sample	Emulsifying activity (m2 / g)	Emulsion stability (min)
Sample befor mailard reaction	132/69 ±0/5 [a]	8/57 ±0/03 [a]
Sodium caseinate (Positive control)	147/18 ± 0/4 [b]	8/95 ±0/02 [b]
Sample after Millard reaction (n presence of lactose, pH 6.5, 60 °C)	149/84 ± 0/8 [c]	8/70 ±0/02 [c]

Capital letters are used to indicate statistical differences between the data of each treatment over time. Similar letters indicate no statistical difference (p> 0.05) and dissimilar letters indicate a statistically significant difference (p <0.05) between data.

حروف کوچک برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده‌های هر تیمار در طی زمان می‌باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری (p>0.05) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار (p<0.05) بین داده هاست.

میزان جذب نور در ۴۲۰ نانومتر یک روش مناسب برای بررسی محصولات نهایی واکنش میلارد می‌باشد و توسعه رنگ قهوه‌ای آسان‌ترین نتیجه قابل اندازه‌گیری واکنش میلارد است و شدت آن غالباً به عنوان شاخص میزان واکنش میلارد در غذاها استفاده می‌شود (Kim and Lee, 2009).

نتایج ارائه شده در شکل ۲ نشان دادند که از همان ابتدای قرارگیری نمونه‌ها در بن ماری و آغاز حرارت دهی رنگ قهوه‌ای شروع به پدیدار شدن کرد و با گذشت زمان به مدت ۴ ساعت شدت رنگ قهوه‌ای در تمام تیمارهای مورد بررسی افزایش یافت. در طی واکنش میلارد گروه‌های آمین آزاد پروتئین و گروه هیدروکسیل گلوکزیدی قندهای احیا کننده یا ترکیبات کربونیلی نظیر آلدهیدها و کتون‌ها که در اثر اکسیداسیون چربی‌ها ایجاد می‌شوند انجام می‌گیرد در نتیجه سبب ایجاد ترکیبات رنگی می‌گردد. Ames (۱۹۹۸) دلیل ایجاد رنگ در محصولات واکنش میلارد را ترکیبات با وزن مولکولی پایین بیان داشت. تشکیل رنگ در محصولات واکنش میلارد مربوط به مرحله آغازی واکنش می‌باشد که تا مرحله‌ی پایانی واکنش ادامه دارد. در مرحله آغازی کتوز یا آلدوز با گروه آمینی پپتیدها یا پروتئین گلیکوزیل آمین را تشکیل می‌دهد. که این کتوز آمین‌ها به وسیله ۱و ۲ انولیزاسیون تجزیه می‌شود که ۱و ۲ انولیزاسیون در تشکیل رنگ قهوه‌ای نقش بسزایی دارند (Ghazanfarzade and Emami, 2014).

نتایج نشان دادند که تیمار در شرایط pH=۶/۵ و دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد و در حضور قند گلوکز بیشترین تاثیر را بر پیشرفت واکنش میلارد بر اساس شدت رنگ تولیدی داشته است.-اثر دمای بالا و pH پایین در افزایش شدت واکنش میلارد در تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است. بعنوان مثال Mokhtari (۲۰۱۸)، بیان داشت افزایش دما در واکنش میلارد در نمونه آب پنیر به شکل مشخصی سبب افزایش سرعت واکنش میلارد شده است و علاوه بر آن بر نوع محصولات تولید شده نیز تاثیر گذار بوده است. مطالعات Ajandouz و همکاران (۲۰۰۱) نیز نشان دادند که pH تأثیر مهمی در پیشرفت واکنش میلارد و نوع محصولات تولیدی دارد.

نوع قند و غلظت آن از دیگر فاکتورهای موثر می‌باشد بطوری که پنتوزها نسبت به هگزوزها و دی ساکاریدها احیا کننده نقش مهمتری ایفا می‌کنند. ولی ماهیت پروتئین شرکت کننده در واکنش می‌تواند بر قابلیت واکنش قندها تاثیر بگذارد (Mokhtari, 2018). Hwang و همکاران (۲۰۱۱) اثر نوع قند (فرکتوز و گلوکز) در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت را بررسی کردند. گزارش کردند که قند فروکتوز نسبت به قند گلوکز در شرایط تعریف شده تاثیر بیشتری بر شدت رنگ قهوه‌ای داشته و قند فروکتوز (کتوز) نسبت به گلوکز (آلدوز) در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد توانایی بیشتری در تولید محصولات تیره دارد. تفاوت در میزان تاثیر نوع قند در مطالعات مختلف احتمالاً به دلیل ترکیبات مختلف اسید آمینه و ترکیب پروتئین و همچنین شرایط واکنش بوده است.

افزایش اولیه در مقدار گروه‌های آمین آزاد اندازه‌گیری شده در آزمون OPA، در یک ساعت اول علیرغم افزایش میزان جذب نور می‌تواند به دلیل باز شدن ساختار پروتئین در اثر شرایط حرارتی و pH به کار رفته باشد بطوریکه گروه

آمین آزاد بیشتری در دسترس قرار گرفته و اندازه‌گیری شده‌اند. اما کاهش بعدی به دلیل درگیر شدن گروه‌های آمین آزاد در واکنش میلارد و تایید کننده پیشرفت واکنش میلارد است (Al-Hakkak *et al.*, 2010). Benjakul و همکاران (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند که در ۱ ساعت اول از واکنش میلارد میزان محتوای گروه‌های آمین آزاد افزایش یافته است گرچه این افزایش از نظر آماری معنی دار نبوده است. با این حال، کاهش مداوم محتوای گروه آمین آزاد در تمام نمونه‌ها با افزایش زمان حرارت دادن معنی دار بوده است ($P<0.05$).

بعد از بررسی شدت واکنش قهوه‌ای شدن بعنوان شاخص پیشرفت واکنش میلارد و بررسی گروه‌های آمین آزاد در مرحله بعدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول حاصل از واکنش میلارد بعنوان هدف کلی این تحقیق بر اساس میزان مهار رادیکال ABTS ارزیابی شد (مطابق شکل ۴). اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال کاتیون ABTS می‌باشد که جذب بالایی در ۷۳۴ نانومتر دارد. این روش مستلزم تولید کروموفور ABTS با اکسیداسیون ABTS در حضور یک اکسیدکننده (سولفات پتاسیم) است. در این روش میزان کاهش رنگ زمانی که آنتی‌اکسیدان به محلول ABTS اضافه می‌شود مورد سنجش قرار می‌گیرد (Song *et al*, 2013).

نمونه هیدرولیز پروتئین عدس قبل از واکنش میلارد (در زمان صفر) دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که به حضور پپتیدهای زیست فعال که در طی هیدرولیز آنزیمی تولید شده‌اند مرتبط است که قبلا توسط Ghasemi و همکاران (۲۰۲۰) گزارش شده است.

تفاوت مشاهده شده در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های مختلف در شرایط مختلف تیماردهی (شکل ۴) می‌تواند به دلیل نوع ترکیبات متفاوتی است که در طی واکنش میلارد تولید می‌گردد (Benjakul *et al*., 2005).

افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی واکنش میلارد می‌تواند به تولید ملانوئیدین‌ها مرتبط باشد که دارای توانایی مهار کردن رادیکال آزاد اکسیژن و خاصیت چلاته کنندگی می‌باشند (Yilmaz and Toledo, 2005). همچنین Liu و همکاران عنوان کردند که واسطه‌ها یا پلیمرهای نهایی قهوه‌ای می‌توانند به عنوان اهدا کننده هیدروژن عمل کنند و محصولات کاراملیزه شدن قندها نیز می‌توانند به فعالیت ضد رادیکالی کمک کند (Liu *et al.*, 2014).

مقدار، نوع و سایز پپتیدهای موجود در محصول هیدرولیز پروتئینی بر خواص آنتی‌اکسیدانی محصول واکنش میلارد تاثیر گذار است. بطوریکه liu و همکاران (۲۰۱۴) فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول واکنش قهوه‌ای شدن بین جدایه پروتئین آب پنیر و قند گلوکز را بررسی و علاوه بر آنکه گزارش کردند که محصولات حاصل از واکنش آلفالاکتوالبومین و قندهای احیا کننده فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS بیشتری نسبت به آلفا لاکتوالبومین به تنهایی دارند. نتایج آن‌ها نشان داد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS با افزایش غلظت پروتئین به طور چشمگیری افزایش یافته است. تحقیقات Su و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که پپتیدهای با سایز کوچک‌تر آمادگی بیشتری برای واکنش میلارد داشته‌اند بطوریکه پپتیدهای ۳–۵ کیلو دالتون به راحتی می‌توانند به گلوکز یا حتی محصولات تجزیه آن متصل شوند. بنابراین، هنگام استفاده از پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر، ترکیبات فرار بیشتری در طی واکنش میلارد تشکیل می‌گردد که ممکن است نقش موثرتری در افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول واکنش میلارد داشته باشند.

نتایج ارایه شده در جدول ۱ نشان می‌دهد بهبود فعالیت امولسیون کنندگی می‌تواند به دلیل گلیکوزیله شدن پروتئین و قرار گرفتن مولکول در فصل مشترک آب – روغن باشد بطوریکه زنجیره پلی ساکاریدی متصل یک لایه پایدار اطراف قطرات روغن ایجاد می‌کند و از تجمع یافتن آنها جلوگیری می‌کند. سایز کوچک‌تر ذرات روغن به دلیل خاصیت امولسیون کنندگی پروتئین باعث اندازه‌گیری میزان جذب نور کمتر در نمونه حاصل از واکنش میلارد نسبت به نمونه‌های کنترل شده است (Shekaripour *at al.*, 2013). Ranjbar و همکاران (۲۰۲۲) بهبود خواص امولسیون کنندگی هیدرولیز پروتئین Cajanus cajan را بعد از واکنش گلیکوزیلاسیون را بررسی کردند و گزارش کردند که خواص عملکردی پروتئین‌ها و پپتیدها و از جمله خاصیت امولسیون کنندگی آنها در اثر واکنش میلارد بهبود می‌یابد و این ویژگی به نوع قند، جرم مولکولی، بار، ساختار ترکیبات قندی و پروتیینی به کار رفته وابسته است.

نتیجه‌گیری

به‌طورکلی نتایج این تحقیق نشان داد که خواص آنتی‌اکسیدانی و امولسیون کنندگی محصول هیدرولیز پروتئین عدس در اثر واکنش میلارد بهبود می‌یابد و واکنش با قند لاکتوز و دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و pH ۶/۵ بیشترین تاثیر را در بین تیمارهای مورد بررسی داشته است. بنابراین محصول هیدرولیز پروتئین عدس و همچنین محصول واکنش کلیکوزیله شدن با قندهای احیا کننده دارای پتانسیل کاربرد در فرمولاسیون محصولات غذایی فراسودمند است.

سپاسگزاری

از همکاری جناب آقای دکتر مهدی ملک پور کارشناس محترم آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس در انجام مراحل آزمایشگاهی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

منابع

Ames, J.M. (1998). Applications of the Maillard reaction in the food industry. *Food Chemistry* 62, 431-439.

Ajandouz, E. H., Tchiakpe, L. S., Ore, F. D., Benajiba, A. & Puigserver, A. (2001). Effects of pH on caramelization and Maillard reaction kinetics in fructose-lysine model systems. *Journal of Food Science*, *66*(7), 926-931.

Al-Hakkak, J. & Al-Hakkak, F. (2010). Functional egg white–pectin conjugates prepared by controlled Maillard reaction. *Journal of Food Engineering*, 100, 152-159.

Alizadeh, R., Mizraei, M . & Fadaei, V. (2020). Stability of antioxidant activity of lentil protein hydrolysis product against heat and pH treatments. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*, 5, 861-849 [In Persian].

Berlett, B.S. & Stadtman, E.R. (1997). Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 20313-20316.

Benjakul, S., Lertittikul, W. & Bauer, F. (2005). Antioxidant activity of Maillard reaction products from a porcine plasma protein–sugar model system. *Food Chemistry*, 93, 189-196.

Chang, H., Chen, Y. & Tan, F. (2011). Antioxidative properties of a chitosan–glucose Maillard reaction product and its effect on pork qualities during refrigerated storage. *Food Chemistry*, 124, 589-595.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144-148.

Delgado-Andrade, C., Seiquer, I., Haro, A., Castellano, R. & Navarro, M.P. (2010). Development of the Maillard reaction in foods cooked by different techniques. Intake of Maillard-derived compounds. *Food Chemistry*, 122, 145-153.

Gheshlaghi Piri, S., Sadeghi Mahonak, A., Ghorbani, M. & Alami, M. (2018). Optimization of the process Optimization of the process of production of hydrolyzed protein from whey using alkalase enzyme. *Journal of Food Science and Technology*,77, 144-134 [In Persian].

Ghazanfarzadeh, Z. & Emami, L. (2014). Glycolysis is a promising method for modifying food proteins: a study of physicochemical properties and structure. *National Conference on Meals*, 1, 9-1 [In Persian].

Gu, F., Kim, J. M., Hayat, K., Xia, S., Feng, B. & Zhang, X. (2010). Characteristics and antioxidant activity of ultrafiltrated Maillard reaction products from a casein–glucose model system. *Food Chemistry*, *117*(1), 48-54.

Ghasemi P, Mirzaei M. & Mirdamadi S. (2020). Effect of heat and freeze-thaw pretreatments on enzymatic hydrolysis of lentil protein by alkalase enzyme and production of antioxidant peptides. *Journal of Food Science and Nutrition*, 3, 32 -18 [In Persian].

Hoyle, N.T. & Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (Clupea harengus). *Journal of food Science*, 59, 76-79.

Hwang, I. G., Kim, H. Y., Woo, K. S., Lee, J. & Jeong, H. S. (2011). Biological activities of Maillard reaction products (MRPs) in a sugar–amino acid model system. *Food Chemistry*, *126*(1), 221-227.

Hosseini, S., Ghareghi, A., Jamalzadeh, H., Safari, R. & Hosseini, S. (2013). Comparison of hydrolyzed protein from guts, viscera and head of phytophagous fish (Hypophthalmichthys molitrix) using alcalase

enzyme and internal tissue enzymes. *Scientific Journal of Fisheries*, 3, 62-55 [In Persian].

Joshi, M., Timilsena, Y. & Adhikari, B. (2017). Global production, processing and utilization of lentil: A review. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(12), 2898-2913.

Kim, J. S. & Lee, Y. S. (2009). Antioxidant activity of Maillard reaction products derived from aqueous glucose/glycine, diglycine, and triglycine model systems as a function of heating time. *Food Chemistry*, 116, 227-232.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Total protein estimation by Lowry's method. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.

Li, Y., Lu, F., Luo, C., Chen, Z., Mao, J., Shoemaker, C. & Zhong, F. (2009). Functional properties of the Maillard reaction products of rice protein with sugar. *Food Chemistry*, 117, 69-74.

Liu, Q., Kong, B., Han, J., Sun, C. & Li, P. (2014). Structure and antioxidant activity of whey protein isolate conjugated with glucose via the Maillard reaction under dry-heating conditions. Food Structure, 1, 145-154.

Maqsoudlou, A., Mahoonak, A.S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F. & Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalase hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*, 116, 905-915.

Molaeifar, M., Larry, M., Mushri, M. & Bustani, S. (2017). The effect of microwave treatment on the rate of glycosylation of conjugates resulting from mylard lysozyme-maltodextrin reaction. *Journal of Food Science and Technology*, 60: 113- 105 [In Persian].

Maillard, M. N., Billaud, C., Chow, Y. N., Ordonaud, C. & Nicolas, J. (2007). Free radical scavenging, inhibition of polyphenoloxidase activity and copper chelating properties of model Maillard systems. *LWT-Food Science and Technology*, 40, 1434-1444.

Moscovici, A.M., Joubran, Y., Briard-Bion, V., Mackie, A., Dupont, D. & Lesmes, U. (2014). The impact of the Maillard reaction on the in vitro proteolytic breakdown of bovine lactoferrin in adults and infants. *Food & Function*, 5, 1898-1908.

Mengíbar, M., Miralles, B. & Heras, Á. (2017). Use of soluble chitosans in Maillard reaction products with β-lactoglobulin. Emulsifying and antioxidant properties. *LWT*, 75, 440-446.

Mirdamadi, S., Soliman Zadeh, N., Mirzaei, M. & Motahhari, P. (2017). Bioactive peptides: Production process, health effects and application as natural additives in the production of processed foods. *Journal of Food Hygiene*, 7(25), 1-20 [In Persian].

Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M.R. & Aminlari, M. (2018). Production of antioxidant and ACE-inhibitory peptides from Kluyveromyces marxianus protein hydrolysates: Purification and molecular docking. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26, 696-705.

Mokhtari, Sh. (2018). Antioxidant properties of Millard reaction products. 1-6 [In Persian].

Maqsoudlou, A., Mahoonak, A.S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F. & Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalase hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*, 116, 905-915.

Niki, E., Noguchi, N., Tsuchihashi, H. & Gotoh, N. (1995). Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 62, 1322S-1326.

Nagpal, R., Behare, P., Rana, R., Kumar, A., Kumar, M., Arora, S., Morotta, F., Jain, S. & Yadav, H. (2011). Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food & Function*, 2, 18-27.

Nourmohammadi, A., Sadeghi Mahonak, A., Shahrampour, D. & Khamiri, M. (2015). Optimization of Hydrolysis of Pumpkin Seed Meal Protein Protein to Achieve Maximum Antioxidant Properties. *Journal of Food Processing and Preservation*, 9, 1-12 [In Persian].

Oseguera-Toledo, M.E., de Mejia, E.G., Dia, V.P. & Amaya-Llano, S.L. (2011). Common bean (Phaseolus vulgaris L.) hydrolysates inhibit inflammation in LPS-induced macrophages through suppression of NF-κB pathways. *Food Chemistry*, 127, 1175-1185.

Pownall, T.L., Udenigwe, C.C. & Aluko, R.E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (Pisum sativum L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. Journal of agricultural and food chemistry 58, 4712-4718.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.

Rajabzadeh, M., Pourashouri, P., Shabanpour, B. & Alishahi, A. (2018). Evaluation of functional and antioxidant properties of hydrolyzed rainbow trout egg protein (Oncorhyynchus mykiss) Journal of Innovation in *Food Science and Technology*, 10, 35-23 [In Persian].

Ranjbar Nedamani, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Jacobsen, C. & Khouri, V. (2022). Improvement of antioxidant and emulsifying properties of Cajanus cajan's protein hydrolysate by glycosylation through maillard reaction. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, *17*(6), 137-152.

Su, G., Zheng, L., Cui, C., Yang, B., Ren, J. & Zhao, M. (2011). Characterization of antioxidant activity and volatile compounds of Maillard reaction products derived from different peptide fractions of peanut hydrolysate. *Food Research International,* 44, 3250-3258.

Shekaripour, F., Lari, M., Nia Kothari, M. & Eskandari, M. (2013). Investigating the effect of conjugation with dextran in Maillard reaction conditions on the functional and application properties of whey proteins. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5, 1-8 [In Persian].

Song, N., Tan, C., Huang, M., Liu, P., Eric, K., Zhang, X., Xia, S. & Jia, C. (2013). Transglutaminase cross-linking effect on sensory characteristics and antioxidant activities of Maillard reaction products from soybean protein hydrolysates. *Food Chemistry,* 136, 144-151.

Yilmaz, Y. & Toledo, R. (2005). Antioxidant activity of water-soluble Maillard reaction products. *Food Chemistry*, *93*(2), 273-278.

Yavarnejad, N., Mirzaei, M. & Mirdamadi, S. (2019). Optimization of enzymatic hydrolysis parameters of lentil protein by response surface method with the aim of increasing antioxidant activity. *International Congress on Agricultural Development, Natural Resources, Environment and Tourism of Iran*, 1, 1-16 [In Persian].

Effect of Millard Reaction on Antioxidant and Emulsifying Properties of Lentil Protein Hydrolysate

S. Faraji [a], M. Mirzae [b*] , S. Mirdamadi [c]

[a] MSc Student of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b*] Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Professor of the Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

Received: 7 May 2022 Accepted: 6 August 2022

Abstract

Introduction: Protein hydrolysates and bioactive peptides that have health benefits for consumers and protein glycolysis is a well-known strategy for increasing the health benefits and functional qualities of proteins. The subjects of this study were the effects of temperature, pH, and sugar type on the progress of the Mailard reaction in lentil protein hydrolysate, as well as its antioxidant and emulsification capabilities.

Materials and Methods: The protein isolated from lentil seeds was hydrolyzed enzymatically by alkalase and mixed with glucose and lactose. Millard reaction occured at temperatures of 60 and 80 ° C and pHs of 6.5 and 11. The reaction progress was tracked over time by measuring the color intensity at 420 nm and the values of free amine groups using OPA method. The ABTS radical scavenging activity and emulsification capabilities of the final products product were analysed.

Results: The results revealed that the reaction of lentil protein hydrolysate with glucose at 60 ° C and pH of 6.5 produced the most deep brown color. The findings of measuring the number of free amine groups also confirmed the results. Lactose sugar products with a lesser browning degree have the greatest effect on increasing antioxidant activity. Overall, the antioxidant activity of lentil protein hydrolyate increased from 24.18 to 60.97%, and its emulsifying function was enhanced.

Conclusion: Overall, the results demonstrated that the Millard interaction between lentil protein hydrolysate proteins and peptides increases its health and functional qualities, and the product has the potential to be exploited in the formulation of functional foods.

Keywords: *Antioxidant Activity, Emulsifier, Enzymatic Hydrolysis, Lentil Protein, Millard Reaction.*

* Corresponding Author: mahtam86@gmail.com