



## تولید آبکافته زیست فعال از گلوتن گندم با عصاره گیاه کارده

فرناز خسروی<sup>۱</sup>، محمد حسین عزیزی<sup>۲\*</sup>، رضوان موسوی ندوشن<sup>۳</sup>، محمد ربانی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	در این تحقیق از عصاره گیاه کارده، جهت تولید پپتیدهای زیست فعال از گلوتن گندم استفاده گردید و خواص بیولوژیکی و خواص عملکردی اجزای تولیدی بررسی گردید. نتایج نشان داد گیاه کارده در pH ۵ و دمای ۴۵ درجه دارای بالاترین میزان فعالیت خود (۷/۳ U/ml) می باشد. تمامی پپتیدها خواص ضدآکسایشی مطلوبی داشتند ولی پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون دارای بالاترین خواص ضدآکسایشی بودند. این پپتیدها قابلیت مهارکنندگی رادیکال های DPPH (۲/۶۴±۸۵ μmol TE/g) و ABTS (۲±۰۵ μmol TE/g) (۲۹۵/۸۱) را دارند و جز کوچکتر از ۱۰۰ کیلودالتون دارای کمترین خاصیت ضد اکسایشی است. جز F2 با داشتن ۰/۴۸±۸۶/۳ و پس از آن جز F3 با داشتن ۳/۱۱±۷۶/۳ توانایی مهار آنزیم ACE را داشت. آبکافته های F1 (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) دارای قدرت بازدارندگی بر تمامی باکتری های مورد بررسی را داشت در حالیکه F4 اثری بر رشد پاتوژن ها نداشت. خواص عملکردی نشان داد که حلالیت آبکافته ها در محیط اسیدی در تمامی نمونه ها کاهش یافت و در PH ۷ و ۸ با افزایش وزن مولکولی میزان حلالیت نمونه ها افزایش معناداری پیدا کرد، همچنین با افزایش وزن مولکولی، قدرت ایجاد امولسیون کاهش می یابد ولی قدرت تشکیل کف و پایداری امولسیون و کف افزایش می یابد. نتایج نشان می دهد که آبکافته های تولیدی گلوتن حاصل از ضایعات کارخانجات تولید نشاسته، پتانسیل بالایی جهت استفاده در سایر صنایع را داراست.
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۰۷	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۱۷	
کلمات کلیدی:	گیاه کارده، آبکافته، گلوتن، خواص بیولوژیکی، خواص عملکردی.
DOI: 10.52547/fsct.18.117.155	
* مسئول مکاتبات:	
azizit_m@modares.ac.ir	

## ۱- مقدمه

پتیدهای زیست فعال معمولاً دارای ۲۰-۲۰۰ باقی مانده آمینواسیدی بوده و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون دارند. این توالی‌ها تا زمانی که درون پروتئین‌های بزرگ هستند غیرفعال هستند اما پس از هیدرولیز پروتئین والد توسط آنزیم‌های گوارشی، آنزیم‌های میکروبی یا طی فرآوری مواد غذایی آزاد می‌شوند، قادر خواهند بود اثرات فیزیولوژیکی، بیولوژیکی و کاربردی خود را اعمال کنند [۱]. براساس خصوصیات ساختاری، ترکیب و توالی آمینواسیدی، پتیدها می‌توانند نقش‌های مختلفی از جمله شبه افیونی، متصل شونده به مواد معدنی، تنظیم کننده فعالیت ایمنی، ضد میکروبی، پاداکسنده، پایین آورنده کلسترول و کاهش دهنده فشار خون ایفا کنند. علاوه بر این پتیدهای متعددی یافت شده‌اند که خصوصیات چندگانه‌ای داشته‌اند. تاکنون فعالیت‌های پاداکسنده پتیدهای زیست فعال و آبکافته‌های حاصل از پروتئین آفتاب گردان [۲]، ژلاتین [۳]، پوست ماهی کاد [۴]، پروتئین مغز گردو [۵]، لوبیا [۶]، پروتئین زرده تخم مرغ [۷]، کازئین شیر [۸]، میگو [۹]، تیلایلا [۱۰] و بسیاری موارد دیگر مورد بررسی قرار گرفته است. قابلیت ضد میکروبی بودن پتیدها به ویژگی‌های ساختاری پتید، اندازه پتید، ترکیب آمینواسید، آب‌گریز بودن آنها و ساختار ثانویه بستگی دارد. Timon و همکاران در سال ۲۰۱۸ گزارش دادند که پتیدهای حاصل از افزودن پروبیوتیک‌ها به پنیر کوتاه موجب کاهش یک سیکل باکتری لیستریا مونوسیتوزنز در طی ۲۰ روز نگهداری شده است [۱۱]. زنجیره‌ی پتیدهای دارای قدرت کاهش فشار خون، اکثراً کوتاه زنجیر (۱۲-۲ اسید آمینه) می‌باشند که حاوی آمینواسیدهای اسیدی مانند آسپارژیک اسید و گلوتامیک اسید می‌باشند و همچنین دارای بار مثبت (حاوی یک گروه قلیایی در انتهای آمینی)، و اکثراً آبگریز هستند [۱۲]. مطالعات بسیاری در مورد برنج [۱۳]، سویا [۱۴]، نخودفرنگی [۱۵] و تخم کتان [۱۶] گزارش شده است.

گیاه کارده با نام علمی *Biarum carduchorum* از گیاهان تیره گل‌شیبوری می‌باشد. کارده نوعی گیاهی خوراکی، تردکننده با برگ‌های پهن می‌باشد که سه گونه آن در ایران رشد می‌کند [۱۷]. امین لاری و همکاران در سال ۱۳۹۶ توانایی انعقاد شیر و

خواص پنیر تولیدی را با عصاره گیاه کارده مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که در نمونه پنیر تهیه شده با آنزیم گیاهی، طعم تلخ بیشتر و بوی پنیر تیزتر بود و بافت پنیر حاصل از سفتی کمتری برخوردار بود [۱۸]. شکر فروش و همکاران در سال ۱۳۹۶ با افزودن عصاره آبی گیاه کارده حاوی ۱۰۰ و ۱۵۰ واحد آنزیم به هر کیلو گرم گوشت ران گوساله، ویژگی‌های کالباس تولیدی را بررسی نمودند [۱۹]. در این تحقیق هرچند که عصاره آبی کارده موجب ترد شدن گوشت، افزایش قدرت امولسیون‌کنندگی و بهبود معنی دار شاخص‌های مربوطه گردید اما کاربرد گوشت ترد شده سبب بهبود قوام بافت کالباس‌های تولیدی نگردید و تاثیر معنی داری بر خصوصیات حسی آن‌ها نداشت.

پروتئین‌های گندم یا به عبارت دقیق‌تر، گلوتن، عامل مهمی در منحصر به فرد بودن گندم به شمار می‌آید. این پروتئین‌ها از دسته پروتئین‌های ذخیره‌ای بوده به دلیل عدم حلالیت در آب به راحتی می‌توان آنها را به شکل تقریباً خالص از سایر اجزاء گندم جدا نمود. گلوتن (بر حسب ماده خشک) دارای ۸۰ درصد پروتئین، ۸ درصد لیپید و مقادیری کربوهیدرات و خاکستر می‌باشد.

در سالهای اخیر، تولید پتیدهای زیست فعال از محصولات جانبی فرآیند غذا مورد توجه قرار گرفته است. استفاده از این ترکیبات ارزان قیمت به دلیل کاهش هزینه تولید، افزایش ارزش افزوده و مصرف موثر ضایعات اهمیت چشمگیری دارد. از این‌رو با توجه به مطالعات صورت گرفته، برای اولین بار است که عصاره آنزیمی جزئی‌خالص‌سازی شده‌ی گیاه کارده با گلوتن خمیر تولیدی از آرد گندم تیمار شده و تولید پتیدهای زیست می‌نماید. افزودن این پتیدها که فعالیت زیستی دارند علاوه بر بهبود خواص عملکردی گلوتن، موجب فراسودمند شدن فرآورده‌ی غلاتی نیز خواهد شد و می‌توان از آبکافته‌های حاصل به عنوان مکمل غذا در صنعت غلات سود برد.

## ۲- مواد و روش‌ها

گلوتن گندم (۸۰/۴۵ درصد پروتئین) مورد استفاده در این پژوهش از کارخانه گلوکوزان خریداری گردید. گیاه کارده در فواصل زمانی اردیبهشت تا خردادماه از نواحی اطراف شهرستان

۸۰۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد متوقف گردید. نمونه سپس در دمای محیط به مدت زمان ۳۰ دقیقه نگهداری و سپس در  $g12000$  و به مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب رومانند را در ۲۸۰ نانومتر قرائت گردید. یک واحد آنزیمی به معنی میزانی از آنزیم است که می تواند کازئین را به اکی والان محصول (اسید آمینه تیروزین) تبدیل کند و از غلظت های (۱/۰-۱ میلی مولار) آمینو اسید تیروزین نیز به عنوان منحنی استاندارد استفاده شد [۲۱]. مقدار پروتئین محلول نیز به روش برادفورد و با استفاده از سرم آلو مین گاوی (BSA) در غلظت های (۱/۰-۱ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد در طول موج ۵۹۵ نانومتر سنجش شد. منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب دماهای مختلف رسم شد. پایداری دمایی آنزیم پروتئاز با انکوباسیون آنزیم در طیف دمایی مختلف ۲۵-۵۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت انجام شد و فعالیت باقی مانده آنزیم طبق روش استاندارد اندازه گیری گردید. فعالیت پروتئاز در pH های مختلف با استفاده از یک بافر مخلوط انجام شد که شامل ترکیبات زیر با غلظت ۱۰۰ میلی مولار مقادیر pH (۸ و ۹) بافر Tris-HCL، (۶ و ۷) بافر فسفات، (۵) بافر سدیم سیترات تنظیم گردید. فعالیت آنزیمی نمونه ها با استفاده از سوبسترای کازئین و در شرایط ذکر شده انجام گرفت و منحنی فعالیت آنزیمی بر حسب pH رسم گردید. تمامی آزمایش ها مربوط به فعالیت با سه تکرار انجام شد.

### ۲-۳- فرآیند آبکافت

فرآیند آبکافت با استفاده از عصاره آنزیمی گیاه کارده در دما و pH بهینه انجام شد. پودر گلوتن گندم با نسبت ۵ درصد وزنی/حجمی درون ظرف واکنش مجهز به همزن، در آب مقطر پراکنده و به مدت زمان ۱۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه نگهداری شد و سپس قبل از افزودن آنزیم، دما و pH بهینه تنظیم گردید. آنزیم با نسبت ۱۰:۱۰۰ سوبسترا/ آنزیم (براساس محتوای پروتئین پودر) به سوسپانسیون اضافه گردید. فرآیند هضم آنزیمی به مدت زمان ۶ ساعت در همین شرایط ثابت انجام شد. در این مخلوط pH واکنش نیز با روش pH-State و با استفاده از سود ۱ نرمال ثابت گردید. پس از هضم، ظرف محتوای آنزیمی با غوطه وری ظرف واکنش در حمام ۹۰ درجه به مدت زمان ۱۰ دقیقه غیرفعال

کازرون واقع در استان فارس جمع آوری گردید و مورد تایید بخش گیاه شناسی دانشکده علوم دانشگاه شیراز قرار گرفت. تمام مواد شیمیایی به کار برده شده در این پژوهش از شرکت Merck تهیه شدند و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

### ۲-۱- آماده سازی عصاره آنزیمی

نمونه ها پس از جمع آوری با آب دیونیزه شسته شده و در محیط آزمایشگاه در دمای ۲۵ درجه خشک گردیدند و سپس توسط آسیاب برقی آسیاب گردید و در دمای یخچال نگهداری گردید. مقدار ۱۰۰ گرم گیاه کارده با ۶۰۰ میلی لیتر محلول سدیم کلرید ۰/۸۵ درصد مخلوط شده و پس از همزدن به مدت ۲۴ ساعت، صاف گردیده و سپس جهت جداسازی مواد جامد و نامحلول سانتریفوژ شده و مایع رویی تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه نگهداری شد. در این مرحله عصاره خام آنزیمی تولیدی در قسمت قبل را با سولفات آمونیوم با درصد اشباعیت ۶۵ درصد جهت رسوب آنزیم پروتئاز کارده مخلوط گردید. بدین منظور ابتدا سولفات آمونیوم را تا حصول ۶۵ درصد اشباعیت در حضور یخ و به آرامی به نمونه اضافه نموده تا به خوبی حل شود و اجازه داده می شود به مدت زمان ۳ ساعت در دمای ۴ درجه همزده شود و پس از طی این مدت زمان مخلوط را در  $g12000$  و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتریفوژ نموده و رسوب حاصل را در کیسه های دیالیز با cut off ۱۴۰۰۰ دالتون در محیط بافر فسفات با pH ۷ به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه دیالیز گردید [۲۰].

### ۲-۲- تعیین خصوصیات بیوشیمیایی پروتئاز

#### ۲-۱-۲- بررسی فعالیت و پایداری آنزیم در دماها و pH های مختلف

فعالیت پروتئاز عصاره کارده در دمای محیط و در محیط بافر فسفات ۵۰ میلی مولار که حاوی ۲ میلی مولار EDTA، ۵ میلی مولار DTT و ۵ میلی مولار ال-سیستئین،  $pH=7$ ، با استفاده از کازئین به عنوان سوبسترا صورت پذیرفت. در ابتدا ۵۰ میکرولیتر از عصاره آنزیمی به تیوبی حاوی ۳۵۰ میکرولیتر بافر افزوده شد سپس ۴۰۰ میکرولیتر کازئین ۱ درصد (وزنی/حجمی) به آن افزوده شد و واکنش در دمای ۳۷ به مدت زمان ۶۰ دقیقه و در حدواسط های ۱۰ دقیقه ای انجام شد. در ادامه واکنش با افزودن

## ۶-۲- بررسی خواص عملکردی

### ۶-۲-۱- حل پذیری آبکافته ها

حل پذیری آبکافته های گلو تن در pH های ۲، ۴، ۷، ۱۰ با حل کردن ۱۰۰ میلی گرم از آبکافته ها و نمونه ی شاهد در ۱۰ میلی لیتر از آب مقطر انجام شد و برای تنظیم pH، از سود و یا اسید هیدروکلریک ۱ مولار استفاده شد. محلول به دست آمده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد و در مرحله ی به مدت ۱۵ دقیقه در ۱۰۰۰۰ g در دمای اتاق سانتیفریوژ شد و سپس میزان پروتئین رویه ی شناور با استفاده از روش Lowry با استفاده از استاندارد آلبومین گاوی به دست آمد [۲۴]. میزان حل پذیری آبکافته ها با استفاده از معادله ی زیر محاسبه شد:

رابطه ۲-۲

میزان پروتئین در رویه ی شناور = میزان حل پذیری  
میزان پروتئین در نمونه اولیه

### ۶-۲-۲- ویژگی های امولسیون کنندگی

اندیس فعالیت امولسیون (EAI) و اندیس پایداری امولسیون (ESI<sup>2</sup>) با استفاده از روش Pearse و همکاران در سال ۱۹۷۸ با اندکی تغییرات انجام شد. روغن آفتابگردان به میزان ۱۰ میلی لیتر به ۳۰ میلی لیتر از محلول آبکافته ها با غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر افزوده شد و پس از اختلاط pH نمونه ها بر روی ۷ تنظیم گردید. مخلوط یاد شده در ۱۲۰۰۰ g به مدت ۱ دقیقه همگن شد. ۵۰ میکرولیتر از امولسیون تشکیل شده را برداشته و به میزان صد مرتبه با استفاده از محلول سدیم دودسیل سولفات ۰/۱ درصد رقیق شد. سپس میزان جذب نمونه ی یاد شده در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. همین مراحل برای امولسیون تشکیل شده پس از ۱۰ دقیقه ماندگاری در دمای اتاق تکرار شده و میزان جذب آن در طول موج مورد نظر به دست آمد [۲۵].

میزان EAI و ESI با استفاده از معادلات زیر به دست آمد:

رابطه ۳-۲

$$EAI(m^2g^{-1}) = 2 \times 2.303 \times 100 \times A / C \times 0.25 \times 10000$$

در این معادله A برابر میزان جذب نمونه ها در ۵۰۰ نانومتر، C برابر است با غلظت پروتئین در نمونه بر حسب گرم بر لیتر

گردید و پس از این مدت زمان ظرف حاوی نمونه فوراً در یخ خنک گردید. اجزای غیر محلول توسط سانتیفریوژ با سرعت ۸۰۰۰ g به مدت زمان ۱۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتیفریوژ شد و در نهایت فاز بالایی از کاغذ صافی عبور داده شد و سپس توسط خشک کن تحت خلا خشک گردید و پودر حاصله تا انجام مراحل بعد در یخچال نگهداری شد [۲۲].

## ۴-۲- تعیین درجه آبکافت به روش pH-State

میزان آبکافت آنزیمی با اندازه گیری درجه آبکافت به روش pH-State برآورد شد. درجه آبکافت توسط معادله زیر محاسبه گردید.

معادله (۱-۲)

$$DH\% = B \times N_b / (\alpha \times M_p \times h_{tot}) \times 100$$

B و N<sub>b</sub> مقدار سدیم هیدروکسید مصرفی در طول آبکافت و نرمالیه آن را نشان می دهد. α میانگین آزاد شدن گروه های α-NH<sub>2</sub> از پیش ماده و M<sub>p</sub> جرم پروتئین (گرم) است. h<sub>tot</sub> تعداد پیوندهای پپتیدی موجود برای آبکافت و برای گلو تن گندم برابر با ۸۳۷ mEq/g است [۲۳].

## ۵-۲- غشاهای فرآپالایش

به منظور جداسازی محدوده های مختلف وزن مولکولی پروتئین آبکافت شده از غشاهای ۳، ۳۰ و ۱۰۰ کیلودالتون (Millipour) استفاده شد (شکل ۱-۳). بدین منظور ابتدا غشاهای فرآپالایش را با ۵ میلی لیتر آب مقطر، به مدت ۵ دقیقه و با استفاده از سانتیفریوژ ۵۰۰۰ g شستشو شدند. سپس محلول پروتئین آبکافت شده به وسیله غشاهای فرآپالایش ۱۰۰ کیلودالتون و با استفاده از سانتیفریوژ یخچال دار (۵۰۰۰ g، دمای ۴ درجه و به مدت ۴۰ دقیقه) فیلتر شد. محلول باقیمانده در بالای فیلتر با استفاده از میکروسامپلر جدا شده و به عنوان نمونه به عنوان بیشتر از ۳۰ کیلودالتون در نظر گرفته شد. محلول رد شده از فیلتر مجدداً با غشای ۳۰ کیلودالتون و به روش بالا ذکر شده در بالا جداسازی شد. محلول رد شده از فیلتر مجدداً با غشای ۳ کیلودالتونی فرآپالایش شد. در نهایت ۵ فرکشن جداسازی گردید. غلظت پروتئین محلول در نمونه های فرآپالایش شده نی به روش لوری تعیین گردید.

1. Emulsifying activity index  
2. Emulsion stability index

رابطه ۲-۴

و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. پس از گذشت مدت نگهداری، میزان جذب نمونه ها در ۹۶ خانه و طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفوتومتر قرائت شد. توانایی مهار رادیکال های DPPH• با استفاده از منحنی استاندارد ترولکس (۲۰۰ - ۱۰ میکرومول بر میلی لیتر) در هر میلی گرم ماده خشک بیان شد [۲۷].

#### ۲-۷-۲- سنجش توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS•

به منظور سنجش توانایی مهارکنندگی رادیکال ABTS• از روش Aleman و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. محلول ۷ میلی مولار ABTS• در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار در ظرف شیشه ای تیره رنگ تهیه شده و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگهداری شد. پس از طی مدت زمان مورد نظر، رقیق سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷ در طول موج ۷۶۴ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه با ۹۸۰ میکرو لیتر از محلول رقیق سازی شده ABTS• مخلوط شده و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه نگهداری شد و پس از طی این مدت زمان جذب نمونه ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکالهای کاتیون ABTS• با استفاده از فرمول منحنی استاندارد ترولکس (۱۱۰۰ - ۵۰ میکرومول بر میلی لیتر) محاسبه گردید [۲۸].

#### ۲-۸- سنجش فعالیت مهارکنندگی آنزیم تبدیل

##### کننده آنژیوتنسن I

مقدار ۵۰ میکرولیتر از نمونه (پروتئین هیدرویز شده و هر یک از فرکشن های پپتیدی) با ۵۰ میکرولیتر محلول ACE (۲۵ واحد/میلی لیتر) مخلوط می شود و ۵ دقیقه در دمای ۳ درجه انکوبه می گردد. سپس مخلوط حاصل را با ۱۵۰ میکرولیتر سوبسترا (Hip-His-Leu)، ۸/۳ میلی مولار در بافر سدیم بورات ۵۰ میلی مولار) به مدت ۶۰ دقیقه در دمای مشابه انکوبه می کنیم. واکنش با افزودن ۲۵۰ میکرولیتر محلول ۱ مولار اسید کلریدریک متوقف می شود. بعد از انجام عمل سانتی فوژ در ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه، ۰/۲ میلی لیتر از لایه بالایی به لوله آزمایش منتقل می شود و در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱ ساعت خشک می گردد. هیپوبوریک اسید در ۰/۵ میلی لیتر آب مقطر حل می شود و جذب محلول نهایی را در ۲۲۸

$$ESI \text{ (min)} = \frac{A0 \times 10}{A0 - A10}$$

در این معادله A0 میزان جذب در نمونه ی اولیه و A10 برابر است با جذب پس از ۱۰ دقیقه

#### ۲-۶-۳- ویژگی های کف گندگی

میزان گسترش کف (FE) و پایداری کف (FS) تولیدی از آبکافته ها با استفاده از روش Shahidi و همکاران (۱۹۹۵) با اندکی تغییرات انجام شد. ۲۰ میلی لیتر از محلول آبکافته ها با غلظت ۱ درصد وزنی/حجمی در هموژنایزر به مدت یک دقیقه و در ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای اتاق همگن شد. نمونه های به دست آمده به یک استوانه ی درجه بندی شده منتقل شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. قابلیت تشکیل کف را قابلیت انتشار کف در زمان صفر دقیقه و پایداری کف نیز میزان انتشار کف پس از ۱۰ دقیقه می باشد [۲۶]. FE و FS با استفاده از معادلات زیر به دست آمد:

معادله ۲-۵

$$FE \text{ (درصد)} = \frac{V_T - V_0}{V_0}$$

معادله ۲-۶

$$FS \text{ (درصد)} = \frac{V_T - V_0}{V_0}$$

در این معادلات VT برابر است با حجم کل پس از همگن کردن (بر حسب میلی لیتر)، Vt برابر است با حجم کف پس از نگهداری به مدت ۳۰ دقیقه (بر حسب میلی لیتر)، V0 برابر است با حجم اولیه ی محلول پیش از همگن سازی (بر حسب میلی لیتر)

#### ۲-۷-۲- بررسی خواص ضد اکسایشی

##### ۲-۷-۱- سنجش توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH•

فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل به روش Wang و همکاران (۲۰۱۰) با تغییرات اندک سنجیده شد. بدین منظور ۵۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH• (۰/۱۶ میلی مولار در اتانول ۹۶ درصد) را با ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه، در میکروتیوب ۱/۵ میلی لیتری مخلوط گردید. نمونه شاهد نیز با جایگزینی نمونه با آب مقطر تهیه شد. سپس مخلوط به خوبی ورتکس شده

حاصل به ۹۰ MU/ml رقیق گردید. اندازه گیری فعالیت آنزیم در دمای ۳۷ درجه و طول موج ۴۰۵ نانومتر برای هر نمونه انجام گرفت. از محلول آکاربوز ۵ mg/ml به عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت و میزان بازدارندگی بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 * (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) - 1 = \text{قدرت بازدارندگی}$$

## ۱۱-۲- آزمون بازدارندگی آلفا-آمیلاز خوکی

بررسی فعالیت بازدارندگی آبکافته های آنزیمی گلوتن نسبت به آنزیم آلفا آمیلاز خوکی با روش Liu و همکاران (۲۰۱۷) با کمی تغییرات انجام گرفت. در ابتدا مخلوطی از ۱۰۰ میکرولیتر از محلول آنزیمی (3.75 U/ml) را با ۱۰۰ میکرولیتر از دمای ۳۷ درجه به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه کرده و سپس در ادامه با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر از محلول نشاسته (0.5 % w/v) واکنش آغاز می شود و پس از طی شدن ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه، با افزودن ۴۰۰ میکرولیتر محلول DNS واکنش متوقف می شود و سپس به مدت ۵ دقیقه در آبجوش قرار داده و پس از آن فوراً در یخ فرو برده و با ۳ ml آب مقطر رقیق می نمایم و میزان جذب مخلوط را در ۵۴۰ نانومتر می خوانیم. همچنین از آکابوز به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

## ۱۲-۲- تجزیه تحلیل آماری

تمام آزمایشها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. میانگین و انحراف معیار در نرم افزار Excel محاسبه شد. از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ جهت آنالیز داده ها و نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

## ۳- نتایج

بر اساس یافته های به دست آمده، میزان پروتئین عصاره آبی گیاه کارده ۵/۴۱ mg/ml می باشد و میزان فعالیت آنزیمی نیز ۷/۳ U/ml می باشد. همانطور که در شکل شماره ۱ مشاهده می شود بالاترین فعالیت آنزیم در pH ۵ می باشد و در این pH این آنزیم ۸۲ درصد فعالیت خود را حفظ نموده است و با افزایش pH محیط و رسیدن pH به ۹، ۳۰ درصد از فعالیت آنزیم

نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده می شود. شاخص IC<sub>50</sub> به عنوان غلظتی که برای مهار ۵۰ درصد آنزیم ACE مورد نیاز است نیز گزارش می گردد [۲۹].

$$100 * (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) - 1 = \text{قدرت مهارکنندگی}$$

## ۹-۲- بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای

### زیست فعال به روش میکروداپلوشن

جهت تعیین خواص ضدباکتریایی پپتیدهای زیست فعال حاصل از پروتئین گلوتن گندم از روش میکروداپلوشن استفاده شد. بدین منظور پس از تلقیح و فعالسازی هر یک از باکتری های بیماری زای مورد مطالعه در محیط کشت مولر هیتتون براث به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، سوسپانسیون میکروبی با غلظت ۱۰<sup>۴</sup> CFU/ml آماده شد. سپس رقت های مختلفی از ماده ضدباکتری (پپتید زیست فعال) با ضریب یک دوم تهیه و با غلظت ثابتی (۱۰<sup>۴</sup> CFU/ml) از هر یک از باکتری های مورد مطالعه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در داخل میکروپلیت ۹۶ خانه ای انکوبه گردید. اولین ردیف پلیت به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد و تنها حاوی محیط کشت و ترکیب ضد میکروبی با غلظت مشخصی بود. ردیف آخر به عنوان کنترل مثبت تنها حاوی محیط کشت و سوسپانسیون باکتری با غلظت (۱۰<sup>۴</sup> CFU/ml) بود. حجم نهایی هر خانه میکروپلیت ۲۰۰ میکرولیتر در نظر گرفته شد. پس از گذشت مدت زمان انکوباسیون، جذب نوری هر یک از خانه های میکروپلیت با دستگاه الیزابیدر در طول موج ۶۰۰ نانومتر تعیین گردید و اولین غلظت از ماده آنتی باکتریال (پپتید زیست فعال) که مانع رشد هر یک از باکتری ها شده بود و کدورتی کمتر از کدورت کنترل مثبت داشت به عنوان حداقل غلظت مهارکنندگی (MIC) در نظر گرفته شد.

## ۱۰-۲- بررسی خواص بازدارندگی آنزیم

### آلفا-گلوکوزیداز

آزمون بازدارندگی آلفا-گلوکوزیدازی روده موش Connelly و همکاران (۲۰۱۴) با کمی تغییرات انجام گرفت. در ابتدا غلظت ۲۰ mg/ml از نمونه ساخته شد و در ادامه استخراج آنزیم از پودر روده موش توسط بافر صورت گرفت و سپس عصاره

نتایج حاصل از آبکافت نمونه گلوتن توسط عصاره گیاه کارده (شکل ۲) نشان داد که با افزایش زمان تا ۶ ساعت درجه آبکافت روند افزایشی اما شدت و نرخ آن روند کاهشی داشته است، به گونه ای که در یک ساعت اول بیشترین میزان آبکافت رخ داده است. علت این امر را می توان این گونه عنوان نمود که با افزایش مدت زمان آبکافت، تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و همچنین فعالیت آنزیم کاهش می یابد. این امر با نتایج سایر پژوهش ها مطابقت دارد. پارامتر بعدی میانگین طول زنجیره پپتیدی است که از عوامل مهم در خواص پروتئین های آبکافتی است و با درجه آبکافت رابطه عکس دارد. نمونه گلوتن با درجه آبکافت ۶۷/۵۱٪، دارای میانگین طول زنجیره ی ۱۵/۳۶ می باشد. در پژوهش حاضر، بازیابی نیتروژنی (پروتئینی)، که پارامتری جهت نشان دادن خلوص و گرم پروتئین آبکافتی نسبت به مقدار پروتئین سوبستراست، نمونه پروتئین آبکافت شده ۸۷/۲۲ درصد پروتئین را به خود اختصاص داد. پژوهشی که خواص عملکردی پروتئین آبکافتی مشتق شده از فیله ماهی را مورد ارزیابی قرار داد، وجود رابطه مستقیم بین درجه آبکافت و بازیابی پروتئین را نشان داد [۳۳].

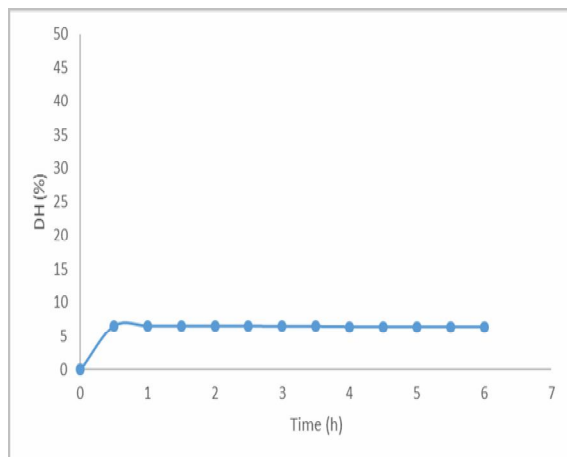


Fig 2 Degree of hydrolysis of wheat gluten versus time (6 h)

### ۲-۳- قدرت مهار رادیکال DPPH•

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH• هر یک از جزیهای غشای فرآپالایش آبکافته های پروتئین گلوتن در جدول ۱ آمده است. بالاترین میزان مهارکنندگی در جزیهای آبکافته های کوچکتر از ۳ کیلودالتون و برابر با  $64 \pm 65/85 \mu\text{mol TE/g}$  میکرومول

باقی مانده است و فعالیت آنزیم با افزایش pH کاهش معناداری ( $p < 0.05$ ) می یابد. این مطلب نشان دهنده آن است که آنزیم پروتئاز موجود در این عصاره گیاه کارده پروتئاز اسیدی می باشد و به همین خاطر در شرایط قلیایی از میزان فعالیت آن کاسته می شود به طوریکه هرچه pH بافر استخراج کننده کمتر شده و به pH فعالیت بهینه نزدیک می گردد، میزان فعالیت باقی مانده افزایش می یابد. از این نظر عصاره آنزیمی گیاه کارده مشابه سایر آسپارتیک پروتئازهای دیگر می باشد [۳۰ و ۳۱].

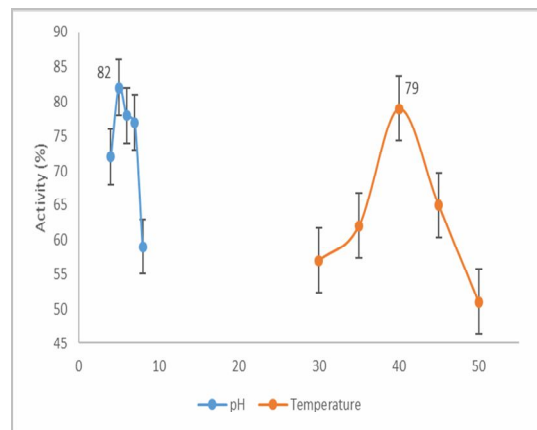


Fig 1 Enzyme activities of *Biarum carduchcorum* extract partial purification in different pH and temperature

با توجه به شکل شماره ۱ با افزایش دما از ۲۵ درجه تا ۴۵ درجه افزایش معناداری در فعالیت آنزیم گیاه کارده مشاهده شد که با افزایش بیشتر به دمای ۵۵ درجه حالت مسطح پیدا کرد. از این رو دمای ۴۵ درجه با حفظ ۷۹ درصد فعالیت، به عنوان مطلوب ترین دمای فعالیت جهت انجام عمل آبکافت مورد استفاده قرار داد. در تحقیقی حداکثر دما برای فعالیت آنزیمی آسپارتیک استخراج شده از ریزوپوس اوریزا را در دمای ۶۰ درجه گزارش کردند و عنوان نمودند که این آنزیم به سرعت در دماهای بالا غیرفعال می گردد [۳۲]. نتایج مشابهی توسط پروتئاز جدا شده از گیاه کارده توسط گلکاری وهمکاران (۱۳۹۶) مشاهده شد که در آن تحقیق نیز دمای ۴۵ درجه و PH ۵ مناسبترین شرایط فعالیت عصاره گیاه کارده و استفاده از این عصاره جهت تولید پنیر از شیر می باشد [۱۸ و ۱۹].

### ۳-۱- درجه آبکافت، میانگین طول زنجیره پپتیدی و بازیابی پروتئینی

لوبیاچیتی قدرت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر جزیهای با وزن مولکولی بالاتر دارد. این پژوهشگران بیان داشتند که توضیح احتمالی در مورد این یافته ها ممکن است به سبب فراوانی اسیدهای آمینه آبریز و آبدوست در پپتیدهای غنی شده در طول فرآپالایش به ویژه با وزن مولکولی پایین باشد. خصوصیات ضداکسایشی پپتیدهای با وزن مولکولی پایین با توجه به همین وزن مولکولی آنها تایید شده است، زیرا آنها می توانند به راحتی با رادیکال های لیپیدی واکنش داده و پراکسیداسیون لیپیدی را کاهش دهند [۳۶].

همانند رادیکال DPPH•، اندازه و ساختار پپتیدها و توالی اسیدآمینه آن ها بر میزان مهار رادیکال کاتیون ABTS• اثرگذار است. تخریب ساختار طبیعی پروتئین ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به بازشدن ساختار طبیعی و قرارگیری در معرض گروه های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال های آزاد می باشند خواهد شد. آبکافته های پروتئین گلوتن سرشار از اسیدهای آمینه اسیدی آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید می باشد (جدول ۲) و این اسیدهای آمینه به سبب حضور الکترونها اضافی می توانند در برخورد با رادیکال های آزاد به عنوان دهنده الکترون عمل کنند و از این طریق واکنش های زنجیره ای رادیکال را با تولید محصولات غیررادیکالی متوقف کنند و اثر ضد اکسایشی ایجاد نمایند [۲ و ۳]. ویژگی آبریز بودن پپتیدها نیز نقش مهمی در فعالیت ضداکسایشی آنها به خصوص در مهار رادیکال های آزاد دارد. حضور اسیدهای آمینه آبریز مانند والین، لوسین، آلانین، ایزولوسین، پرولین و تریپتوفان در ساختار پپتیدها، خواص ضداکسایشی قوی تری را ایجاد می کنند [۲ و ۴].

**Table 1** Antioxidant and antihypertension activity (ACE-I) of gluten hydrolysed fractions.

Peptide fraction	DPPH• radical scavenging activity ( $\mu$ mol TE/g)	ABTS• radical scavenging activity ( $\mu$ mol TE/g)	Antihypertension activity (ACE-I) (%)
F1 (<3 kDa)	65.85±2.64a	295.81±2.05a	24.4±0.55c
F2 (3-30 kDa)	51.45±3.37b	232.55±3.31b	86.3±0.48a
F3 (30-100 kDa)	48.4±1.21b	188.25±1.49c	81.3±3.11a
F4 (>100 kDa)	18.25±1.74c	115.24±5.48d	46.87±2.23b

Concentration of peptide fraction for antioxidant activity and ACE inhibitory was 5 mg/ml and 10 mg/ml, respectively. Results are expressed in mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). Different letters indicate the significant difference between fractions and concentrations (p < 0.05).

تولیدی در جدول ۱ آمده است. از میان ۴ فرکشن تولیدی، ۲ فرکشن، F2 (پپتیدهای با وزن مولکولی بین ۳ و ۳۰ کیلودالتون) و F3 (پپتیدهای با وزن مولکولی بین ۳۰ و ۱۰۰ کیلودالتون)

تورلکس بر گرم ماده خشک می باشد. پایین ترین میزان مهارکنندگی مربوط به جز بزرگتر از ۱۰۰ کیلودالتون و برابر با  $18/25 \pm 1/74 \mu\text{mol TE/g}$  می باشد. این نتایج با پژوهش های همکاران در مورد آبکافته دانه کتان، لی و همکاران در مورد آبکافته نخود، چن و همکاران در مورد آبکافته سفیده تخم مرغ، چانگ و همکاران در مورد آبکافته ماهی همخوانی داشت. این پژوهشگران گزارش نمودند که پپتیدهای با اندازه کوچک تر، دارای اثر مهارکنندگی رادیکال بالاتری نسبت به سایر جزیهای شای فرآپالایش دارند همچنین نوع اسیدآمینه موجود در این آبکافته ها بر فعالیت مهارکنندگی DPPH• اثر گذار خواهد بود [۳۴ و ۳۵].

### ۳-۳-۳ فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیونی

#### ABTS•

در جدول ۱ فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS• هر جز غشای فرآپالایش نشان داده شده است. نتایج نشان داد که تمامی اجزا دارای قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS• هستند و بالاترین میزان مهارکنندگی مربوط به جز کوچکتر از ۳ کیلودالتون و برابر با  $295/81 \pm 2/05 \mu\text{mol TE/g}$  و پایتترین قدرت مهارکنندگی به جز بزرگتر از ۱۰۰ کیلودالتون و برابر با  $115/24 \pm 5/48 \mu\text{TE/g}$  بود. این نتایج با پژوهش های ژوانگ و همکاران (۲۰۱۳) همخوان خوبی داشت. این پژوهشگران گزارش نمودند که جز کوچکتر از ۱۰ کیلودالتون آبکافته ذرت دارای قدرت مهاررادیکال کاتیون ABTS• بیشتری نسبت به جزیهای با وزن مولکولی بالاتر است. همچنین سایر محققان گزارش نمودند که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون آبکافته

### ۳-۴-۴ قابلیت ممانعت کنندگی ACE

فعالیت نسبی ممانعت کنندگی ACE در تمامی فرکشن های



مونوسیستونز و باسیلوس را داشتند و آبکافته های جز F4 (آبکافته های با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰۰ کیلودالتون) بر هیچ باکتری اثر بازدارندگی نداشت. از لحاظ کمی پیتیدها فعالیت متفاوتی از خود نشان ندادند و نتایج نشان داد که باکتری استافیلوکوکوس اورئوس بیشترین مقاومت را در برابر پیتیدهای گلوتن گندم دارد و باکتری لیستریامونوسیستونز نیز دارای بیشترین حساسیت به این پیتیدهای تولیدی از گیاه کارده می باشد.

اکثر پیتیدها با ایجاد منفذی در غشا و تداخل در عبور و مرور یون ها و مواد غذایی می توانند مستقیماً اثر میکروبی خود را اعمال نمایند. مکانیسم های مولکولی و نفوذ در غشا در پیتیدهای مختلف ممکن است تحت تاثیر پارامترهایی چون توالی اسیدآمین، ترکیب چربی های غشا و غلظت پیتید قرار گیرد [۳۹]. پیتید های ضدباکتریایی معمولاً از کمتر از ۵۰ (۵۰-۱۲) اسیدآمین تشکیل شده اند، دارای وزن مولکولی ۱۰-۵ کیلودالتون بوده و واجد ویژگی های کاتیونی و آمفی پاتیک می باشند. علیرغم ساختارهای گوناگون، وجود بار مثبت در بسیاری از پیتیدها آن ها را قادر به اتصال به غشای باکتریایی می نماید. [۳۹]. پیتیدهای ضد میکروب از طریق قسمت های با بار مثبت خود با قسمت های با بار منفی موجود در غشای سلول های باکتری برهمکنش برقرار کرده و از این طریق در سطح غشای سلول هدف تجمع می یابند. درجه آبگریزی سطحی پیتیدها نیز نقش موثری در بروز ویژگی های ضدباکتریایی آنها ایفا می نماید، زیرا بخش های آبگریز مسئول برقراری ارتباط با اجزای آبگریز در غشا هستند. از طریق این برهمکنش با غشای سلولی بازآرایی های عمده ای در ساختار اتفاق می افتد که ممکن است نتیجه برقراری اتصال میان پیتید و چربی، تغییر مکان پیتید در طول غشای سلولی و برقراری برهمکنش با اهداف داخل سلولی باشد [۴۰]. از سوئی، قدرت ضدباکتریایی پروتئین های هیدرولیز شده با افزایش درجه آبگریزی سطحی تا یک حد آستانه افزایش می یابد و پس از آن افزایش بیشتر در درجه آبگریزی سطحی به سبب دimer شدن پروتئین ها در محلول آبی منجر به کاهش اثر ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده خواهد شد، چرا که دimerهای پروتئینی قادر به عبور از دیواره سلولی برای واکنش با غشای هدف را نخواهند بود [۴۲]. بنابراین فقدان اثر ضدباکتریایی در نمونه F4 در این تحقیق به سبب درجه آبگریزی

دارای فعالیت ممانعت کنندگی بالاتری نسبت به سایرین می باشد. جز F2 با داشتن  $0/48 \pm 86/3$  فعالیت ممانعت کنندگی دارای بالاترین قابلیت و پس از آن F3 با داشتن  $3/11 \pm 81/3$  توانایی مهار این آنزیم ACE را داشت (هر چند که تفاوت معناداری بین F2, F3 وجود نداشت) که این امر را می توان به سبب دارا بودن محتوای آمینواسیدی آبگریز و آروماتیک بالا در این دو جز دانست. جز F1 با  $24/4 \pm 0/55$  دارای کمترین قابلیت مهار کنندگی می باشد. از این نتایج می توان بیان داشت که پیتیدهای حاصل در دو جز F2 و F3 با برقراری پیوندهای هیدروژنی، آبگریزی و واندروالسی قابلیت اتصال به جایگاه فعال آنزیم ACE را داشته و با مکانیسم های متفاوتی موجب کاهش فعالیت این آنزیم شده است. نتایج به دست آمده در مقایسه با نتایج سایر محققان نشان می دهد که آبکافته های حاصل از پروتئین گلوتن با استفاده از عصاره گیاه کارده دارای قابلیت بهتری جهت کاهش فشار خون می باشد. Jiang و همکاران (۲۰۱۸) قابلیت ممانعت کنندگی از ACE پروتئین گردوی آبکافت شده با پاپائین را حدود ۲۰ درصد گزارش نموده اند [۳۷]. Cheung و همکاران (۲۰۰۹) گزارش دادند که آبکافته های حاصل از پروتئین جو با استفاده از آنزیم ترمولایزین حدود ۹۰ درصد می باشد [۳۸].

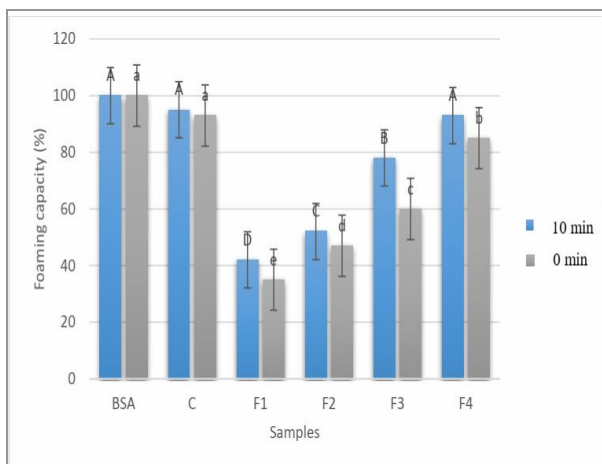
### ۳-۵- قابلیت ضد میکروبی

حداقل غلظت مهار کنندگی پیتیدهای زیست فعال تولید شده توسط عصاره کارده بر روی پروتئین گلوتن بر روی باکتری های اشریشیاکلی، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیستونز و باسیلوس سرئوس در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده پروتئین گلوتن (نمونه شاهد) اثر بازدارندگی بر هیچ یک از باکتری ها نداشت، در حالیکه آبکافته های F1 (با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون) دارای قدرت بازدارندگی بر تمامی باکتری های مورد بررسی بود. آبکافته های جز F2 (پیتیدهای با وزن مولکولی بین ۳ و ۳۰ کیلودالتون) نیز دارای اثر بازدارندگی بر اشریشیاکلی، لیستریا و باسیلوس سرئوس و استافیلوکوکوس اما با غلظت های بیشتری نسبت به F1 داشتند. پیتیدهای جز F3 (آبکافته های با وزن مولکولی بین ۳۰ و ۱۰۰ کیلودالتون) تنها اثر بازدارندگی بر اشریشیاکلی و لیستریا



### ۳-۸- قابلیت کف کنندگی

بالاترین قابلیت کف‌کنندگی مربوط به نمونه استاندارد (سرم آلبومین گاوی) می‌باشد و پس از آن نمونه های شاهد (گلو تن آبکافت شده) (۹۵ درصد)، جز F4 (۹۳ درصد)، جز F3 (۷۸ درصد)، جز F2 (۵۲ درصد) و کمترین میزان هم مربوط به جز F1 (۴۲ درصد) می باشد (شکل ۵). Alolod و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که قابلیت تشکیل کف آبکافته های حاصل از ژلاتین پوست ماهی یونیکور به میزان ۵/۸۳ درصد بالاتر از نمونه شاهد در این تحقیق بود [۴۶]. در این تحقیق قابلیت تشکیل کف به وزن مولکولی آبکافته‌ها وابسته می باشد، همچنانکه ضعف در تشکیل کف در آبکافته های با وزن مولکولی پایین مشاهده شد. آبکافته های با وزن مولکولی بالا (جز های F3, F4) و نمونه کنترل به سبب توانایی در بازسازی سطح بین هوا و آب، نیازی به ایجاد نیرو جهت تشکیل ساختار کف ندارد [۴۸].

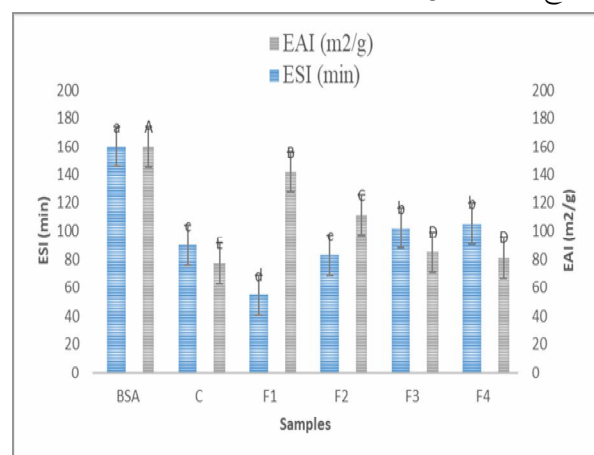


**Fig 5** Foaming properties of gluten hydrolysate fractions. Concentration of gluten fraction hydrolysates was 1 mg/ml.

نتایج حاصل از پایداری کف پس از ۱۰ دقیقه نشان از پایداری کف در نمونه های شاهد و آبکافته‌های با وزن مولکولی بالاتر می‌دهد. پایداری کف تشکیل شده در تمامی نمونه‌ها تفاوت معناداری داشت ( $p < 0.05$ ). در نمونه شاهد میزان ۹۳ درصد بود که به میزان ۸۵ درصد در نمونه F4 رسید و همینطور به میزان ۶۰ درصد در نمونه F3 کاهش یافت. همچنین روند مشابهی را Alolod و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند [۴۶]. کاهش پایداری کف در نمونه های آبکافته‌های با وزن مولکولی پایین به سبب برهمکنش

که این محقق بیان نمود که با کاهش وزن مولکولی، میزان آبریزی بالایی مشاهده می‌شود که منجر به افزایش EAI خواهد شد که ممکن است به سبب افزایش کمی تعداد گلبول های چربی کوچک و سالم که منجر به واتابی و بازآرایی مجدد مولکول در حدواسط امولسیون شده و منجر به افزایش تعداد سطوح روغن در آب و در نهایت قابلیت تشکیل امولسیون را افزایش می‌دهد [48].

پایداری امولسیون در نمونه ی استاندارد از سایر آبکافته ها بیشتر (min ۱۶۰) بود (شکل ۴). میزان پایداری امولسیون در نمونه شاهد ۹۰ min بود و برای سایر نمونه ها با افزایش وزن مولکولی میزان پایداری امولسیون یک افزایش معناداری یافت. مولکول‌ها و پروتئین‌های با وزن مولکولی پایین به سبب اینکه دارای سطح خارجی کمتری نسبت به پروتئینهای سنگین تر دارند، به خوبی نمی‌توانند موجب ایجاد یک محیط ویسکوز کنند و همین امر موجب کاهش پایداری امولسیون خواهد شد [۴۹]. مولکولهای کوچک تر کارایی کمتری در کاهش تنش بین سطحی و از این رو امولسیون این ترکیبات با سرعت بالاتری شکسته خواهد شد. Alolod و همکاران (۲۰۱۹) بیان داشتند که ویژگی های امولسیونی آبکافته های ژلاتینی پوست ماهی یونیکور به میزان زیادی به غلظت و اندازه پپتیدها وابسته است. پپتیدهای کوچک تر سریعتر به فضای بین سطحی آب-روغن حرکت کرده و امولسیون را تشکیل می‌دهند اما امولسیون هایی که پایداری بالایی ندارند که این امر به سبب کاهش تعادل آبریزی-آبدوستی در دو طرف سطوح امولسیون می‌باشد [۴۶].



**Fig 4** Emulsifying properties of gluten hydrolysate fractions. Concentration of gluten fraction hydrolysates was 2 mg/ml

برای فعالیت این آنزیم، سازوکار حمله چندگانه می باشد و حرکت کشویی است که آنزیم بدون جدا شدن از پیش ماده در طول آن حرکت نموده و واحدهای قندی را آزاد می نماید. برهمکنش میان نشاسته و آنزیم نسبتاً ضعیف است و از طریق پیوندهای هیدروژنی و واندروالسی رخ می دهد. پیشنهاد شده است که پپتیدهای شناسایی شده در این پژوهش دارای اسیدهای آمینه پرولین در انتهای آمینی و کربوکسیلی بودند [۵۰]. محققان بیان داشتند که اسیدهای آمینه ایزولوسین (I)، پرولین (P)، والین (V) و لوسین (L) نقش مهمی در قابلیت مهارکنندگی آلفا آمیلاز دارد که با توجه به آمینواسیدهای موجود در فرکشن F1 می توان این قابلیت مهارکنندگی را به محتوای آمینواسیدی این فرکشن نسبت داد [۵۰]. پژوهشگران بیان داشتند که دو اسید آمینه لوسین و پرولین در آبکافته های حاصل از پروتئین سویا نقش مهمی در جلوگیری از افزایش قند خون دارد. وجود ۳۷/۲۵ درصد اسید آمینه گلوتامین و گلوتامیک اسید نقش مهمی در اثر ضددیابتی این فرکشن دارد. محققان اذعان داشتند که قابلیت ممانعت کنندگی و ضددیابتی پروتئین لوبیای سیاه به سبب وجود آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، والین و سرین می باشد. پروتئین لوبیا سیاه به سبب غنی بودن از گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لوسین، ترئونین و سرین قابلیت مهارکنندگی بالایی دارد [۴۸].

#### ۴- نتیجه گیری

چهار جز آبکافته گلوتن حاصل از عصاره گیاه کارده خالص سازی شده در این تحقیق به صورت موفقیت آمیزی تولید گردید. این آبکافته ها خواص بیولوژیکی (ضدمیکروبی و ضداکسایشی و کاهش دهنده گی فشارخون) و خواص عملکردی (حلالیت، تولید و پایداری کف و خواص امولسیفایری) از خود نشان دادند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که آبکافته های حاصل از گلوتن که از ضایعات جانبی کارخانجات تولید نشاسته می باشد، پروتئین با استفاده از آنزیم به طور نسبی خالص سازی شده گیاه کارده قابلیت بالایی به عنوان یک بهبوددهنده در فرمولاسیون مواد غذایی، دارویی و حتی پزشکی می توان استفاده نمود.

کمتر پروتئین- پروتئین ها، قادر به تشکیل فیلم و لایه مناسبی جهت جلوگیری از خروج هوا از سلول های کف نخواهد بود و این امر موجب کاهش پایداری کف خواهد گردید [۵۰].

#### ۳-۹- قابلیت بازدارندگی آلفا گلوکوزیداز

نتایج نشان داد که تمامی فرکشن های آبکافته های تولیدی در غلظت به کار رفته، دارای اثر بازدارندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز روده موش بودند. میزان بازدارندگی هر ۴ چهار آبکافته دارای اختلاف معنادار با یکدیگر بودند. بالاترین میزان بازدارندگی به جز آبکافته ی بین ۳۰ تا ۱۰۰ کیلودالتون (F3) با مقدار  $0.12 \pm 49.37$  درصد نشان داد. قابلیت بازدارندگی فرکشن بزرگتر از ۱۰۰ کیلودالتون (F4) به میزان  $0.33 \pm 25.15$  کمترین بود و با آبکافته های F1 ( $0.11 \pm 24.70$ ) و F2 ( $0.26 \pm 25.44$ ) اختلاف معناداری نشان نداد. اختصاصی بودن این آنزیم و حضور آمینواسیدهای هیدروکسیلی و آبگریز در این پپتید، دلیل بالاتر بودن قابلیت بازدارندگی این فرکشن نسبت به سایر فرکشن ها می تواند باشد [۵۰]. این آمینواسیدها (پرولین، لوسین، ایزولوسین) با اتصال به جایگاه های فعال این آنزیم موجب بازدارندگی این آنزیم می شوند. بررسی الگوهای فعالیت ساختاری نشان می دهد که آلفا گلوکوزیداز و پپتیدهای مهارکننده بیشتر از طریق پیوندهای هیدروژنی و تمایلات الکتروستاتیک برهمکنش می کنند [۳۷]. حضور اسیدهای آمینه قلیایی، پیوندهای هیدروژنی و اسیدهای آمینه حاوی گوگرد، به طور قابل توجهی توانایی پپتیدها را برای مهار آلفا گلوکوزیداز افزایش می دهد [۵۰].

#### ۳-۱۰- قابلیت بازدارندگی آلفا-آمیلاز خوکی

نتایج نشان داد که تمامی آبکافته ها (غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) قابلیت مهارکنندگی آنزیم آمیلاز را دارند. در فرکشن های تولیدی، فرکشن F1 (کمتر از ۳ کیلودالتون) با  $1.13 \pm 79.19$  درصد ممانعت کنندگی بیشترین و فرکشن F4 (بزرگتر از ۱۰۰ کیلودالتون)  $2.92 \pm 40.07$  کمترین میزان ممانعت کنندگی را داشتند. فرکشن F2 با  $2.33 \pm 57.83$  درصد ممانعت کنندگی و F3 با  $0.95 \pm 44.25$  درصد ممانعت کنندگی اندازه گری شد. محققان گزارش کردند که فرکشن کوچکتر از ۲ کیلودالتون بیشترین اثر بازدارندگی به آنزیم آلفا آمیلاز را داراست. سازوکار پیشنهادی

## ۵- منابع

- Casein Hydrolysates and Their Application in Ground Beef. *J. Agric. Food. Chem.* 52(26), 8208-8213.
- [9] Shahidi, F., Ambigaipalan, P. 2017. Bioactive peptides from shrimp shell processing discards: Antioxidant and biological activities. *Journal of Functional Foods.* 34, 7-17.
- [10] Bernardi, D.M., Deparis, L.D., Dieterich, F., Silva, F.G.D., Boscolo, W.R. 2016. Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity. *Food Science and Technology.* 34(6), 709-716.
- [11] Timon, M., Andres, Ana. Otte, Jeanette, Petron, Maria. 2019, Antioxidant peptides (<3 kDa) identified on hard cow milk cheese with rennet from different origin. *Food Research International.* 120, 643-649.
- [12] Piovesana, S., Capriotti, A.L., Cavaliere, C. *et al.* 2018. Recent trends and analytical challenges in plant bioactive peptide separation, identification and validation. *Anal Bioanal Chem* 410, 3425-3444.
- [13] Moritani, C., Kawakami, K., Fujita, A., Shimoda, H., Hatanka, T. Tsuboi, S. 2018. Isolation of activating factors of serotonin *N*-acetyltransferase from rice peptides. *Journal of Functional Foods.* 41, 148-154.
- [14] Wu, Jianping, Ding, X. 2002. Characterization of inhibition and stability of soy-protein-derived angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides. 35(4), 367-375.
- [15] Aluko, R.E., Pownall, T.L., Udenigwe, C. 2010. Amino Acid Composition and Antioxidant Properties of Pea Seed (*Pisum sativum* L.) Enzymatic Protein Hydrolysate Fractions. *J. Agric. Food. Chem.* 58(8), 4712-4718.
- [16] Shand, P.J., Marambe, P.W., Wanasundara, J.P.D. 2008. An In-vitro Investigation of Selected Biological Activities of Hydrolysed Flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) Proteins. 85, 1155-1164.
- [17] Farahmandfar R, Ramezanizadeh MH. 2018. Oxidative stability of canola oil by *Biarum bovei* bioactive components during storage at ambient temperature. *Food Sci Nutr.* 6:342-347.
- [18] Gheisari, H.R., Golkari, H., Shekarforoush, S.S., Aminlari, M., Raeisi, M. 2017. Possibility of *Biarum carduchorum* application as
- [1] FitzGerald, R; Dermiki, M., 2020, Physicochemical and gelling properties of whey protein hydrolysates generated at 5 and 50 °C using Alcalase® and Neutrase®, effect of total solids and incubation time, *International Dairy Journal*, 110, 104792.
- [2] Montone, C. M., Capriotti, A, L., Cavaliere, Chiara. La Barbera, Giorgia., Piovesana, S., Chiozzi, R. Z., Lagana, Aldo. 2018, Characterization of antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides derived from cauliflower by-products by multidimensional liquid chromatography and bioinformatics, *Journal of Functional Foods*, 44, 40-47.
- [3] Peng, J., Zheng, L., Yu, Huichao., Wei, Hongkui., Xing, Qian., Zou, Yi., Zhou, Yuanfei. 2018. Antioxidative peptides of hydrolysate prepared from fish skin gelatin using ginger protease activate antioxidant response element-mediated gene transcription in IPEC-J2 cells. *Journal of Functional Foods.* 51, 104-112.
- [4] Neves, A., C, P.A. Harnedy, M.B.O. Keeffe, J. Richard Bio active peptides from Atlantic Salmon (*Salmo salar*) with angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory , and antioxidant. 2017. *Food Chemistry.* 218(1), 396-405.
- [5] Feng, L.; Wang, X.; Peng, F.; Liao, J.; Nai, Y.; Lei, H.; Li, M.; Xu, H. Walnut Protein Hydrolysates Play a Protective Role on Neurotoxicity Induced by D-Galactose and Aluminum Chloride in Mice. *Molecules* 2018, 23, 2308.
- [6] Chen, L., Eckert, E, Han, J., Swallow, K., Tian, Z., Parra, M. 2019. Effects of enzymatic hydrolysis and ultrafiltration on physicochemical and functional properties of faba bean protein. 96 (4).
- [7] Su, Yujie., Gao, Y., Li, J., Chang, C., Wang, Chenying., Yang, Yanjun. 2019. Effect of enzymatic hydrolysis on heat stability and emulsifying properties of egg yolk. *Food Hydrocolloids.* 97, 105224.
- [8] Diaz, M., Decker, E. A., 2004. Antioxidant Mechanisms of Caseinophosphopeptides and

- Technology. 44(2), 407-413.
- [29] Je, J.Y., Aih, C.B., Jeon, Y.J., Kim, Y. T. 2012. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from salmon byproduct protein hydrolysate by Alcalase hydrolysis. *Process Biochemistry*. 44(12), 2240-2245.
- [30] Hashim, M.M., Mingsheng, D., Iqbal, MF and Xiaohong, C. (2011). Ginger rhizome as a potential source of milk coagulating cysteine protease. *Journal of Phytochemistry*, 72(6): 458-464.
- [31] Chitpinyol, S. and Crabbe, M.J.C. (1998). Chymosin and aspartic proteinases. *Journal of Food Chemistry*, 61(4): 395-418.
- [32] Kumar, A., Sharma, J., Mohanty, A.K., Grover, S. and Batish, V.K. (2006). Purification and characterization of milk Clotting enzyme from goat (*Capra hircus*). 145(1): 108-113.
- [33] Rahali, V., Chobert, J. M., Haertlé, T. and Guéguen, J., 2000. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of b-lactoglobulin: Characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Nahrung/Food*, 44, 89-95.
- [34] Chi, C. F., Cao, Z. H., Wang, B., Hu, F. Y., Li, Z. R., & Zhang, B. (2014). Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish Mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19, 11211-11230.
- [35] Wu, R., Wu, C., Liu, D., Yang, X., Huang, J., Zhang, J., & He, H. (2018). Antioxidant and anti-freezing peptides from salmon collagen hydrolysate prepared by bacterial extracellular protease. *Food Chemistry*, 248, 346-352.
- [36] Ngoh YY, Gan CY. 2016. Enzyme-assisted extraction and identification of antioxidative and  $\alpha$  amylase inhibitory peptides from Pinto beans (*Phaseolus vulgaris* cv. Pinto). *Food Chemistry*. 1(190), 331-337.
- [37] Wang, C.; Tu, M.; Wu, D.; Chen, H.; Chen, C.; Wang, Z.; Jiang, L. Identification of an ACE-Inhibitory Peptide from Walnut Protein and Its Evaluation of the Inhibitory Mechanism. *Int. J. Mol. Sci.* 2018, 19, 1156.
- [38] Cheung IW, Nakayama S, Hsu MN, Samaranyaka AG, Li-Chan EC. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory activity of hydrolysates from oat (*Avena sativa*) proteins by in silico and in vitro analyses. *J Agric Food Chem.* 2009. 57(19) : 9234-42.
- [39] Shai, Y. 2002. From innate immunity to vegetable rennet in production of Iranian white cheese. *Journal of Food Hygiene*, 7, 27.
- [19] Shekarforoush, S,S., Raeisi, M., Aminlari, M., Gheisari, H,R., Golkari, H. 2017. Study on physico-chemical properties of emulsion type sausage produced with aqueous extract of *Biarum carduchcorum* tenderized meat. *Journal of Food Hygiene*, 7, 26.
- [20] Wang, W., Liu, Q.J., Cui, H. (2007). Rapid desalting and protein recovery with phenol after ammonium sulfate fractionation. *Electrophoresis*, 28 (14): 2358-60.
- [21] Homaei, A., Etemadipour, R. 2015. Improving the activity and stability of actinidin by immobilization on gold nanorods. *International Journal of Biological Macromolecules*. 72, 1176-1181.
- [22] Rezaei, Karamatollah, Alavi, F., Jamshidian, Mjid. 2019. Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase. 314-322.
- [23] Popineau, Yves., Huchet, Blandine, Larre, Colette and Berot, Serge. 2002. Foaming and Emulsifying Properties of Fractions of Gluten Peptides Obtained by Limited Enzymatic Hydrolysis and Ultrafiltration. *Journal of Cereal Science*. 35, 327-335.
- [24] Tsumara, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., & Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie-Food Science and Technology*, 38, 255-261.
- [25] Pearce, K. N., & Kinsella, J. E. (1978). Emulsifying properties of proteins: Evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26, 716-723.
- [26] Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, 285-293.
- [27] Wang, B., Yu, C. G., Luo, H. Y., Qu, Y. L., & Yang, L. Y. (2010). Studies on the preparation and antioxidant properties of enzymatic hydrolysate from *Dasyatis akajei* by papain. *Food Science and Technology International*, 10, 113-118.
- [28] Gimenez, B., Aleman, A., Guillen, M.C. 2011. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *Lwt- Food Science and*

- Aquatic Food Product Technology, 25, 616–632.
- [46] Alolod, L., Garner, A., Nuñal, N. S., Nillos, G., Mae, G., & Peralta, P. J. (2019). Bioactivity and functionality of gelatin hydrolysates from the skin of Oneknife Unicornfish (*Naso thynnoides*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28, 1013–1026.
- [47] Viji, P., Phannendra, T. S., Jesmi, D., Rao, B. M., Das, D. P. H., & George, N. (2019). Functional and antioxidant properties of gelatin hydrolysates prepared from skin and scale of Sole Fish. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28, 976–986.
- [48] Hajfathalian, M., Ghelichi, S., García, M. P. J., Moltke, S. A. D., & Jacobsen, C. (2018). Peptides: Production, bioactivity, functionality, and applications. *Critical Review. Food Science Nutrition*, 58, 3097–3129.
- [49] Razali, A. N., Amin, A. M., & Sarbon, N. M. (2015). Antioxidant activity and functional properties of antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food Research Journal*, 22, 651–660.
- [50] Halim, N. R. A., Yusof, H. M., & Sarbon, N. M. (2016). Functional and bioactive properties of fish protein hydrolysates and peptides: A comprehensive review. *Trends in Food Science and Technology*, 51, 24–33.
- denovo designed antimicrobial peptides. *Curr Pharm Des.* 8(9): 715-725.
- [40] Taha, S.F., Mohamed, S.S., Wagdy, M.S., and Mohamed, F.G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal.* 21(5), 651-658.
- [41] Théolier, J., Fliss, I., Jean, J., and Hammami, R. 2014. Antimicrobial peptides of dairy proteins: from fundamental to applications. *Food Rev Int*, 30(2): 134-154.
- [42] Cheng, X., Tang, X., Wang, Q., and Mao, X.Y. 2013. Antibacterial effect and hydrophobicity of yak  $\kappa$ -casein hydrolysate and its fractions. *Int Dairy J.* 31 (2): 111-16.
- [43] Pritchard, S.R., Phillips, M., and Kailasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial Cheddar cheese. *Food res int.* 43(5): 1545-1548.
- [44] Mahdabi, M., & Hosseini, S. S. P. (2018). A comparative study on some functional and antioxidant properties of kilka meat, fishmeal, and stick-water protein hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 27, 844–858.
- [45] Chi, C., Hu, F., Li, Z., Wang, B., & Luo, H. (2016). Influence of different hydrolysis processes by trypsin on the physicochemical, antioxidant, and functional properties of collagen hydrolysates from *Sphyrna lewini*, *Dasyatis akjei*, and *Raja porosa*. *Journal of*





## Production of wheat gluten bioactive peptides by *Biarum carduchorum* extract

Khosravi, F. <sup>1</sup>, Azizi, M. H. <sup>2\*</sup>, Mousavi Nadoshan, R. <sup>3</sup>, Rabani, M. <sup>3</sup>

1. PhD Student, Department of food science and Technology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.
2. Professor, Department of food Science and Technology, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor, Department of food science and Technology, Islamic Azad University, Tehran North Branch, Tehran, Iran.

ARTICIE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2020/ 12/ 27 Accepted 2021/ 06/ 07</p> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Biarum carduchorum, Hydrolysate, Gluten, Biological properties, Functional properties.</p> <p><b>DOI:</b> 10.52547/fsct.18.117.155</p> <p>*Corresponding Author E-Mail: azizit_m@modares.ac.ir</p>	<p>Production of bioactive peptides from wheat gluten by <i>Biarum carduchorum</i> extract and the biological and functional capacity were investigated in the present study. Results showed that <i>Biarum carduchorum</i> have the highest protease activity in (5, 45) pH and temperature, respectively. All fractions obtained (F1&lt;3, F2: 3-30, F3: 30-100, F4&gt; 100 kDa) exhibited antioxidant activity, However F1 registered the highest DPPH scavenging activity (65.85±2.64 μmol TE/g) and reducing power ABTS (295.81±2.05 μmol TE/g) and F4 have the lowest antioxidant activity. The highest ACE-inhibitory activity was F2 (86.3%) and F3 (76.3%). F1 Fractions showed an appropriate inhibitory effect on tested bacteria while total extract of F4 had no inhibitory activity against pathogens. Functional properties suggested that the solubility of hydrolysates in all samples decreased in acidic pH but as molecular weight of hydrolysates fractions increased, solubility of hydrolysate in pH (4, 7) increased significantly. Emulsifying activity index decreased and foaming and emulsion stability index increased. It seems that hydrolysates of gluten, by-product of starch industry, have a good potential biotechnological alternative for the industry.</p>