بررسی تاثیر pH بر خصوصیات بافتی گلوتن، گلیادین و گلوتین طبیعی و استیله شده توسط روش خوشه‌ای چند متغیره

الهه عابدی[1*]، مهسا مجذوبی[2]

۱- استادیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فسا
۲- دانشیار بخش علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شیراز

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

گلوتن گندم یکی از مهمترین منابع پروتئینی گیاهی نسبتا ارزانی است که از گلیادین و گلوتنین تشکیل شده است. طبیعت آبگریز و پائین بودن حلالیت گلوتن کاربرد آن را در تهیه بسیاری از محصولات غذایی و غیر غذایی محدود کرده است. به منظور افزایش کاربرد گلوتن ، این پروتئین ابتدا به اجزاء اصلی سازنده خود یعنی گلیادین و گلوتنین تجزیه شد و سپس گلوتن، گلیادین و گلوتنین توسط استیک انهیدرید استیله شدند. در مرحله بعد خواص رئولوژیکی آنها در مقایسه با نمونه‌های کنترل هر یک در سه pH ۳، ۶ و ۹ بررسی گردید. میزان استیله شدن پروتئین ها در pH های مختلف متفاوت بود و بالاترین میزان در هر سه pH مربوط به گلوتنین بود ، در حالی‌که گلیادین کمترین میزان استیله شدن را داشت. در pH ۳ مولکول‌های پروتئینی د- استیله شدند. در گلوتن و گلوتنین استیله شده به صورت معنی داری ($p<0/05$) سفتی، قابلیت صمغی بودن، مقاومت به جویدن و الاستیسته بافت در pH های ۳ و ۶ کاهش یافت.

کلید واژگان: استیله کردن، خصوصیات بافتی، pH، پروتئین، روش خوشه‌ای چند متغیره

* مسئول مکاتبات: Elaheabedi1389@gmail.com

۱- مقدمه

بر اثر اختلاط گلیادین و گلوتنین توسط پیوند دی سولفیدی و سایر پیوندها، جسم ویسکوالاستیکی به نام گلوتن باقی می‌ماند [۱ و ۲]. گلوتن گندم به دلیل اندازه مولکولی بزرگ، دانسیته بار کم و دارا بودن اسیدآمینه‌های آبگریز در محلول‌های آبی غیر قابل حل می‌باشد که می‌توان با اصلاح گلوتن از آن در تهیه غذای بچه، غلات صبحانه‌ای، اسنک‌های فوری و محصولات گوشتی استفاده نمود [۳.] یکی از راه‌های قدیمی بهبود خواص پروتئین‌ها، اصلاح آنها با استفاده از مواد شیمیایی می‌باشد، اصلاح شیمیایی پروتئین‌ها، عبارتند از ایجاد تغییراتی در مولکول‌های پروتئینی با استفاده از مواد شیمیایی خاص به طوریکه با توجه به خصوصیات آن ماده شیمیایی و محل تأثیر گذاری آن بر پروتئین، تغییراتی در ویژگی‌های آن حاصل شود. مواد شیمیایی مصرفی باید جزء گروه مواد شیمیایی مجاز[1] برای مصرف غذایی باشند و در حدی استفاده شوند که برای بدن سمیتی نداشته باشند، بعلاوه نبایستی بو، رنگ و طعم نامطلوبی را در محصول ایجاد کنند، ولی باعث تاثیر بر یک یا چند نیروی غیر کووالانس می‌شود. اصلاح پروتئینهای گیاهی بدلیل ارزانی و قابلیت جایگزینی پروتئین اصلاح شده با منابع حیوانی اهمیت بسیاری دارد [٤]. یکی از روش‌های اصلاح شیمیایی گلوتن تغییر ساختمان آن به کمک استیک انهیدرید است. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، در این عمل گروه ε- آمینی لایزین مکان اصلی برای این عمل محسوب می‌شود. هر چند محتوی لایزین آنقدر بالا نیست ولی برای اصلاح ساختار گلوتن بسیار موثر و کافی عمل می‌کند [۳]. گروه استیل بدلیل داشتن ساختاری با بار الکتریکی منفی بین زنجیره‌های پروتئین قرار می‌گیرد و نیز از طریق دافعه درون و بین مولکولی باعث باز شدن بیشتر تاخوردگی پروتئین می‌شود و با جلوگیری از برهم کنش پروتئین-پروتئین باعث برهم کنش بیشتر آب - پروتئین می‌شود [۵]. از مزایای دیگر عمل استیله کردن قابل برگشت بودن آن می‌باشد که طی هیدرولیز به وسیله آنزیم‌های تریپسین و پانکراتیک، گروه آسیل به راحتی از گروه ε- آمینی لایزین جدا شده و لایزین دوباره در دسترس بدن قرار می گیرد و به دلیل باز شدن تا خوردگی مولکول پروتئین و حساس شدن نسبت به آنزیم های پروتئولایتیکی، قابلیت هضم گلوتن افزایش می‌یابد[٦ و ٧].

1. Generally Recognized as Safe (GRAS)

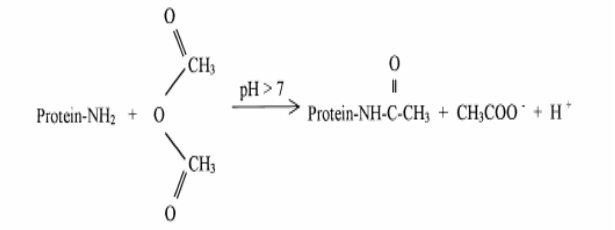

Fig 1 Acetylation of protein compounds [7]

با توجه به در دسترس بودن گلوتن، سادگی تولید آن به عنوان یک محصول جانبی در کنار تولید نشاسته گندم و نیز قیمت نسبتاً ارزان این پروتئین گیاهی نسبت به منابع پروتئینی حیوانی، ارائه روش‌هایی جهت اصلاح ساختار گلوتن به منظور افزایش کاربرد آن در تهیه محصولات غذایی و غیرغذایی امری ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی اجزای سازنده گلوتن (گلیادین و گلوتنین) نیز دارای خواص عملکردی منحصر به فرد می‌باشند. لذا می‌توان با جداسازی این اجزا و بررسی خصوصیات آنها، کاربردهایی را برای آنها در نظر گرفت. هدف از این تحقیق جداسازی گلوتن به جزای سازنده آن گلیادین و گلوتین و سپس استیله کردن این سه پروتئین می‌باشد. در نهایت تاثیر pH روی خصوصیات بافتی پروتئین های طبیعی و استیله کردن بررسی شد و مقایسه کردن توسط مدل تحلیل خوشه‌ای به عنوان یکی از روش های چند متغیره انجام گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

پودر گلوتن از شرکت فارس گلوکوزین مرودشت خریداری شد که ترکیبات شیمیایی آن شامل ۰/۰۵ ± ٦/٧٪ رطوبت، ۰/٥٦ ± ٨٦/٢٧٪ پروتئین، ۰/۰۳ ± ۱/٦٨٪ چربی، ۰/۰۱ ± ۱/۰٧٪ خاکستر و ۰/٥۳ ± ۱۰/۹٦٪ کربوهیدرات بود که همگی بر اساس وزن خشک می‌باشد و بر اساس استاندارد [٨] AACC تعیین شد.

۲-۱- جداسازی گلیادین و گلوتنین از گلوتن تجاری

برای جداسازی گلیادین وگلوتنین از تفاوت در حلالیت آنها استفاده شد. به این صورت که گلیادین‌ها در اتانول ٦۰٪ محلول بوده ولی گلوتنین‌ها نامحلولند. ۵ گرم گلوتن را با ۳۷۵ میلی‌لیتر اتانول v/v ٦۰٪ مخلوط و به مدت ۲ دقیقه در هموژنایزر قرار داده شد و سپس توسط همزن آهنربایی به

مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد. سوسپانسیون‌ها در g ۱۰۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریوفیوژ شدند. این عمل تا آن حد تکرار شد که مایع رویی شفاف و عاری از گلیادین شد و درنهایت از ترکیب مایع فوقانی هر مرحله گلیادین‌ها بدست آمد، برای تبخیر اتانول‌های باقیمانده از خشک کن با دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. رسوبات حاصل گلوتنین‌های نامحلول در اتانول بودند. سپس هر دو ترکیب به وسیله خشک کن انجمادی[2]، خشک شدند و پس از آسیاب شدن، اندازه ذرات پودرها به کمک الک در محدوده کمتر از ٤۵ میکرون درجه‌بندی شدند [۹].

۲-۲- تولید گلوتن، گلیادین و گلوتنین استیله شده

تولید گلوتن، گلیادین و گلوتنین استیله شده طبق روش Barber و Warthesen انجام شد [۱۰]. برای این منظور ۱۰ گرم گلوتن، گلیادین و گلوتنین با آب به نسبت ۱ به ٤ ترکیب شده و به کمک NaOH ۱ نرمال pH به ۸/۵ رسانده شد و سپس استیک انهیدرید به نسبت وزنی ۱:۱ با پروتئین به مخلوط اضافه شد و دوباره pH به کمک NaOH ۲ نرمال روی pH ۸/۵ تنظیم گردید. این واکنش به مدت یک شبانه روز در دمای اتاق توسط دستگاه همزن آهنربایی ادامه یافت و سپس عمل شستشو و جداسازی پروتئین‌های استیله شده توسط سانتریوفیوژ با دور g ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید و این عمل چندین بار تکرار شد. تمامی مراحل مذکور برای گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد با حذف استیک انهیدرید تکرار گردید.

۲-۳- تعیین میزان استیله شدن

تعیین میزان استیله شدن پروتئین‌ها با روش تری نیترو بنزن سولفونیک اسید طبق روش Majzoobi و همکاران [۱۰] انجام شد. روش TNBS بدین صورت انجام شد که ۱ میلی‌لیتر محلول بی‌کربنات سدیم ($NaHCO_3$) ٤٪ دارای pH ۸/۵ و ۱ میلی‌لیتر از محلول تری نیترو بنزن سولفونیک اسید ۰/۱٪ (pH برابر ۷) را به سوسپانسیون‌های پروتئینی (۲میکرو گرم در میلی‌لیتر) که در شرایط pH های ۳، ٦ و ۹ به مدت ۲ ساعت قرار داده شدند، اضافه گردید و سپس pH نمونه‌ها روی عدد ۷ تنظیم گردید. نمونه‌ها به مدت ۲ ساعت در حمام آب گرم ٦۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند، به صورتیکه شرایط تاریکی فراهم شود و سپس تا دمای اتاق سرد گردیدند. ۱ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات۱۰٪ و ۰/۵ میلی‌لیتر اسید کلریدریک به محلول‌های پروتئینی اضافه شد و میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۳۵ nm در زمان‌های ۱۰ دقیقه (زمان لازم برای آماده سازی نمونه‌ها جهت انجام آزمون اسپکتروفتومتری) و ۲ ساعت تعیین گردید. نمودار استاندارد با استفاده از میزان جذب محلول هایی با غلظت های مختلف از اسید آمینه لایزین تهیه شد. میزان استیله شدن در طول موج ۳۳۵ nm نمونه‌های اصلاح شده بر اساس کاهش در جذب (نسبت به محلول‌های پروتئینی شاهد که فرض شده حاوی ۱۰۰٪ گروه آمینی هستند) بررسی گردید. کاهش جذب محلول‌های استیله شده به دلیل کاهش در گروه آمینی لایزین است که با استیک انهیدرید واکنش داده اند و نسبت به نمونه‌های شاهد قادر به واکنش با گروه های تری نیترو بنزن سولفونیک اسید نبودند. منحنی استاندارد در شکل ۲ نشان داده شده است.

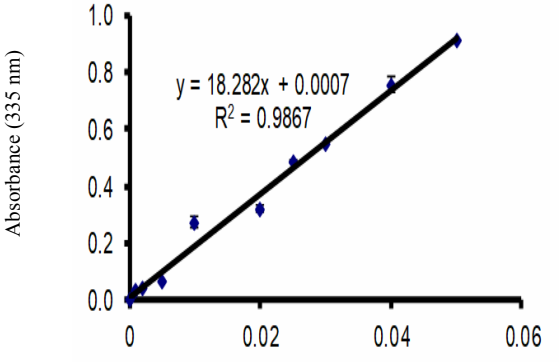

Fig 2 Standard curve of lysine concentration for determining of free amino group

۲-٤- تعیین نقطه ایزوالکتریک تقریبی پروتئین‌ها

غلظت ۵٪ از گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد و استیله شده تهیه شد و به کمک هیدروکسید سدیم ۰/۵ مولار و اسید کلریدریک ۰/۵ مولار، pH پروتئین‌های استیله شده و شاهد در محدوده ٤ تا ۸/٦ با اختلاف ۰/۲ واحد تنظیم گردید. سپس توسط هموژنایزر با دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۳۰ ثانیه پروتئین‌ها کاملاً مخلوط شدند. سوسپانسیون‌های پروتئینی

2. Freeze drier

حاصل با سرعت ۳۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریوفیوژ شده و محلول رویی جدا شد. قابلیت نگهداری آب، از طریق تعیین اختلاف وزن نمونه اولیه از ثانویه نمونه‌های پروتئینی تهیه شده محاسبه گردید. pH ایزوالکتریک نقطه‌ای است که پروتئین‌ها دارای کمترین قابلیت نگهداری آب باشند [۱۰].

۲-۵- قابلیت نگهداری آب ژل پروتئین‌های شاهد و استیله شده

خواص ژله‌ای شدن به کمک روش Chun و همکاران [۱۱] بررسی شد. سوسپانسیون‌هایی از گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد و استیله شده با غلظت ۳۵٪ تهیه شد و ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های تهیه شده در لوله آزمایش ریخته شد و تمام نمونه‌ها در آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت ۱ ساعت حرارت دیدند، سپس بلافاصله نمونه‌ها به داخل آب سرد ٤ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید و برای ۲ ساعت در این شرایط قرار داده شدند. تاثیر pH های ۳، ٦ و ۹ در محلول‌های بافری روی خواص ژله‌ای شدن پروتئین‌ها بررسی شد. جهت تعیین قابلیت نگهداری آب ژل‌های تهیه شده، وزن‌های مشخصی از ژل‌های پروتئین درون لوله سانتریوفیوژ قرار داده و برای ۲۰ دقیقه با سرعت g ۵۰۰ در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) سانتریوفیوژ شدند. علت استفاده از سرعت پایین ممانعت از فروپاشی ژل‌های تهیه شده است. سپس آب از سطح ژل‌ها خارج شد و قابلیت نگهداری آب به صورت نسبت وزن ژل‌ها بعد از سانتریوفیوژ به وزن ژل‌ها قبل از سانتریوفیوژ تعیین گردید.

۲-٦- تعیین خصوصیات رئولوژیکی پروتئین شاهد و استیله شده

این آزمون به کمک روش‌های Agyare و همکاران [۱۲] انجام شد. برای آنالیز بافت ژل از دستگاه بافت سنج (TA-XT2i texture analyzer, Stable Microsystem, Surry, UK) استفاده شد. قطعات استوانه‌ای شکل از جنس پلاستیک فشرده با ابعاد یک در یک سانتی‌متر به عنوان قالب جهت ایجاد یک شکل یکنواخت ژل‌ها استفاده شد. نمونه‌های استیله شده و شاهد با غلظت ۳۵٪، در مقادیر pH ۳، ٦ و ۹ تهیه شدند. نمونه‌ها در آب جوش (۱۰۰ درجه سانتی‌گراد) به مدت یک ساعت حرارت دیده و سپس بلافاصله به درون آب سرد ٤ درجه سانتی گراد منتقل و به مدت ۲ ساعت در این شرایط قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها درون این قالب‌ها پر شده و به مدت یک شبانه روز در دمای ٤ درجه سانتیگراد یخچال نگه داشته شدند. در نهایت نمونه‌ها از درون قالب‌ها خارج گردیده و پس از رسیدن به دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، مورد آنالیز بافتی قرار گرفتند. نمونه‌ها ۲ بار تا ۳۰٪ ارتفاع اولیه با سرعت ثابت ۸ میلیمتر بر ثانیه فشرده شدند، پارامترهایی که تعیین گردید شامل سختی[3] (بیشترین نیرو در اولین فشردگی)، پیوستگی ژل‌ها[4] (نسبت کار فعال انجام شده در نمودار جابجایی- نیرو دوم به نمودار فشردگی اولیه، بدون بعد)، چسبندگی ژل‌ها[5]، حالت فنریت[6] (مسافتی که نمونه بعد از اولین فشردگی برگشته پیدا می‌کند)، صمغی بودن بافت[7] (سختی×پیوستگی)، مقاومت به جویدن[8] (سختی×پیوستگی ×فنریت) بودند. تست کریپ[9] با استفاده از دستگاه بافت سنج روی خمیر پروتئین‌های شاهد و استیله صورت گرفت. قطعات استوانه‌ای شکل از جنس پلاستیک فشرده با ابعاد یک در یک سانتی متر به عنوان قالب جهت ایجاد یک شکل یکنواخت ژل-ها استفاده شد. یک پروب با قطر ۲/۵ سانتیمتر و با سرعت ۰/۲ میلی‌متر بر ثانیه حرکت کرد و تا عمق ۵ میلیمتر در خمیر فرو رفت. این تست نسبت جزء ویسکوز به الاستیک خمیر را نشان داد.

۲-۷- طرح آماری

برای انجام آنالیزهای داده‌ها و بررسی اطلاعات بدست آمده از آزمون‌های مختلف از طرح کاملا تصادفی استفاده شد. به منظور تعیین اختلاف بین میانگین اعداد (حداقل سه تکرار برای هر آزمایش)، پس از آنالیز واریانس[10] از آزمون چند دامنه ای دانکن[11] در سطح ($P<۰/۰۵$) استفاده گردید. در تمام مراحل، تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS 22 صورت گرفت. تحلیل خوشه‌ای یکی از روش‌های چندمتغیره است که جهت خوشه‌بندی مشاهدات یا متغیرهای پژوهش استفاده می‌شود. مشهورترین روش خوشه‌بندی، خوشه‌بندی سلسله مراتبی است که بر اساس مشابهت و دوری مشاهدات یا متغیرها آن ها را خوشه‌بندی می‌کند. شباهت و دوری بر

3. Hardness
4. Cohesiveness
5. Adhessiveness
6. Springiness
7. Gumminess
8. Chewiness
9. Creep
10. Analysis of variance
11. Test Multiple Range Duncans

اساس روش‌های مختلفی مانند اقلیدوسی، اقلیدوسی مربع یا مانهاتن اندازه‌گیری می‌شود. همچنین برای تشکیل خوشه روش‌های مختلفی چون پیوند ساده، پیوند کامل، پیوند متوسط و ward وجود دارد که در عمل از فاصله اقلیدوسی مربع و در این تحقیق از روش ward استفاده گردید [۱۳].

۳- نتایج و بحث

ترکیبات موجود در گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد و استیله شده گندم در جدول ۱ گزارش شده است.

Table 1 Chemical composition of native and acetylated protein *

	Carbohydrate (%)	Ash (%)	Fat (%)	Protein (%)	Moisture (%)
Gluten	10.96± 0.53 ^{d}	1.07±0.01^{e}	1.68±0.03^{b}	86.27±^{b}0.59	6.70±0.05^{a}
Gliadin	8.51±0.34^{e}	1.23±0.04^{d}	1.80±0.03^{a}	88.60±0.63^{a}	5.70±0.03^{c}
Glutenin	11.45±0.55^{c}	0.94±0.03^{f}	1.30±0.02^{d}	86.31±0.84^{b}	6.00±0.02^{b}
AC gluten	14.49±0.81^{a}	1.82±0.03^{b}	1.42±0.03^{c}	82.28±0.37^{e}	5.35±0.03^{e}
AC gliadin	12.20±0.37^{b}	2.13±0.02^{a}	1.25±0.01^{e}	84.42±^{c}0.45	5.01±0.07^{f}
AC glutenin	12.82±0.39^{b}	1.62±0.03^{c}	1.20±0.01^{f}	84.36±0.49^{d}	5.55±0.07^{d}

* Multiple comparison procedure according to Duncan's test was carried out for the data shown in each row and each column, separately. Values are the average of triplicates ± standard deviation. Different small letters in each column indicate significant statistical difference ($p < 0.05$).

همانطور که در جدول ۱ مشاهده می‌شود، میزان رطوبت گلوتن شاهد نسبت به نمونه‌های پروتئینی دیگر بیشتر بود و شاید دلیل این امر خشک شدن گلوتن به صورت تجاری توسط خشک‌کن پاششی باشد، اما نمونه‌های پروتئینی دیگر توسط خشک کن تصعیدی خشک شدند و دارای محتوی رطوبت پایین‌تری بودند. توانایی دستگاه خشک کن تصعیدی در خروج آب از نمونه بیشتر از پاششی می‌باشد، زیرا نمونه‌ها را بدون آسیب حرارتی تا میزان رطوبت پایین خشک می‌کند. در مطالعه‌ای بر روی گلوتن شاهد توسط Zukowska و همکاران [٦] مقدار رطوبت گلوتن ۹٪ گزارش شد. در سال Saberi و همکاران [٥] مقدار رطوبت گلوتن شاهد و استیله شده را ٤/٣٪ و ٤/٥٪ گزارش دادند. مقایسه خاکستر نمونه‌های مختلف پروتئین نشان داد که در بین نمونه‌های شاهد، گلوتنین کمترین و گلیادین بیشترین میزان خاکستر را دارا بود. علت تفاوت، نوع فرایند جداسازی بود. مواد معدنی و آلی گلوتن به همراه گلیادین‌ها محلول در اتانول بوده و به تدریج در طول فرایند جداسازی از گلوتن جدا شده و وارد فاز آبی محلول شده‌اند. با تبخیر اتانول در خشک‌کن تمامی این مواد رسوب کرده و به عنوان ترکیب اصلی گلیادین محسوب شدند. نمونه‌های استیله شده دارای میزان خاکستر بالاتری نسبت به نمونه‌های شاهد بودند. در تحقیقی توسط El-Adawy [١٤] با استیله و سوکسینیله کردن لوبیا و نیز Lawal و همکاران [٣] با استیله و سوکسینیله کردن لوبیای جک به این نتیجه رسیدند که خاکستر نمونه‌های استیله و سوکسینیله شده بیشتر از نمونه‌های شاهد بود. میزان چربی نمونه‌های شاهد بالاتر از نمونه‌های استیله شده بود. در بین نمونه‌های شاهد، گلیادین بیشترین میزان چربی و گلوتنین کمترین میزان چربی را دارا بود. علت این تفاوت، فرایند جداسازی گلیادین از گلوتنین بود. چربی‌ها محلول در اتانول بوده و به همراه گلیادین‌ها از گلوتنین‌ها جدا شدند. با تبخیر اتانول‌ها چربی‌ها در گلیادین‌ها باقی ماندند. در مطالعه ای که توسط Ponte و همکاران [١٥] انجام شد اعلام کرد که میزان لیپید آزاد، باند شده و کل در گلوتن به ترتیب ٠/٥٦، ٥/٨٤ و ٦/٤٠ در گلیادین ٤/٢٩، ٣/٩٠ و ٨/١٩ و در گلوتنین ١/٤٠، ٢/٩٧ و ٤/٣٧ بود. بعضی از چربی‌های قطبی از طریق بر هم کنش‌های آبدوست به گلیادین و آبگریز به گلوتنین متصل‌اند. علت تفاوت در میزان چربی بدست آمده و نتایج افراد دیگر این است که بعضی از انواع چربیها غیر قابل استخراج با حلال-هایی چون دی اتیل اتر و هگزان (حلال‌های غیر قطبی) می-باشند. شاید تفاوت استیله شدن گلیادین و گلوتنین در میزان چربی‌های آنها و ماهیت بسیار هیدروفوب بودن گلیادین نسبت به گلوتن و گلوتنین باشد. نمونه‌های استیله شده دارای چربی کمتری نسبت به نمونه‌های شاهد بودند علت آن است که چربی‌ها حین فرایند شستشوی پروتئینها جدا شده و از محلول پروتئینی خارج شدند. El-Adawy و Lawal و همکاران نیز نتایج مشابهی را بدست آوردند [٣ و ١٤]. مقادیر پروتئین نمونه‌های شاهد بالاتر از نمونه‌های استیله شده بود و شاید دلیل این امر آن باشد که بعد از استیله کردن مقادیری از پروتئین محلول شده و وارد فاز آبی گشت و طی فرایند شستشو جداسازی شدند. Saberi و همکاران [٥] نیز مقدار

پروتئین نمونه شاهد را ۸۷/۳٪ و نمونه استیله شده را ۸۱/۸٪ گزارش کردند.

۳-۱- pH ایزوالکتریک پروتئین‌ها

جدول ۲، pH ایزوالکتریک تقریبی پروتئین‌های شاهد و استیله شده را نشان می‌دهد. گلیادین و گلوتن شاهد دارای pHایزوالکتریک نزدیک به هم و متفاوت از گلوتنین بود. دلیل این امر ترکیب و توالی اسیدهای آمینه‌ای است که در ساختار این سه پروتئین مشاهده می‌شود. میزان اسید آمینه‌های بازی در گلوتنین ٦/٦٪ ، گلوتن ٦/٢٪ و گلیادین ٤/٩٪ و میزان اسیدهای آمینه‌اسیدی در گلوتن ٣٩/٢٪، گلیادین ٤١/٨٪ و گلوتنین ٣٨/٥٪ بود که البته این درصد بستگی زیادی به واریته گندم و شرایط آب و هوایی نیز دارد. pH ایزوالکتریک گلوتن شاهد در این پژوهش ٦/٢ بود و Zukowska آن را ٦/٥-٦ گزارش کرد [٦]. با استیله کردن، pH ایزوالکتریک هر سه پروتئین شاهد کاهش یافت و دلیل آن واکنش گروه استیل با گروه آمینی لایزین و سایر اسیدآمینه‌های بازی است، که منجر به کاهش گروه NH_3^+ شد.

Table 2 Isoelectric point (IEF) of gluten protein subunits

Protein	IEP
N Gluten	6.2 ± 0.2^{b}
AC Gluten	4.4 ± 0.1^{f}
N Gliadin	6.0 ± 0.0^{c}
AC Gliadin	4.6 ± 0.0^{e}
N Glutenin	7.6 ± 0.1^{a}
AC Glutenin	5.8 ± 0.0^{d}

a Multiple comparison procedure according to Duncan's test was carried out for the data shown in each row and each column, separately. Values are the average of triplicates ± standard deviation. Different small letters in each column indicate significant statistical difference ($p < 0.05$).

۳-۲- میزان استیله شدن پروتئین‌ها به روش تری نیترو بنزن سولفونیک اسید

جدول ۳، میزان استیله و دی‌استیله شدن سه پروتئین گلوتن، گلیادین و گلوتنین را در سه pH ۳، ٦ و ۹ به کمک خواندن میزان جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در زمان‌های ۱۰ دقیقه (زمان خواندن جذب نمونه‌ها بلافاصله بعد از تهیه کردن آن ها) و ۲ ساعت نشان می‌دهد. هدف از این کار تعیین میزان پایداری گروه استیل اضافه شده به مولکول پروتئین در شرایط pH های مختلف بود. نتایج نشان داد که میزان استیله شدن در پروتئین های مختلف در pH های مختلف متفاوت بود. میزان استیله شدن پروتئین‌ها به کمک منحنی استاندارد (شکل ۲) محاسبه شد. به این صورت که در نمودار، نمودار عمودی میزان جذب در طول موج ۳۳۵ نانومتر و نمودار افقی میزان غلظت لایزین را نشان می دهد. در مورد گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد و استیله شده میزان جذب در طول موج ذکر شده خوانده شد و میزان غلظت لایزین کل (شاهد) و غلظت لایزین کاهش یافته بعد از ۲ زمان ۱۰ دقیقه و ۲ ساعت نگهداری نمونه‌ها در pH های مختلف اندازه گیری گردید. از نظر میزان استیله شدن، گلوتنین بیشترین و گلیادین کمترین میزان را دارا بود. هر سه پروتئین ماهیت آبگریز داشته و در نتیجه تنها علت تفاوت در میزان استیله شدن این سه پروتئین این بود که در گلوتن و گلوتنین میزان اسید آمینه لایزین بیشتری نسبت به گلیادین در سطح قرار گرفته اند، بنابراین واکنش لایزین با استیک انهیدرید به سهولت انجام گرفته است. در pH اسیدی، گروه‌های استیل اضافه شده ناپایدار بوده و بیشترین میزان دی استیله شدن هر سه پروتئین در pH ۳ مشاهده شد. Barber و Warthesen [۱۰] نشان دادند که میزان آسیله شدن گلوتن سوکسینیله شده ٦٠٪ و گلوتن سیتراکونیله شده ٤٠٪ (نسبت وزنی گلوتن به اسیدهای انهیدرید ۲ به ۱) گزارش کردند. Franzen & Kinsella اعلام کردند که میزان آسیله شدن پروتئین گلوتن گندم کمتر از دیگر پروتئین‌های غذا بود، به طوریکه بعضی از انواع پروتئین-ها (پروتئین سویا، لوبیای مانگ، آفتابگردان و غیره) تا ٨٠٪ تغییر در گروه‌های آمینی آزاد را بررسی کردند. آنها علت این تفاوت را ماهیت آبگریز، حلالیت پایین و داشتن درصد پایین لایزین در گلوتن نسبت به سایر پروتئین‌ها اعلام کردند [١٦ و ١٧]. در گلوتن اسید های آمینه قطبی خصوصا لایزین در درون مولکول و اسیدهای آمینه آبگریز در سطح قرار گرفته اند، این امر منجر به انجام نشدن واکنش گروه‌های آمینی آزاد درون مولکول پروتئین با اسید انهیدرید می‌شود. برای بدست آوردن تغییرات بیشتر در گلوتن بهتر است از شرایط محیط واکنش مناسب‌تری استفاده شود، به این منظور Grant از حلال دی اکساین به جای آب استفاد کرد و به این نتیجه رسید که این حلال باعث باز شدن زنجیره های گلوتن شد و گروه های آمینی بهتر در معرض استیک انهیدرید قرارگرفتند، بنابراین میزان استیله شدن در گلوتن به ٩٠٪ رسید و حلالیت پروتئین-های آسیله شده به طور قابل توجهی افزایش یافت [١٨]. Barber و Warthesen نشان داد که واکنش آسیله

شدن (گلوتن سیتراکونیله شده) تحت شرایط اسیدی غذا یا در طی هضم در بدن انسان تا حدی برگشت پذیر می‌باشد و گروه‌های آمینی لایزین دی استیله شده و دوباره لایزین در دسترس بدن قرار می‌گیرد [۱۰].

Table 3 Extent of modification of acetylated gluten, gliadin and glutenin at various pHs

Extent of modification (%)	pH 3		pH 6		pH 9	
	10 min	120 min	10 min	120 min	10 min	120 min
Gliadin	27.45±0.14^{cA}	14.07±0.15^{cB}	28.46±0.16^{cA}	26.27±0.45^{cB}	28.56± 0.26^{cA}	27.84±0.25^{cA}
Gluten	41.60±0.39^{bA}	29.18±0.19^{bB}	44.58± 0.15^{bA}	42.66±0.31^{bB}	44.99±0.51^{bA}	44.27±0.18^{bA}
Glutenin	52.66 ±0.10^{aA}	40.72± 0.41^{aB}	53.88±0.34^{aA}	52.69± 0.27^{aA}	54.54±0.31^{aA}	53.96±0.20^{aA}

*Values are the average of triplicates standard deviation. * Values are the average of triplicates standard deviation. Different small letters in each column and capital letters in each row indicate statistical difference between the values ($p<0.05$).

۳-۳- قابلیت نگهداری آب ژل

قابلیت نگهداری آب ژل گلوتن، گلیادین و گلوتنین شاهد و استیله شده در غلظت ۳۵٪ در pH های ۳، ٦ و ۹ در جدول ۵ نشان داده شده است. در نمونه گلوتن شاهد حداقل قابلیت نگهداری آب ژل در pH ٦ دیده شد و با افزایش pH قابلیت نگهداری آب نیز افزایش یافت. در نمونه استیله شده نیز با افزایش pH قابلیت نگهداری آب ژل روند صعودی داشت. در نمونه گلیادین شاهد در pH ایزوالکتریک که ٦ می‌باشد، کمترین قابلیت نگهداری آب ژل مشاهده شد و در pH ۹ دارای قابلیت نگهداری آب ژل بیشتری نسبت به pH ۳ بود. شاید دلیل این امر آن باشد در pH ایزوالکتریک کمترین ظرفیت نگهداری آب مشاهده می‌شود. در گلیادین استیله شده کمترین قابلیت نگهداری آب در pH ۳ مشاهده شد و با افزایش pH از ۳ تا ۹ قابلیت نگهداری آب روند صعودی داشت. در pH ایزوالکتریک که نیروی دفع کننده‌ای در سطح کلی سیستم پروتئینی وجود ندارد ژل تشکیل شده کم آب تر و سفت تر و دارای حجم کمتری می باشد [۱۹]. در نمونه گلوتنین شاهد کمترین قابلیت نگهداری آب ژل در pH بین ۷-۸ مشاهده شد و این حداقل قابلیت نگهداری به pH بین ٦-۵ در نمونه استیله شده نزول پیدا کرد. در نمونه گلوتنین شاهد بیشترین قابلیت نگهداری آب در pH ۹ بود و دلیل این پدیده شاید اثر حرارت باشد که باعث در معرض قرار دادن اسید آمینه های قطبی به سطح مولکول شد. در نمونه‌های استیله شده از pH ۷ به بالا روند قابلیت نگهداری آب صعودی بود. این روند در گلوتن و گلیادین استیله شده و شاهد نیز مشاهده شد.

Table 4 Water holding capacity (g/g) of the N and AC gluten, gliadin and glutenin at different pH values*.

Samples	3	pH values6	9
N gluten	8.90±0.02^{bB}	6.32±0.18^{bD}	10.35±0.18^{aA}
AC gluten	15.09±0.02^{bB}	16.76±0.02^{bB}	19.30±0.02^{bB}
N gliadin	7.08±0.17^{cB}	5.96±0.29^{cD}	8.78±0.08^{bA}
AC gliadin	11.52±0.02^{bB}	14.57±0.02^{bB}	17.10±0.02^{bB}
N glutenin	9.18±0.02^{aB}	8.05±0.07^{aC}	10.14±0.59^{aA}
AC glutenin	16.56±0.02^{bB}	12.74±0.02^{bB}	18.79±0.02^{bB}

a Multiple comparison procedure according to Duncan's test was carried out for the data shown in each row and each column, separately. Values are the average of triplicates ± standard deviation. For each characteristic, different small letters in each column and capital letters in each row indicate significant statistical difference ($p < 0.05$).

۳-٤- آنالیز بافت

همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش pH و نمک سفتی بافت پروتئین‌های شاهد افزایش یافت. در بین پروتئین‌ها گلوتنین با داشتن اختلاف شدید، بیشترین سفتی و سپس گلوتن و در نهایت گلیادین قرار گرفت. نمک بیش از pH بر سفتی بافت گلوتن و گلیادین موثر بوده و باعث افزایش سفتی بافت شد. با افزایش pH سفتی بافت نمونه‌های استیله شده نیز افزایش یافت. نمونه‌های گلوتنین و گلوتن استیله شده در pH های ۳، ٦ و ۷ به دلیل اینکه میزان استیله شدن بیشتر بوده و باندهای هیدروژنی و حتی آبگریز و الکترواستاتیکی خود را از دست داده‌اند سفتی بافت کاهش معنی داری داشت، اما در pH ۹ سفتی بافت هر دو پروتئین افزایش یافت. شاید دلیل این امر آن

باشد که در این pH تبادلات پیوندهای سولفیدریلی-دی سولفیدی[12]، پیوندهای یونی، واندروالسی و حتی هیدروژنی تشکیل شده است. اضافه کردن قلیا و یا نمک‌های قلیایی منجر می‌شود که حداکثر مقاومت به کشش، ویسکوزیته و جذب آب گلوتن افزایش و گسترش پذیری کاهش یابد. همچنین قلیا منجر به تبادل گروه‌های سولفیدریل و باندهای دی سولفیدی شده که در نتیجه G' و ویسکوزیته ظاهری در خمیر افزایش و میزان ضریب جریان یافتگی در خمیر گلوتن کاهش می‌یابد. از طرفی قلیا موجب می‌شود که خمیر رفتار شبیه جامدات را از خود بروز دهد، اما اضافه کردن اسید به خمیر رفتار عکس را نشان می‌دهد و ویسکوزیته ظاهری در خمیر کاهش یافته و از میزان K در قانون توان کاسته می‌شود $\sigma=K\gamma^n$ که σ برابر تنش برشی، K ضریب قوام، γ سرعت برشی و n عدد بدون بعد که نشان دهنده میزان نزدیکی به جریان نیوتنی است [۲۰]. تحقیقات انجام شده روی گلوتن گندم و پروتئین‌های ذخیره‌ای چاودار و جو نشان داده است که با افزایش pH از ۵/۵۵ تا ۹/۱ میزان بهم تجمع یافتن پروتئین‌های ذخیره‌ای در دانه‌های غلات ذکر شده افزایش می‌یابد [۲۰]. بر خلاف گلوتن و گلوتنین استیله شده که استیله کردن باعث کاهش سفتی بافت شد، در گلیادین استیله شده به علت پایین‌تر بودن میزان استیله شدن، سفتی بافت افزایش یافت. بعد از هیدراته شدن گلوتن شبکه ویسکوالاستیکی قوی تشکیل شده و حین هم زدن پروتئین‌های تشکیل دهنده گلوتن یعنی گلیادین و گلوتنین این شبکه ویسکوالاستیکی را از طریق باندهای دی سولفیدی درون و بین مولکولی و نیز برهم‌کنش‌های دیگری چون الکترواستاتیکی، واندروالسی، برهم کنش‌های دو قطبی دو قطبی و پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهند [۲۱]. گلوتن شبکه ویسکوالاستیکی است که هر دو خواص الاستیک و ویسکوز را از خود نشان می‌دهد. بررسی‌های متعددی راجع به نقش گلوتن، گلیادین و گلوتنین در رئولوژی‌های خمیر انجام شده است نشان می‌دهد که قسمت گلیادین رفتار ویسکوز و قسمت گلوتنین رفتار الاستیک را از خود نشان می‌دهد [۲۲ و ۲۳]. نتایج حاصل از مدول ذخیره و افت نشان داد که واکنش‌های هیدروفوبی نقش اصلی را در خمیر ایفا می‌کند. هنگامی که نسبت گلیادین به گلوتنین افزایش یابد از میزان الاستیکی خمیر در نتیجه تاثیرات پلاستیسایزری گلیادین کاهش می‌یابد، بنابراین مدول افت (G") افزایش و از میزان ذخیره (G') کاسته می‌شود. الاستیسیته فیلم گلوتن به گلوتنین با وزن مولکولی بالا مرتبط است، این ساختار با داشتن سیستئین اضافی برای تشکیل پل عرضی، باعث قویتر شدن گلوتن می‌شود. در واقع الاستیسیته بالا به درجه بالایی از برهم کنش‌های درون و بین مولکولی مرتبط است که منجر به تشکیل فیلم بسیار قوی و پیوسته[13] و مقاوم به فشار می‌شود [۲۳]. با افزایش pH پیوستگی بافت در نمونه‌های استیله شده روند صعودی را طی کرد. در pH ۳ و ٦ پیوستگی بافت گلیادین بیش از گلوتن و گلوتنین استیله شده بود اما در pH ۹ پیوستگی بافت گلوتنین بیش از گلوتن و گلیادین استیله شده بود. آنچه که مسلم است و به وضوح دیده شد این است که تأثیر pH بر نمونه‌های استیله شده بیش از نمونه‌های شاهد بود.در نمونه‌های پروتئین شاهد و استیله شده از لحاظ فنریت در pH های مختلف اختلاف معنی داری مشاهده نشد و تقریباً فنریت همه به ۱ (۱۰۰٪) نزدیک بود. صمغی بودن بافت برابر است با ضرب سفتی در میزان پیوستگی بافت. همانطور که در جدول ۵ نشان داده شده است، با افزایش pH هر سه پروتئین شاهد از لحاظ میزان صمغی بودن بافت، روند صعودی را طی کردند و در بین پروتئین ها، گلوتنین با حداکثر اختلاف بیشترین میزان صمغی بودن و سپس گلوتن و در نهایت گلیادین را دارا بودند. در نمونه‌های استیله شده نیز با افزایش pH روند صمغی بودن بافت صعودی بود. گلیادین استیله شده با وجود داشتن غلظت پایین تر دارای مقدار صمغی بودن بالاتری نسبت به گلیادین شاهد بود. در گلوتنین و گلوتن استیله شده، در pH های ۳ و ٦ میزان صمغی بودن بافت کمتر از نمونه شاهد و گلیادین استیله شده بود. تأثیر pH بر نمونه‌های استیله شده بیش از نمک بود به طوریکه هر سه پروتئین شاهد و استیله شده با افزایش pH سفتی بافت و متعاقباً صمغی بودن بافت افزایش یافت. در نمونه گلیادین شاهد در pH ۳ نیروی چسبندگی صفر ثبت شد. شاید دلیل این پدیده ویسکوز بودن شدید گلیادین در این pH باشد که دلیل آن قبلاً ذکر شد بود. بیشترین و کمترین میزان چسبندگی در pH های مختلف به ترتیب در گلیادین و گلوتنین مشاهده شد. با افزایش pH از ۳ تا ۹ الاستیسیته هر سه پروتئین شاهد روند صعودی را طی کرد و هر سه پروتئین در pH ۹ بیشترین الاستیسیته را دارا بودند. در هر سه pH، گلوتن بیشترین و گلیادین میزان الاستیسیته را دارا بود. گلیادین در pH ۳ الاستیسیته بسیار کمی را دارا بود و این پدیده به دلیل ویسکوز بودن بافت آن بود. با افزایش pH روند صعودی در میزان الاستیسیته پروتئین‌های استیله شده مشاهده شد و همانند سفتی

12. Sulphydryl-disulphide interchange

13. Cohessive

بافت، گلیادین استیله شده با داشتن غلظت پایین‌تر نسبت به گلیادین شاهد دارای بالاترین میزان الاستیسیته بود. در نمونه‌های استیله شده در pH های ۳ و ۶ گلیادین بیشترین و گلوتنین کمترین میزان الاستیسیته را دارا بودند. اما با افزایش pH نتیجه عکس شد. جدول ۶ بر اساس مشابهت بیش از ۹۰٪ (فاصله کمار از ۱۰٪ بر اساس شکل ۲) می باشد. متغیرها شامل نوع pH و نوع پروتئین می باشند بر این اساس به عنوان نمونه می توان گفت که پاسخ ها در pH۳ و پروتئین گلوتن طبیعی به دو خوشه تقسیم می شوند: خوشه ۱ شامل: سفتی، صمغی، الاستیسیته، فنریت، ظرفیت نگهداری آب و پیوستگی بافت و در خوشه ۲: چسبناکی وجود دارد. از طرف دیگر در گلوتن استیله شده در pH ۳ ، به دو خوشه تقسیم می شود. خوشه ۱ شامل: صمغی، فنریت، پیوستگی و خوشه ۲ شامل ظرفیت نگهداری آب، سفتی و الاستیسیته می باشد. نتایج در جدول ۶ به صورت ۱ و ۲ آمده است که اعداد یکسان در یک خوشه طبقه بندی می‌شوند.

Table 5 Texture profile analyzer of gluten, gliadin and glutenin in 35% concentration at various pHs

Protein	H			Co			G			E			A		
	pH			pH			pH			pH			pH		
	3	6	9	3	6	9	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Gliadin	9.42± 0.32 ^{eC}	13.88± 0.43 ^{eB}	27.77± 0.77 ^{eA}	0.44± 0.04 ^{dB}	0.54± 0.04 ^{cAB}	0.63± 0.06 ^{bA}	6.04± 0.12 ^{cC}	7.55± 0.36 ^{eB}	17.56± 1.25 ^{eA}	4.05± 0.23 ^{dC}	8.75± 1.19 ^{dB}	17.49± 0.73 ^{eA}	ND	120.51± 41.89 ^{aA}	34.35± 3.35 ^{aB}
Glutenin	239.34± 23.52 ^{aC}	325.72± 10.28 ^{aB}	454.86± 34.02 ^{aA}	0.66± 0.02 ^{bB}	0.75± 0.03 ^{bA}	0.84± 0.08 ^{aA}	157.25 ±13.09 ^{aC}	242.86 ± 13.19 ^{aB}	382.68± 17.33 ^{aA}	25.59± 2.94 ^{bC}	45.44 ± 1.09 ^{aB}	48.74± 1.46 ^{cA}	23.54 ± 5.32 ^{dB}	27.12± 3.85 ^{cA}	5.15± 0.09 ^{fC}
Gluten	19.74± 0.79 ^{cC}	61.76± 2.13 ^{cB}	192.06± 3.52 ^{bA}	0.81± 0.02 ^{aB}	0.84± 0.03 ^{aAB}	0.86± 0.02 ^{aA}	16.00± 0.30 ^{bC}	54.60± 1.10 ^{bB}	166.42± 15.25 ^{cA}	30.64± 1.72 ^{aC}	44.54 ± 0.69 ^{aB}	69.97± 1.24 ^{aA}	59.97 ± 0.87 ^{aA}	51.00± 1.74 ^{bB}	17.81± 0.89 ^{cC}
Ac Gliadin	7.71± 0.56 ^{bC}	8.46± 0.99 ^{bB}	14.79± 0.81 ^{eA}	0.56± 0.01 ^{cC}	0.62± 0.02 ^{eB}	0.84± 0.03 ^{aA}	4.31± 0.53 ^{eC}	5.24± 0.99 ^{fB}	12.43± 0.81 ^{fA}	2.90± 2.14 ^{eC}	6.44± 0.96 ^{eB}	10.81±1.41 ^{fA}	37.27 ± 1.74 ^{bB}	49.41± 4.86 ^{bA}	27.58± 2.03 ^{bC}
Ac Glutenin	18.48± 1.23 ^{cC}	29.50± 5.17 ^{dB}	215.33± 10.46 ^{cA}	0.27± 0.02 ^{eC}	0.46± 0.06 ^{cB}	0.71± 0.02 ^{bA}	5.12± 0.70 ^{deC}	13.89± 2.78 ^{dB}	195.85± 10.60 ^{bA}	13.40± 2.86 ^{cC}	37.06 ± 1.70 ^{bB}	66.41±1.76 ^{bA}	9.95± 0.83 ^{eA}	7.91± 0.33 ^{eB}	6.33± 1.58 ^{eC}
Ac Gluten	15.61± 1.36 ^{dC}	36.34± 8.95 ^{dB}	155.71± 4.63 ^{dA}	0.31± 0.04 ^{dC}	0.52± 0.04 ^{cB}	0.68± 0.02 ^{bA}	4.81± 0.52 ^{eC}	18.84± 2.00 ^{cB}	137.02± 6.38 ^{dA}	26.50± 0.31 ^{bC}	28.72 ± 1.38 ^{cB}	31.41±0.49 ^{dA}	27.00 ± 1.25 ^{cA}	20.56± 1.52 ^{dB}	9.35± 3.23 ^{dC}

*Means (n=3) ± standard deviations
**A: Adhesiveness, Co: Cohesiveness, G: Gumminess, Ch: Chewiness, E: Elasticity, H: hardness, S: Springiness
***Springiness of whole N and Ac protein were 0.99-1.00.
****ND mean not detection

Table 6 The results of Ward's method or clustering of factors and responses at various pH

	WHC	Hardness	Cohesiveness	Springiness	Adhesiveness	Gumminess	Chewiness	Elasticity
pH=3, N gluten	2	1	2	2	3	1	1	1
pH=3, Ac gluten	1	1	2	2	1	2	2	1
pH=3, N gliadin	1	1	2	2	2	1	1	2
pH=3, Ac gliadin	2	1	2	2	1	1	1	1
pH=3, N glutenin	2	1	2	2	2	1	1	2
pH=3, Ac glutenin	1	1	2	2	1	2	2	1
pH=6, N gluten	2	1	2	2	1	1	1	1
pH=6, Ac gluten	1	1	2	2	1	1	1	1
pH=6, N gliadin	1	1	1	1	2	1	1	1
pH=6, Ac gliadin	2	1	2	2	1	1	1	1
pH=6, N glutenin	2	1	2	2	2	1	1	2
pH=6, Ac glutenin	2	1	2	2	2	2	2	1
pH=9, N gluten	2	1	2	2	2	1	1	2
pH=9, Ac gluten	2	1	2	2	2	1	1	2
pH=9, N gliadin	2	1	2	2	1	1	1	1
pH=9, Ac gliadin	2	1	2	2	2	1	1	1
pH=9, N glutenin	2	1	2	2	2	1	2	2
pH=9, Ac glutenin	2	1	2	2	2	2	2	2

*1: cluster 1, 2: cluster 2.
**The same numbers means are classified in the same clusters

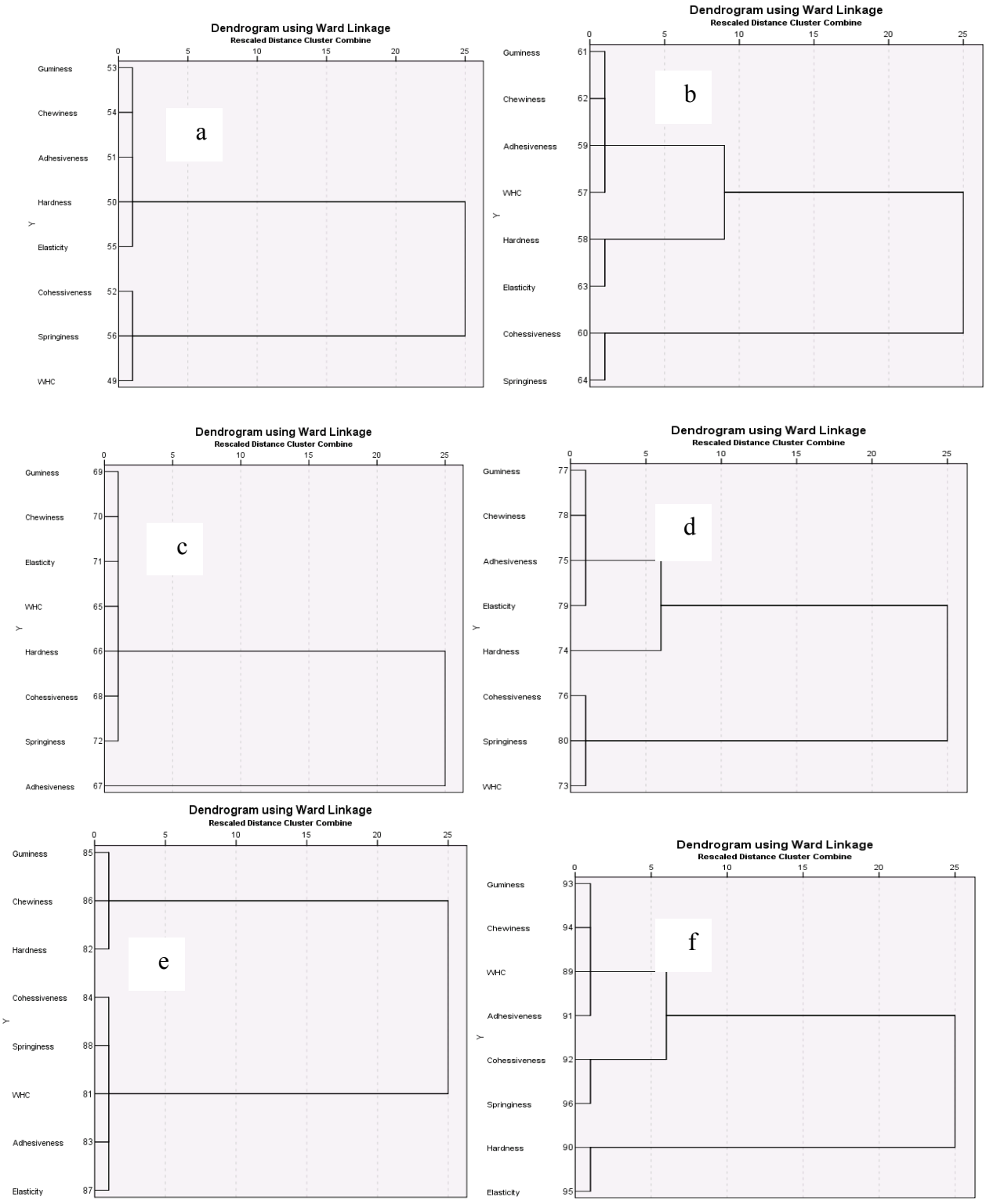

Fig 3 Ward's method for clustering the pH=3, N gluten (a) and Ac gluten (b); pH=3, N gliadin (c) and Ac gliadin (d); pH=3, N glutenin (e) and Ac glutenin (f).

٤- نتیجه‌گیری کلی

در این تحقیق جداسازی گلوتن به دو جزء گلیادین و گلوتنین انجام شد و هر سه پروتئین استیله گردیدند. میزان استیلاسیون و د استیلاسیون پروتئین‌ها در سه شرایط اسیدی (pH ۳)، خنثی (pH ٦) و قلیایی (pH ۹) به کمک تری نیترو بنزن سولفونیک اسید بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین میزان استیله شدن در مورد گلوتنین، سپس گلوتن و در نهایت

گلیادین انجام شد و دلیل این پدیده دارا بودن بالاترین میزان اسیدهای آمینه بازی و کمترین میزان اسیدهای آمینه اسیدی درگلوتنین بود. اما گروه‌های استیله در pH اسیدی چون ۳ بسیار ناپایدار بوده و پروتئین‌ها در این pH د استیله شدند. مقایسه خواص رئولوژیکی پروتئین‌های شاهد و استیله شده نشان داد که در بین پروتئین‌های شاهد، گلوتنین دارای بالاترین میزان سفتی و صمغی بودن بافت، همچنین گلوتن دارای بالاترین میزان الاستیسیته و گلیادین دارای بالاترین میزان چسبندگی بود. بالاترین میزان سفتی، مقاومت به جویدن، صمغی بودن بافت و الاستیسیته در pH ۹ در مورد هر سه پروتئین مشاهده شد. چسبندگی گلیادین و گلوتن در pH ٦ و ۷ بالاترین میزان بود. سفتی بافت، قابلیت صمغی بودن و الاستیسیته گلوتن و گلوتنین استیله شده به صورت معنی‌داری در pH های ۳ و ٦ کاهش و با افزایش pH تا ۹ افزایش یافت. دلیل این پدیده عبور از منطقه pH ایزوالکتریک بود. بدون در نظر گرفتن تاثیر غلظت، سفتی، پیوستگی، صمغی بودن و مقاومت به جویدن گلوتن و گلوتنین استیله شده نسبت به شاهد در pH های ۳ و ٦ کاهش یافت. گلیادین استیله شده مانند گلیادین شاهد قابلیت تشکیل فیلم را نداشت. آنچه که به وضوح دیده شد آن است که pH بر نمونه‌های استیله شده بیش از شاهد تاثیر قابل توجهی داشت.

۵- منابع

[1] Bonicel, J., Guilbert, S., Micard, V., Morel, M.H. (2001). Thermal properties of raw and processed wheat gluten in relation with protein aggregation. Polymers, 42: 477-485.

[2] Lagrain, B., Thewissen, G. B., Brijs, K., Delcour,A. J. (2008). Mechanism of gliadin-glutenin cross-linking during hydrothermal treatment. Food Chemistry, 107: 753-760

[3] Lawal, O. S., Adebowale, K. O. (2006). The acylated protein derivatives of canavalia ensiformis (jack bean): A study of functional characteristics. Journal of Food Science and Technology, 38: 918-929.

[4] Lagrain, B., Brijs, K., Delcour, J. A. (2006). Impact of redox agents on the physico-chemistry of wheat gluten proteins during hydrothermal treatment. Journal of Cereal Science, 44: 49-53.

[5] Saberi, A. H., Kadivar, M., Keramati, J. (2008). Improvement of functional properties of gluten extracted from two Iranian wheat varieties (Sardari and Mahdavi) employing chemical and enzymatic modification. Journal of Agriculture, Science and Technology, 10: 243-252.

[6] Zukowska, E. A., Rudnik, E., Kijenski, J. (2008). Foaming properties of gluten and acetylated gluten studies of the mathematical models to describe liquid drainage. Journal of Cereal Science, 47: 233-238.

[7] Coffman, C. W., Garcia, V. V. (1977). Functional properties and amino acid content of a protein isolate from mung bean flour. Food Technology, 12: 473-484

[8] AACC. (2000). Approved methods of the AACC. (10th ed). American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minnesota. USA, (Methods 44-15A, 35-20, 39-11, 76-11, 32-10, 08-01, 54-21, 38-12A).

[9] Kieffer, R., Schurer, F., Kohler, P., Wieser, H. (2007). Effect of hydrostatic pressure & temperature on the chemical & functional properties of wheat gluten. Journal of Cereal Science, 45: 285-292.

[10] Barber, K. J., Warthesen, J. J. (1982). Some functional properties of acylated wheat gluten. Food Chemistry, 30: 930-934.

[10] M. Majzoobi, E. Abedi, A. Faraknaky, M. Aminlari, Functional properties of acetylated glutenin and gliadin at varying pH values. Food Chem. 133(4) (2012) 1402-1407.

[11] Chun, C., Wang, J.S., Yang, X.Q., Zhao, M.M. (2007). Gelation behavior of wheat gluten by heat treatment followed by transglutaminase cross-linking reaction. Food Hydrocolloids, 21: 174-179.

[12] Agyare, K.K., Xiong, Y.L., Addo, K. (2008). Influence of salt & pH: transglutaminase- treated wheat gluten. Food Chemistry, 107: 1131-1137.

[13] J. H. Ward, Hierarchical grouping to optimize an objective function. J Am Stat Assoc. 58(301) (1963) 236-244.

[14] EL-Adawy, T. A. (2000). Functional properties and nutritional quality of acetylated and succinylated mung bean protein isolate. Food Chemistry, 70: 83-91.

[15] J. G. Ponte, V.A. Destefan, R. H. Cotton, Studies of gluten lipids. i. distribution of lipids in gluten fractions separated by solubility in 70 percent ethanol. Cereal Chem. 44(5) (1967) 427.

[16] Franzen, K. L., Kinsella, J. E. (1976a). Functional properties of succinylated and

acetylated leaf protein. Food Chemistry, 24: 788-795

[17] Franzen, K. L., Kinsella, J. E. (1976b). Functional properties of succinylated and acetylated soy protein. Food Chemistry, 24: 914-919.

[18] Grant, D. R. (1973). The modification of wheat flour protein with succinic anhydride. Cereal Chemistry, 50:417-428.

[19] Fatemi, H. (2005). Food chemistry. 4th edition. Pp: 101-106.

[20] Kamal, A. H. M., Kim, K., Shin, K., Seo, H. (2009). Diversity of novel glutenin subunits in bread wheat (Triticum aestivum L.). Journal of Plant Biology, 52:533-54.

[21] Wieser, H. (2007). Chemistry of gluten proteins. Food Microbiology, 24:115-119

[22] Trufanov, V. A., Permyakova, M. D., Berezovskaya, E. V. (2003). Aggregation ability of seed storage proteins from cereals differing in gluten quality. Applied Biochemistry and Microbiology, 39: 418-421.

[23] Mirsaeedghazi, H., Ema-Djomeh, Z., Mousavi, M. A. (2008). Rheometric measurement of dough rheological characteristics and factors affecting it. International Journal of Agricultural and Biology, 10: 112-119

The effect of pH on textural properties of native and acetylated glten, gliadin and glutenin by cluster analysis

Abedi, E.[1]*, Majzoobi, M. [2]

1. Assistant professor of Food Science and Technology, School of Agriculture, Fasa University, Fasa, Iran
2. Associate professor of Food Science and Technology, School of Agriculture, Shiraz University, Shiraz, Iran

(Received: 2018/07/14 Accepted:2019/01/29)

Wheat gluten is one of the most important plant proteins of fairly low price consisting of glutenins and gliadins. The hydrophobic nature and low water solubility of gluten has limited its applications in many food and non-food products. In order to improve the applications of gluten, it was first fractionated into its main components; gliadins and gluteneins and then they were acetylated using acetic anhydride. In the next stage, the rhelogical properties of these proteins at different pH values (3, 6 and 9) were compared with their corresponding controls. The pH had a great impact on the degree of acetylation. Glutenin had the highest, while gliadin had the lowest degree of acetylation at different pH values. Moreover, all these proteins were de-aceytelated at pH 3. Hardness, gumminess, chewiness and elasticity of the acetylated gluten and glutenin decreased significantly at pH 3.

Keywords: Acetylation, textural property, pH, protein, cluster analysis

* Corresponding Author E-Mail Address: Elaheabedi1389@gmail.com