



## بررسی اثر پپتیدهای زیست فعال گیاه آمارانت (*Amaranthus hypochondriacus*) بر ویژگی‌های نان باگت

نیره کریمی<sup>۱</sup>، فریبا زینالی<sup>۲\*</sup>، محمود رضازاد باری<sup>۳</sup>، مهدی نیکو<sup>۴</sup>، فروغ محترمی<sup>۵</sup>، مهدی کدیور<sup>۶</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری، علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۳- استاد تمام، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۴- دانشیار، گروه پاتوبیولوژی، پژوهشکده آرتیمیا و آبی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
- ۶- استاد تمام، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

### چکیده

### اطلاعات مقاله

پپتیدهای زیست فعال بخش‌های پروتئینی ویژه‌ای هستند که بر عملکرد و سلامت بدن انسان تاثیر به‌سزایی دارند. در این مطالعه تاثیر پروتئین‌ها و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های آمارانت (پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین) در مقادیر ۱ تا ۵ درصد و زمان‌های مختلف هیدرولیز (۵/۰، ۵/۱، ۳ و ۵ ساعت) بر خواص خمیرترش و کیفیت نان بررسی شد. نتایج نشان داد که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کل آمارانت در زمان ۳ ساعت دارای بیشترین تاثیر بر رشد لاکتوباسیلوس پلاتناروم (*PTCC 1896*) ( $\text{Log CFU/mL}$  ۴۰/۱۱) و ساکارومایسس سرویزیه (*PTCC 5052*) ( $\text{Log CFU/mL}$  ۳۲/۸) در شرایط آزمایشگاهی بود. این میکروب‌ها فلور اصلی خمیرترش هستند و مقادیر مختلف پپتید نسبت به نمونه‌ی شاهد بر رشد آن‌ها از نظر آماری تفاوت معنی‌داری داشت. میزان اسیدیته قابل تیترا و pH پس از ۱۶ ساعت تخمیر در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در خمیرترش حاوی ۵٪ پپتید به ترتیب، ۳۳/۱۳ میلی‌لیتر NaOH و ۶/۴ بودند که نسبت به سایر تیمارها بیشتر بود. بیشترین میزان فعالیت آبی، حجم مخصوص، اسیدیته قابل تیترا و کمترین آنتالپی در نان تهیه شد از خمیرترش حاوی ۳٪ پپتید حاصل شد. بنابراین نان تولید شده از خمیرترش حاوی ۳٪ پپتید به عنوان بهترین تیمار جهت افزایش کیفیت نان انتخاب شد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۱

کلمات کلیدی:

آمارانت،

پروتئین هیدرولیز شده،

خمیرترش،

ویژگی‌های نان.

DOI: 10.52547/fsct.19.122.101

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.122.16.9

\* مسئول مکاتبات:

f.zeynali@urmia.ac.ir

## ۱- مقدمه

خمیرترش در حقیقت خمیر حاصل از مخلوط فرآورده‌های غلات، آب و میکروارگانیزم‌های فعال است که به طور سنتی به عنوان جایگزین مخمر نان و محصولات شیمیایی جهت ورآمدن نان و محصولات نانویی استفاده می‌شود [۱]. به طور کلی pH خمیرترش برای آرد گندم بین ۵/۳ تا ۳/۴ می‌باشد که نوع آرد (بر اساس درصد استحصال) تاثیر بسزایی بر آن دارد. مقدار افزودن خمیرترش بر pH خمیر نان بسیار موثر است. به عنوان مثال با افزودن ۲۰ درصد خمیرترش به خمیر اصلی، pH در رنج ۷/۴-۵/۴ قرار می‌گیرد. استفاده از خمیرترش در محصولات نانویی به علت کاهش pH، سبب افزایش مقاومت شبکه گلوتن، حفظ گاز، ممانعت از فعالیت آنزیم آمیلاز آرد، ایجاد پیوند آبی میان گلوتن و گرانول‌های نشاسته، افزایش تورم پنتوزان‌ها، حلالیت فیتات در اثر فعالیت فیتاز و جلوگیری از فساد می‌شود [۲].

افزایش فعالیت آلفا آمیلاز در اثر تولید اسید توسط اسید لاکتیک باکتری‌ها، باعث تولید دکسترین‌های با وزن مولکولی کم می‌گردد که از پیوند گلوتن- نشاسته جلوگیری به عمل می‌آورند و سبب کاهش میزان سفتی نان در طی نگهداری می‌شوند. همچنین خمیری با بافت نرم‌تر و الاستیسیته‌ی کمتر تولید می‌کند و ظرفیت نگهداری گاز در خمیر را افزایش می‌دهند [۳].

اسیدیته‌ی خمیرترش و خمیر بر ساختار ترکیباتی مانند نشاسته، آرابینوزایلان‌ها و گلوتن موثر است و در این زمینه نظریه‌ی تاثیر اسید بر متورم شدن گلوتن و هیدرولیز ملایم اسیدی نشاسته در جهت بهبود خمیر مطرح گردیده است. اسید بر رفتار خمیر نیز بسیار موثر است به نحوی که خمیر با pH کمتر نیاز به زمان کمتری جهت مخلوط شدن دارد و پایداری آن نسبت به خمیر معمولی کمتر است. اثر مستقیم اسیدهای آلی بر ویژگی‌های رئولوژیکی خمیر با استفاده از تکنیک‌های بنیادی و تجربی به اثبات رسیده است [۴].

استفاده از غذاهای عملگرا، مکمل‌های رژیمی و دارویی که حاوی پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های غذایی هستند، روز به روز در حال گسترش است و از جمله علل آن می‌توان به میزان پروتئین بالا، عملگرایی خوب، ترکیبات زیست فعال و مقدار کم عوامل ضد تغذیه‌ای اشاره نمود. پپتیدهای زیست فعال بخش‌های پروتئینی ویژه‌ای هستند که بر عملکرد و

سلامت انسان تاثیر بسزایی دارند [۵]. مطالعات در سطح آزمایشگاهی و بافت زنده نشان می‌دهد که پپتیدهای زیست فعال دارای طیف گسترده‌ای از عملکردهای زیستی هستند که از مهمترین آنها می‌توان به فعالیت ضد میکروبی، آنتی اکسیدانی، کاهش کلسترول خون و کاهش فشار خون اشاره نمود [۶]. پپتیدهای زیست فعال معمولاً با توالی پروتئین اصلی مطابقت دارند و به طور عمده با روش‌های شیمیایی و فیزیکی تولید می‌گردند. از جمله روش‌های شیمیایی می‌توان به هیدرولیز قلیایی، اسیدی، آنزیم‌های پروتئولیتیک گیاهی، حیوانی و میکروبی اشاره نمود [۷].

گیاه آمارانت (*Amaranthus hypochondriacus*) به خشکی، گرمای زیاد و آفت بسیار مقاوم است، عملکرد دانه‌ی آن در هکتار نسبت به غلات معمول، بسیار بالاتر است. میزان پروتئین آن ۱۳ الی ۱۹ درصد است و نسبت به سایر غلات از نظر لیزین، تریپتوفان، آرژینین و اسیدآمینوهای گوگرددار غنی است. پروتئین موجود در آمارانت دارای چهار بخش اصلی آلومین، گلوبولین، گلوتلین و پرولامین است که آلومین و گلوبولین مهمترین و بیشترین بخش آن را تشکیل می‌دهند [۸]. Scilingo و همکاران (۲۰۰۲) در تحقیقی بهبود حلالیت ایزوله پروتئین آمارانت را بررسی نمودند. تحقیقات نشان داد که استفاده از تیمار حرارتی به علت تجمع پروتئین آمارانت (به خصوص گلوبولین)، حلالیت ایزوله پروتئین را کاهش می‌دهد در حالی که هیدرولیز آنزیمی قبل از تیمار حرارتی باعث افزایش حلالیت آن می‌گردد [۹]. Silva-Sanches و همکاران (۲۰۰۴) نشان دادند که استفاده از ۱٪ آلومین آمارانت (نسبت به مقدار آرد گندم) زمان توسعه خمیر (۳/۸ دقیقه در مقایسه با ۴/۷ در نمونه شاهد) و پایداری اختلاط (۱/۱۱ دقیقه در مقایسه با ۹/۱۰ دقیقه در نمونه شاهد) را بهبود می‌بخشد. همچنین مقدار آب مورد نیاز برای توسعه متوازن خمیر کاهش و خواص خمیر و ویژگی‌های نان بهبود می‌یابد [۱۰].

Karimi و همکاران (۲۰۲۰) تاثیر پروتئین هیدرولیز شده‌ی میگو را بر رشد میکروارگانیزم‌ها و خواص نان بررسی کردند. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم اثر خوبی داشته است و به دلیل کاهش سفتی و بیاتی نان عمر نگهداری آن را افزایش می‌دهد [۸].

(۲۰۲۲) با کمی تغییرات انجام شد [۱۱].

طبق روش Barba de la rosa و همکاران (۲۰۱۰) برای پروتئین کل و بخش‌های پروتئین آمارانت (آلبومین، گلوبولین) از ۱۵ درصد ژل آکریل امید استفاده شد و از جریان ۲۰ میلی آمپر و ولتاژ ۲۰۰ ولت به مدت ۲ الی ۳ ساعت جهت تشکیل باندها استفاده گردید. برای رنگ نمودن ژل از کوماسی برلیانت بلو و برای رنگ بری ژل از تری کلرواستیک اسید استفاده شد و نمونه‌ها پس از ۱۲ ساعت شسته شدند [۱۲].

## ۲-۲-۲- استخراج پروتئین کل و بخش‌های غنی از آلبومین و گلوبولین آمارانت

آرد آمارانت (*Amaranthus hypochondriacus*) از آسیاب دانه‌های آن تهیه شد و برای به دست آوردن پودری نرم از الک سایز ۱۰۰ میکرومتر استفاده شد. جهت چربی‌گیری آرد از هگزان به نسبت ۱:۱۰ (حلال:آرد) تحت شرایط هم زدن مداوم به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد استفاده گردید [۱]. پس از آن آرد به دست آمده جهت خشک شدن در دمای اتاق به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت و سپس تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱]. جهت استخراج پروتئین کل، آرد آمارانت با استفاده از سود ۱ نرمال به pH=۹ رسید و به مدت ۱۵ دقیقه توسط همزن به صورت مدام همزده شد. پس از سانتریفوژ نمودن به مدت ۱۵ دقیقه با دور rpm ۶۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، محلول رویی جهت رسوب پروتئین با اسید کلریدریک ۱ مولار به pH ~ ۵/۴ رسید و به مدت ۱۰ دقیقه با دور rpm ۶۰۰۰ سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل با سود ۱ نرمال به pH ~ ۷ رسانده شد و با فریزدرایر خشک و به عنوان پروتئین کل تعیین گردید [۱۱].

برای استخراج بخش غنی از آلبومین، آرد آمارانت به نسبت ۱:۱۰ با آب مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به طور مداوم همزده شد. پس از آن با دور rpm ۶۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ گردید. محلول رویی به عنوان بخش غنی از آلبومین در نظر گرفته شد. برای استخراج گلوبولین، رسوب حاصل از استخراج آلبومین در محلول ۱/۰ مولار NaCl، ۱ میلی‌مولار EDTA و ۱۰ میلی‌مولار  $K_2HPO_4$  در (pH ۵/۷) به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به طور مداوم همزده شد و سپس مانند بالا

در تحقیقی از گلوتن هیدرولیز شده‌ی گندم (WGH) جهت رشد مخمر ساکارومایسس سرویزیه<sup>۱</sup> در نوشیدنی آب جو استفاده شد. از آنزیم پانکراتین جهت هیدرولیز گلوتن گندم استفاده گردید. نتایج نشان داد که وزن مولکولی کمتر و مقادیر بالای لوسین، لیزین، هیستیدین و آرژنین در فراکشن‌های گلوتن هیدرولیز شده با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون و تیمار با رسوب توسط الکل سبب بهتر شدن رشد مخمر می‌گردد [۲].

نان قوت غالب اغلب مردم محسوب می‌شود و افزایش کیفیت آن می‌تواند میزان ضایعات ناشی از بیاتی نان را کاهش دهد. با توجه به تحقیقات صورت گرفته، این پژوهش اولین مطالعه در مورد تاثیر پروتئین‌های کل، آلبومین و گلوبولین آمارانت هیدرولیز شده توسط آنزیم آلكالاز در زمان‌های مختلف (۵/۰، ۵/۱، ۳ و ۵ ساعت) بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و ساکارومایسس سرویزیه در شرایط آزمایشگاهی و همچنین بر خواص خمیرترش و نان حجیم بررسی می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد شیمیایی و گونه‌های میکروبی

آلكالاز L 2.4 (EC 3.4.21.62) (پروتئاز حاصل از باسیلوس لیکنی فورمیس<sup>۲</sup>)، MRS برات، MRS آگار، PDA آگار که از شرکت سیگما- آلدردیج خریداری شدند. لاکتوباسیلوس پلانتروم (1896) PTCC و ساکارومایسس سرویزیه (5052) PTCC از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی تهیه گردید (تهران، ایران). هگزان، سدیم کلرید، تریس (هیدروکسی متیل) و granulated yeast extract که از شرکت مرک خریداری شدند. آرد گندم از شرکت گل آرد اصفهان و آمارانت از شرکت پنجه طلا خریداری شد.

### ۲-۲- روش‌ها

#### ۲-۲-۱- آنالیز بخش‌های پروتئینی مختلف آمارانت با استفاده از تکنیک SDS-PAGE

بررسی الگوی نواری بیوپپتیدها و تاثیر آنزیم بر روی الگوی الکتروفوریتیک پروتئین‌های آمارانت با الکتروفورز SDS-PAGE بر اساس روش پیشنهادی Amiri و همکاران

1. *Saccharomyces pastorianus*
2. *Bacillus licheniformis*

سانتریفیوژ گردید.

**۲-۲-۵- تهیه خمیر ترش**

خمیرترش طبق روش Liu و همکاران (۲۰۱۹) تهیه شد [۱۶]. برای این کار ۱ میلی لیتر لاکتوباسیلوس پلاتناروم حاوی CFU / mL  $10^7$  در ۱۰۰ میلی لیتر MRS برات در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد و ۱ میلی لیتر ساکارومایسس سرویزیه حاوی CFU / mL  $10^4$  در ۱۰۰ میلی لیتر در محیط کشت عصاره مخمر در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شد. سپس محیط های کشت حاوی میکروارگانسیم به مدت یک شب در یخچال (۴ درجه سانتی گراد) نگهداری شدند. پس از سانتریفیوژ نمودن محیط کشت به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۲۵۰۰rpm، رسوبات حاصل (حاوی سلول های میکروبی) دو بار با آب استریل شسته و سپس مجدداً سانتریفیوژ شدند (۲۵۰۰rpm، ۱۵ دقیقه). خمیرترش با مخلوط کردن ۲۰۰ گرم آرد استریل شده (ماده خشک ۹/۱۲ درصد (وزن خشک)، پروتئین ۳/۱۳ درصد (N ۷۰/۵) چربی ۲/۱ درصد (وزن خشک)، خاکستر ۴۹/۰ درصد (وزن خشک) با ۷۰ میلی لیتر آب شیر، ۳۰ میلی لیتر سوسپانسیون میکروبی (ساکارومایسس سرویزیه CFU / mL  $10^9$ ) به دست آمد. هیدرولیز پروتئین حاصل از ۳ ساعت هیدرولیز آنزیمی متشکل از مقادیر مختلف ۱ تا ۵ درصد تهیه و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۶ ساعت در گرم خانه نگهداری شد. خمیرترش شاهد (فاقد پپتید) با شرایط یکسانی گرم خانه گذاری شد.

**۲-۲-۶- تهیه نان**

برای تهیه خمیر شاهد ۱۰۰ گرم آرد با ۱٪ نمک، ۱٪ بهبود دهنده، ۵/۱٪ مخمر و ۲۰٪ خمیرترش مخلوط گردید [۱۵]. جذب آب در فارینوگراف به عنوان میزان آب مورد نیاز برای تهیه خمیر در نظر گرفته می شود [۱۷]. که این مقدار ۵۶٪ (۵۶ میلی لیتر به ازای ۱۰۰ گرم آرد) بود. خمیر بعد از تهیه جهت استراحت اولیه به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد. سپس به قطعات ۵۰ گرمی تقسیم و در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد و رطوبت ۸۵٪ به مدت ۹۰ دقیقه نگهداری شد (استراحت ثانویه). خمیرهای آماده به مدت ۱۵ دقیقه در فر با دمای ۲۲۰ درجه سانتی گراد پخته شدند و به مدت ۱ ساعت در شرایط بهداشتی سرد شدند و سپس در کیسه های پلی اتیلن در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد

**۲-۲-۳- هیدرولیز پروتئین های آمارانت**

به منظور هیدرولیز، ابتدا مقدار معینی از پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین را به مقدار مشخصی از آب مقطر افزوده و درون بن ماری با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد می گذاریم. بشر حاوی پروتئین درون همزن مغناطیسی به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد تا کاملاً یکنواخت گردد. سپس از سود ۱ مولار برای رسیدن pH محلول پروتئین به ۸ (pH بهینه فعالیت آنزیم) استفاده شد. در مرحله بعدی ۳ گرم پروتئین در ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. فرآیند هیدرولیز با آنزیم آلکالاز (غلظت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۲۰) در زمانهای ۵/۰، ۵/۱، ۳ و ۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انجام شد. در حین هیدرولیز، از سود ۱ مولار برای ثابت نگه داشتن pH استفاده شد و در پایان فرآیند هیدرولیز، pH محلول با اسیدکلریدریک ۱ مولار تا ۷ کاهش داده شد. به منظور غیر فعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی را درون بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده، سپس توسط آب و یخ سرد شد. نمونه ها در ۴ هزار دور در دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت توسط دستگاه فریز درایر خشک گردید. پودر تولید شده تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۳].

**۲-۲-۴- تأثیر هیدرولیز پروتئین های مختلف آمارانت****بر رشد میکروارگانسیم ها در شرایط آزمایشگاهی**

پروتئین کل، آلبومین و گلوبولین و هیدرولیزهای حاصل از آنها، در زمان های مختلف هیدرولیز (۵/۰ تا ۵ ساعت) جهت تأثیر بر رشد لاکتوباسیلوس پلاتناروم و ساکارومایسس سرویزیه آزمایش شدند. هیدرولیزها در آب مقطر به میزان ۲ میلی گرم در میلی لیتر حل شدند و یک میلی لیتر آن به ۹ میلی لیتر محیط کشت حاوی CFU / mL  $10^4$  باکتری یا سلول های مخمر اضافه شدند. جهت مقایسه، از پروتئین های هیدرولیز نشده ی آمارانت بر رشد مخمر و باکتری ها در شرایط آزمایشگاهی استفاده شد. شمارش لاکتوباسیلوس پلاتناروم با روش کشت عمقی بر روی MRS آگار و مخمر بر روی کشت PDA انجام شد. پلیت های حاوی لاکتوباسیلوس پلاتناروم در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و ساکارومایسس سرویزیه در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد پس از گذشت ۴۸ ساعت گرم خانه گذاری شمارش شدند [۱۴].

بسته‌بندی گردید [۱۸].

### ۲-۲-۷- اندازه‌گیری اسیدیته قابل تیترو pH

برای تعیین pH خمیرترش و نان ۱۰ گرم از نمونه با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر هموزن گردید. سپس pH نمونه‌ها با استفاده از pH متر اندازه‌گیری (Hanna, Germany) شد. اسیدیته قابل تیترو نیز با تیتراسیون نمونه‌ها با سود ۱/۰ نرمال تا pH ۵/۸ صورت گرفت. مقدار سود مصرفی به عنوان میزان اسید لاکتیک موجود در خمیرترش و نان در نظر گرفته شد [۱۵].

### ۲-۲-۸- تعیین رطوبت، فعالیت آبی نان و افت وزن

جهت تعیین رطوبت نان ابتدا پسته‌ی نان حذف شد و پس از توزین مقداری از مغز نان به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. تفاوت میان وزن اولیه و وزن نهایی نان به عنوان درصد رطوبت نان محاسبه می‌شود.

فعالیت آبی نان نیز با استفاده از دستگاه سنجش فعالیت آبی (MS1, Novasina, Switzerland) تعیین شد. دستگاه در ابتدا با استفاده از محلول کلرید پتاسیم کالیبره گردید. سپس نمونه‌ها به صورت قطعات برش خورده در داخل پلیت پلاستیکی واقع در مخزن دستگاه قرار گرفت و درب مخزن کاملاً بسته شد. بعد از حدود ۲۰ دقیقه اگر عدد خوانده شده تغییری نکرد و ثابت ماند، به عنوان فعالیت آبی نمونه گزارش می‌شود.

جهت تعیین افت پخت نان، وزن چانه‌ها ( $5 \pm 0.4$  گرم) و وزن نان‌های حاصل، پس از پخت و سرد کردن، اندازه‌گیری و با فرمول زیر افت نان محاسبه شد [۱۹].

$$100 \times \frac{\text{وزن چانه}}{\text{وزن نان پس از پخت}} - \text{وزن چانه نان هموزن افت} \%$$

### ۲-۲-۹- حجم ویژه نان

برای انجام این آزمایش برشی از مغز نان تهیه و با استفاده از تعیین حجم ویژه توسط دانه کلزا به روش AAC با شماره ۱۰-۰۵ اندازه‌گیری شد [۲۰].

### ۲-۲-۱۰- کالریمتری اسکن افتراقی (DSC)

تجزیه و تحلیل کالریمتری با استفاده از کالری سنج DSC (DSC PT 10, Linseis, Germany) بعد از گذشت یک و ۵ روز پس از پخت تعیین شد. حدود ۱۰ میلی‌گرم از نمونه‌ی نان در یک ظرف آلومینیومی قرار داده شد. درب ظرف محکم بسته شده و توزین گردید. سپس همه نمونه‌ها با سرعت

۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه از دمای ۲۰ به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد رسیدند و گرمای ذوب نشاسته محاسبه شد. مقیاس درجه حرارت DSC و جریان گرما با استفاده از یک نمونه استاندارد indium کالیبره شد [۲۱].

### ۲-۲-۱۱- ارزیابی حسی

هر نمونه توسط ۱۰ ارزیاب مورد بررسی قرار گرفت. در هر بخش ۲ نمونه به صورت تصادفی ارائه شد و از آنها خواسته شد تا ویژگی‌های ظاهری نان شامل شکستگی و پارگی، ویژگی‌های پخت، فرم و شکل، رنگ پوسته، حجم و پذیرش کلی را ارزیابی کنند. در این آزمون از مقیاس ۵ نقطه‌ای استفاده گردید که در آن ۵= بسیار خوب، ۴= خوب، ۳= متوسط، ۲= بد و ۱= بسیار بد توصیف شد. از آب برای شستشوی دهان بین ارزیابی‌ها استفاده شد [۲۲].

### ۲-۲-۱۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

در این تحقیق در بخش تاثیر پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست فعال دانه تاج خروس در زمان‌های مختلف (۱۵ تیمار) بر میکروارگانیزم‌ها در شرایط آزمایشگاهی و بررسی تاثیر غلظت پپتید (۶ تیمار) بر ویژگی‌های خمیرترش به طور جداگانه در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) در سطح احتمال ۹۵٪ ( $P < 0.05$ ) انجام گرفت. جهت بررسی و تاثیر پپتید (۲ تیمار) بر ویژگی‌های نان از آزمون T-test استفاده گردید. تمام آنالیزها با نرم افزار SPSS 20 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. رسم نمودارهای دو بعدی با نرم‌افزار اکسل Excel 2020 صورت پذیرفت. داده‌ها بر حسب میانگین  $\pm$  انحراف معیار بیان شدند.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- شناسایی پروتئین‌های آلبومین، گلوبولین

و پروتئین کل آمارانت با استفاده از روش

### SDS-PAGE

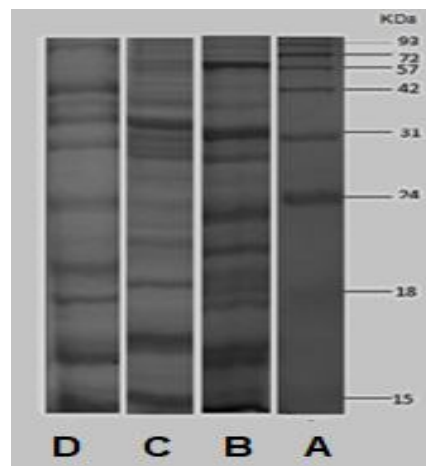
آنالیز پروتئین‌های آلبومین، گلوبولین و پروتئین کل آمارانت با استفاده از روش SDS-PAGE در شکل ۱ نشان داده شده است. شکل ۱.B. زیرواحدهای مختلف پروتئین کل آمارانت را نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است این پروتئین دارای زیرواحدهایی با وزن‌های مولکولی کم بین ۱۵ تا ۱۸ کیلوالتون

می‌باشد. پروتئین‌های با وزن مولکولی متوسط در دامنه ۳۱ تا ۳۴ کیلودالتون و زیرواحدهای با وزن مولکولی زیاد در رنج ۵۷ تا ۷۲ کیلودالتون نیز در آن مشاهده می‌شود. این نتایج با مطالعات Cárdenas-Torres و همکاران (۲۰۱۹) مطابقت داشت [۲۳]. آنها اذعان داشتند که اغلب پروتئین‌های آمارانت در رنج ۱۴ تا ۴۵ کیلودالتون قرار دارند. همانطور که در شکل C.۱ مشاهده می‌شود آلبومین دارای یک باند اصلی با وزن مولکولی تقریباً ۳۴ کیلودالتون و یک سری باندهای فرعی با وزن مولکولی بین ۱۰ تا ۱۸ کیلودالتون است. در این پروتئین همچنین تعدادی زیرواحد با وزن مولکولی متوسط در رنج ۴۳ تا ۷۰ کیلودالتون قابل مشاهده می‌باشد. این نتایج با مطالعات Jassen و همکاران (۲۱۷) مطابقت داشت [۲۴]. در شکل D.۱ زیرواحدهای اصلی گلوبولین با وزن مولکولی ۲۹ کیلودالتون و ۵۴ کیلودالتون و زیرواحدهایی فرعی با وزن مولکولی ۷۰ و ۸۰ کیلودالتون مشاهده گردید. این نتایج مطابق یافته‌های Barbara dela rosa و همکاران (۲۰۱۰) می‌باشد [۱۲].

۵/۰، ۵/۱، ۳ و ۵ ساعت پس از هیدرولیز بر لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه در شرایط آزمایشگاهی نشان می‌دهند. نتایج حاصل نشان داد که هیدرولیز پروتئین کل در زمان ۳ ساعت بیشترین تاثیر را بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم (۴۰/۱۱) داشت و کمترین میزان رشد باکتری مربوط به گلوبولین هیدرولیز نشده (زمان صفر) (Log CFU / mL) ۰۶/۷ بود ( $P < 0,05$ ). این نتایج احتمالاً بیانگر این است که پپتیدها نسبت به پروتئین‌ها تاثیر بیشتری بر لاکتوباسیلوس پلانتاروم داشته اند. در این راستا محققان بیان کردند که هیدرولیز جزئی پروتئین میگو می‌تواند بر رشد لاکتوباسیلوس کازئی تاثیر بسزایی داشته باشد [۲۵].

مطابق نتایج شکل ۳، رشد مخمر در محیط کشت حاوی پروتئین کل هیدرولیز شدهی آمارانت پس از ۳ ساعت دارای کمترین میزان (Log CFU / mL ۳۲/۸) بود ( $P < 0,05$ ). همانطور که در شکل ۳ مشخص است پروتئین‌ها در مقایسه با پپتیدها دارای تاثیر کمتری بر رشد مخمر بودند و در این میان محیط کشت حاوی گلوبولین در زمان صفر (هیدرولیز نشده) نسبت به سایر تیمارها از نظر آماری بر رشد ساکارومایسس سرویزیه کمترین میزان رشد (Log CFU / mL ۳/۴) را دارا بود ( $P < 0,05$ ). در تحقیقی از گلوتن هیدرولیز شده گندم جهت تاثیر بر رشد مخمر استفاده گردید. نتایج نشان داد که این پروتئین نه تنها میزان رشد و تولید اتانول را افزایش می‌دهد بلکه بر مقاومت آن در شرایط تنش‌زا مانند محیط حاوی مقادیر بالای اتانول تاثیر مطلوبی دارد [۲]. مطابق نتایج حاصل از شکل ۲ و ۳، اگرچه پروتئین‌های آلبومین و گلوبولین نسبت به نمونه‌ی شاهد بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه موثر هستند اما از نظر آماری در مقایسه با پروتئین کل هیدرولیز شدهی آمارانت دارای اثر کمتری بودند.

در شکل ۴ تاثیر مقادیر مختلف پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین کل آمارانت پس از ۳ ساعت هیدرولیز بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه در شرایط آزمایشگاهی نشان داده شده است. نتایج حاکی از آن است که با افزایش مقدار پپتید، رشد میکروارگانیسم‌های مذکور افزایش یافته و تمام تیمارها نسبت به نمونه‌ی شاهد به طور معنی‌داری باعث افزایش رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه گردید ( $P < 0,05$ ). پپتید موجود در محیط کشت با

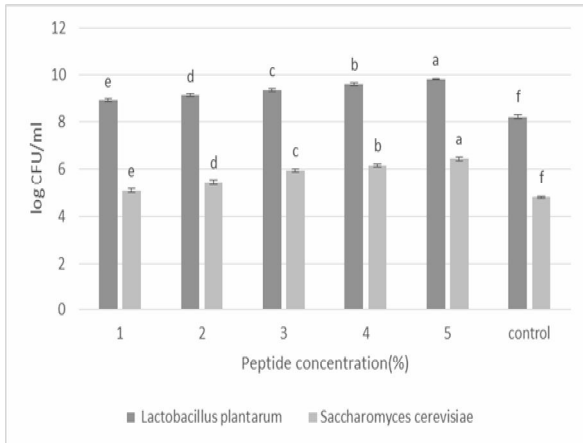


**Fig 1** Identification of albumin, globulin and total protein of amaranth plant using SDS-PAGE method

A: Lader, B: Total protein, C: Albumin T: Globulin

### ۳-۲- تاثیر پروتئین‌های هیدرولیز شده ی آمارانت بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتاروم و ساکارومایسس سرویزیه در شرایط آزمایشگاهی

شکل های ۲ و ۳ تاثیر پروتئین های آمارانت (پروتئین کل، گلوبولین و آلبومین) و پپتیدهای حاصل از آنها را در زمان های



**Fig 4** The effect of different amounts of amaranth peptides on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae*

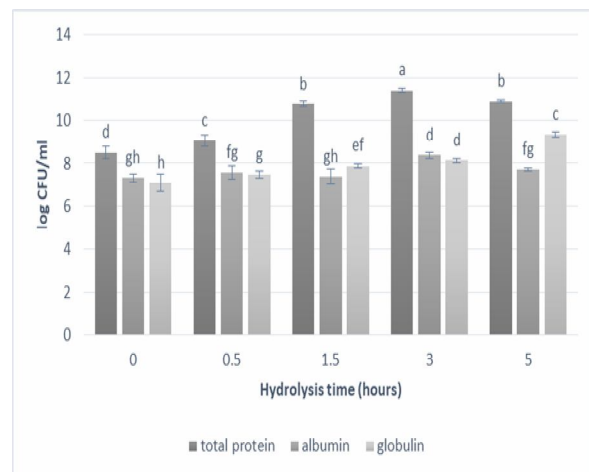
Zhang و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که قابلیت دسترسی راحت لاکتوباسیلوس‌ها به پپتیدهای کوچک نسبت به پلی-پپتیدها سبب رشد بیشتر آن‌ها می‌گردد که نتایج تحقیقات حاضر نیز با این بررسی مطابقت داشت [۲۶].

### ۳-۳- بررسی اثر پپتیدهای حاصل از پروتئین کل آمارانت بر ویژگی‌های خمیرترش

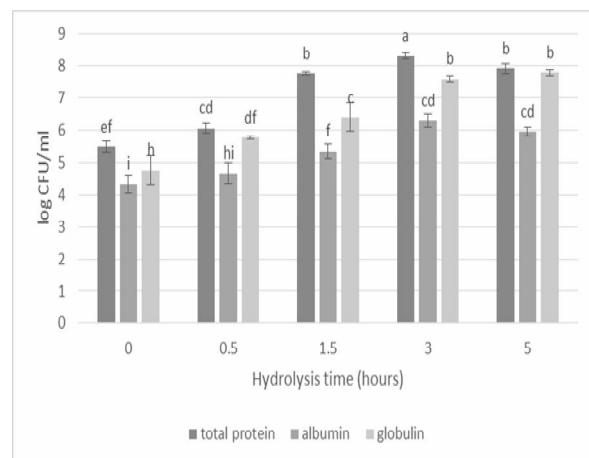
ویژگی‌های خمیرترش حاوی مقادیر مختلف ۱ - ۵٪ پپتید در جدول ۱ نشان داده شده است. pH اولیه خمیرترش حاوی مقادیر مختلف پپتید بین ۳/۶ تا ۵۳/۶ بود و پس از گذشت ۱۶ ساعت از زمان تخمیر این مقادیر بین ۰۵/۴ تا ۴۱/۴ متغیر بود. در زمان صفر pH در تمام تیمارها از نظر آماری معنی دار نبود اما پس از ۱۶ ساعت تیمارهای حاوی پپتید به جز خمیرترش حاوی ۱٪ پپتید نسبت به نمونه‌ی شاهد تفاوت معنی داری داشتند ( $P < 0.05$ ). خمیرترش حاوی ۵٪ پپتید و نمونه‌ی شاهد به ترتیب دارای بیشترین و کمترین pH بودند. اسیدیته قابل تیتراژ در روز اول در تمام نمونه‌ها تفاوت معنی داری نداشت اما پس از ۱۶ ساعت گرم‌خانه‌گذاری تمام نمونه‌ها نسبت به نمونه‌ی شاهد تفاوت معنی داری داشتند (جدول ۱) ( $P < 0.05$ ). با افزایش میزان پپتید میزان اسیدیته نیز افزایش می‌یابد و به این ترتیب نمونه‌ی حاوی ۵٪ پپتید بیشترین اسیدیته (۱۳/۸۸ میلی‌لیتر NaOH) را داشت ( $P < 0.05$ ). خاصیت بافری پپتیدها سبب شده است تا با افزایش پپتید، بر خلاف تغییرات جزئی pH، اسیدیته کل قابل تیتراژ افزایش یابد به طوری که اسیدیته خمیرترش حاوی ۵٪ پپتید (۸۸/۱۳ میلی‌لیتر NaOH) نسبت به شاهد

غلظت ۱٪ نسبت به شاهد منجر به رشد بیشتر باکتری گردید و رشد باکتری در حضور ۲٪ پروتئین هیدرولیز شده در زمان سه ساعت نسبت به میزان ۱٪ از نظر آماری معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). بیشترین رشد لاکتوباسیلوس پلاتناروم در محیط کشت حاوی ۵ درصد پپتید ( $8.9 \text{ Log CFU / mL}$ ) ثبت گردید ( $P < 0.05$ ).

بر اساس نتایج به دست آمده تمام مقادیر پپتید به طور معنی داری بر رشد مخمر مورد نظر تاثیر داشتند و با افزایش غلظت پپتید رشد مخمر افزایش یافت و به این ترتیب بیشترین شمارش ساکارومایسس سرویزیه در محیط کشت حاوی ۵ درصد پپتید ( $12.6 \text{ Log CFU / mL}$ ) به دست آمد ( $P < 0.05$ ).



**Fig 2** The effect of hydrolysis time (zero, 0.5, 1.5, 3 and 5 hours) of total protein, globulin and albumin amaranth on the growth of *Lactobacillus plantarum*



**Fig 3** The effect of hydrolysis time (zero, 0.5, 1.5, 3 and 5 hours) of total protein, globulin and albumin amaranth on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*

و همکاران (۲۰۱۱) بیان کردند که پروتئین هیدرولیز شده سبب رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و افزایش تولید اسید در طی فرایند تخمیر می‌گردد [۲۵]. تحقیق حاضر با این تحقیقات کاملاً مطابقت داشت.

بر اساس آزمایشات حسی انجام گرفته نان تولید شده از خمیرترش حاوی ۴ و ۵٪ پپتید دارای طعم اسیدی و نامطلوبی بودند و نان حاصل از خمیرترش حاوی ۳٪ پپتید در ۱۰۰ گرم خمیرترش به عنوان بهترین تیمار مورد بررسی قرار گرفت.

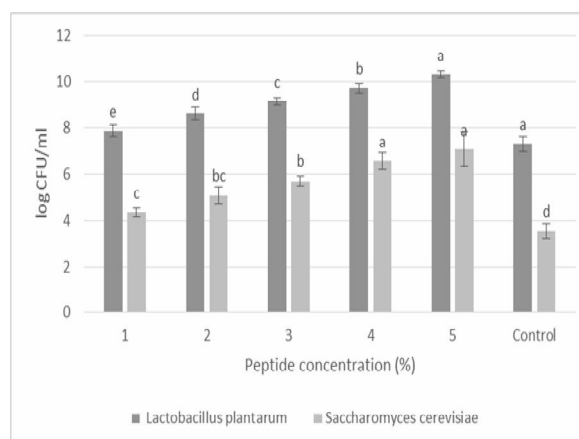
( $P < 0.05$ ) دارای تفاوت معنی داری بود (۲۹/۸mL NaOH) در شکل ۵ تاثیر غلظت پپتید حاصل از پروتئین کل آمارانت بر رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و ساکارومایسس سروزیه در خمیرترش بررسی شده است. مشاهدات نشان می‌دهد به طور کلی با افزایش مقدار غلظت پپتیدهای آمارانت در خمیرترش رشد لاکتوباسیلوس پلانتروم و ساکارومایسس سروزیه در خمیرترش افزایش می‌یابد. نمونه‌ی بدون پپتید (شاهد) نسبت به سایر تیمارها کمترین میزان رشد باکتری و مخمر را داشت و غلظت ۵٪ پپتید دارای بیشترین میزان بود ( $P < 0.05$ ). Duan.

**Table 1** The effect of amaranth total hydrolyzed protein concentration on pH and titratable acidity of sourdough at 0 and 16 hours

Peptide concentration (%)	Befor fermentation		16 hours after fermentation	
	pH	TTA	pH	TTA
1	6.30±0.11 <sup>a</sup>	1.67±0.09 <sup>a</sup>	4.09±0.04 <sup>e</sup>	9.36±0.05 <sup>c</sup>
2	1.75±0.10 <sup>a</sup>	1.75±0.02 <sup>a</sup>	4.19±0.02 <sup>d</sup>	10.89±0.00 <sup>d</sup>
3	1.82±0.17 <sup>a</sup>	1.82±0.03 <sup>a</sup>	4.25±0.02 <sup>c</sup>	11.51±0.09 <sup>c</sup>
4	1.88±0.15 <sup>a</sup>	1.88±0.05 <sup>a</sup>	4.32±0.03 <sup>b</sup>	12.95±0.14 <sup>b</sup>
5	1.90±0.10 <sup>a</sup>	1.90±0.01 <sup>a</sup>	4.41±0.02 <sup>a</sup>	13.88±0.21 <sup>a</sup>
Control	1.61±0.05 <sup>a</sup>	1.61±0.01 <sup>a</sup>	4.05±0.02 <sup>e</sup>	8.29±0.01 <sup>f</sup>

Different small superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

بیشتری بود. Liu و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند که پپتیدهای کوچک مولکول و اسیدهای آمینه‌ی آزاد در تولید اسیدلاکتیک و دی اکسید کربن توسط اسیدلاکتیک باکتری و مخمر نقش مهمی دارد [۱۶]. بنابراین حجم ویژه‌ی نان تشکیل شده از خمیر ترش حاوی پپتید (۳٪) منجر به افزایش رشد بیشتر مخمر و تولید دی اکسید کربن می‌گردد. نتایج حاصل از افزودن پپتید بر افت وزن و فعالیت آبی تیمارها در جدول ۲ نشان داد افت وزن نان حاوی پپتید (۷/۱۹٪) نسبت به شاهد (۹۶/۲۹٪) کمتر است ( $P < 0.05$ ). فعالیت آبی نان حاوی پپتید (۲/۸۸) نیز نسبت به نمونه‌ی شاهد (۳/۹۱) به طور معنی‌داری بیشتر بود اما بر خلاف آن میزان رطوبت آن کمتر اندازه‌گیری شد (۰۳/۲۴٪) ( $P < 0.05$ ). تحقیقات نشان می‌دهد که فعالیت پروتئاز آرد و آمیلاز در حین آماده‌سازی خمیر سبب کاهش pH می‌گردد [۴]. از طرف دیگر با افزایش فعالیت پروتئولیتیکی نان در حضور پپتیدها، آب آزاد با شبکه‌ی گلوتمی پیوند برقرار می‌کند. و به همین علت اگرچه میزان رطوبت نان حاوی پپتید بیشتر از نمونه‌ی شاهد است اما فعالیت آبی آن کمتر بوده و در نتیجه سرعت بیاتی را کند می‌کند.



**Fig 5** Effect of different concentrations of hydrolyzed amaranth protein on the growth of *Lactobacillus plantarum* and *Saccharomyces cerevisiae* in sourdough

### ۳-۴- بررسی خواص نان حاوی پروتئین‌های

#### هیدرولیز شده‌ی آمارانت

جدول ۲ نتایج حاصل از تاثیر پروتئین کل هیدرولیز شده بر افت وزن، رطوبت، حجم مخصوص و aw نان را نشان می‌دهد. همانطور که مشاهده می‌شود نان حاوی پپتید (۳٪) نسبت به نمونه‌ی شاهد (۴۶/۲) دارای حجم ویژه



**Table 2** The effect of amaranth (3%) total hydrolyzed protein on weight loss, moisture, specific volume, aw and enthalpy of bread

Properties	Bread prepared by		F
	Modified sourdough made by total hydrolyzed protein (3%)	Common sourdough	
Special volume	3.36±0.15	2.46 ± 0.20	t= 6.03, sig= 0.00
Weight loss (percentage)	19.7 ± 0.55	29.96 ± 1.56	t= -10.71, sig= 0.00
Humidity (percentage)	26.2 ± 0.80	24.03 ± 0.15	t= 4.6, sig= 0.00
aw	0.882 ± 0.010	0.913 ± 0.096	t= -3.86, sig= 0.01

Different small superscript indicate significant difference (P<0.05).

که در خمیرترش وجود دارند با تولید آنزیم‌ها سبب تجزیه‌ی نشاسته می‌شوند و از کریستالیزاسیون مجدد آن در نان جلوگیری می‌کنند و به این طریق سرعت بیاتی نان را کاهش می‌دهند [۲۸]. همچنین پپتیدهای آمارانت با نشاسته پیوند برقرار میکنند، که باعث کاهش اتصال نشاسته با مولکول‌های آب می‌شود و تجزیه مجدد نشاسته را کاهش می‌دهد و این امر می‌تواند علت کاهش بیاتی نان را توضیح دهد [۸]. این نتایج با تحقیقات Karimi و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۸].

تاثیر نان حاوی پپتید بر دمای شروع، حداکثر و نهایی در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که دمای شروع تبلور و دمای پایان در روز اول پس از پخت و همچنین ۵ روز پس از پخت در نان حاوی پپتید (۳٪) نسبت به شاهد کمتر بود ( $P < 0.05$ ). آنتالی نیز در روز اول و همچنین روز پنجم پس از پخت در نان حاوی پپتید (۳٪) نسبت به نمونه‌ی شاهد معنی دار بود ( $P < 0.05$ ). Corsetti و همکاران (۱۹۹۸) نشان دادند جهت تعیین میزان بیاتی نان می‌توان از آنتالی استفاده کرد به نحوی که با افزایش میزان آنتالی میزان بیاتی نان افزایش می‌یابد [۲۷]. سویه‌های اسیدلاکتیک باکتری‌ها

**Table 3** The effect of amaranth hydrolyzed protein on start temperature, peak temperature, end temperature and bread enthalpy

Properties	Bread prepared by		F
	Modified sourdough made by total hydrolyzed protein (3%)	Common sourdough	
Onset temperature ( 1 day)	32.13 ± 0.208	46.83 ± 1.96	t= -12.91, sig= 0.000
Pick temperature ( 1 day)	89.23 ± 0.90	93.1- ± 2.56	t= -2.48, sig= 0.068
Offset temperature( 1 day)	112.16 ± 3.05	124. 66 ± 1.41	t= -6.43, sig= 0.003
Enthalpy( 1 day)	124.13 ± 2.43	130.70 ± 1.30	t= -4.12, sig= 0.015
Onset temperature( 5 day)	47.06 ± 1.96	65.63 ± 2.15	t= -11.02, sig= 0.00
Pick temperature( 5 day)	64.90 ± 1.77	96.33 ± 2.10	t= -6.03, sig= 0.000
Offset temperature( 5 day)	100.96 ± 1.65	133.30 ± 0.91	t= -30.06, sig= 0.00
Enthalpy( 5 day)	150.60 ± 15.69	180.40 ± 4.55	t= - 3.15, sig= 0.03

Different small superscript indicate significant difference (P<0.05).

اثر رشد بیشتر اسید لاکتیک باکتری‌ها، عمر نگهداری نان افزایش می‌یابد و بیاتی به تاخیر می‌افتد و در نتیجه سفتی نان کاهش می‌یابد.

تاثیر بیوپپتیدهای حاصل از پروتئین آمارانت بر ویژگی‌های ظاهری نان در جدول ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود نان حاصل از خمیرترش حاوی پپتید (۳٪) از نظر ویژگی‌های ظاهری مانند فرم و شکل پخت، رنگ پوسته، عطر و طعم، قابلیت جویدن و پذیرش کلی نسبت به نان شاهد

نتایج حاصل از آزمون نفوذ برای نان حاوی پپتید و نمونه‌ی شاهد در جدول ۴ آمده است. نتایج نشان داد که به طور کلی با گذشت زمان سفتی نان افزایش می‌یابد و در روز پنجم بیشترین میزان سختی و انرژی در تیمارها مشاهده شد ( $P < 0.05$ ). اما نمونه‌های حاوی پپتید نسبت به نمونه‌ی شاهد دارای سفتی کمتری بودند و در نتیجه انرژی کمتری جهت ورود پروب مربوطه به نان نیاز بود ( $P < 0.05$ ). این نتایج با تحقیقات Guo و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت [۲۹]. آنها بیان کردند که در

امتیاز بیشتری توسط داوران کسب کرد ( $p < 0.05$ ) رنگ پوسته در اثر قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی در حضور حرارت مهمی دارند.

**Table 4** The effect of amaranth hydrolyzed protein (3%) on energy and bread hardness

Properties	Bread prepared by		F
	Modified sourdough made by total hydrolyzed protein (3%)	Common sourdough	
Hardness ( 1 day)	37.00±5.00	64.67±12.83	t= - 3.53, sig= 0.024
Energy (1 day)	129.33 ± 25.10	254.67± 28.36	t= - 5.73, sig= 0.005
Hardness ( 3 day)	88.33± 3.21	132.67± 10.26	t= - 7.14, sig= 0.002
Energy (3 day)	229.00± 32.14	342.67± 31.89	t= - 4.38, sig= 0.012
Hardness ( 5 day)	106.00 ± 7.81	192.67± 32.13	t= - 4.54, sig= 0.010
Energy (5 day)	512.67 ± 10.97	808.67 ± 20.23	t= - 22.27, sig= 0.000

Different small superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

هیدرولیز پروتئین صدف طعم نان را افزایش می‌دهد [۳۰]. همچنین، پپتیدها به دلیل افزایش رشد مخمر و اسید لاکتیک باکتری، تولید اسید لاکتیک و الکل را در خمیر ترش افزایش می‌دهند و در نتیجه نان طعم بهتری خواهد داشت [۲۰]. در خمیر ترش، لاکتوباسیلوس پلانٹاروم در حین تخمیر گلوتامین را گلوآمات و آلفا آمینوبوتریک اسید تبدیل می‌کند [۳۱]. رشد بیشتر لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و ساکارومایسس سرویزیه در خمیر ترش حاوی پپتید (۳٪) ممکن است در طعم بهتر نان نقش داشته باشد.

یکی از مهمترین و بیشترین اسیدهای آمینه‌ی آمارانت لیزین است به این علت نان حاوی پپتید آمارانت در اثر حرارت و انجام واکنش قهوه‌ای شدن غیر آنزیمی رنگ پوسته‌ی نان حاصل نسبت به نمونه‌ی شاهد بیشتر بود. حجم نان حاوی پپتید نیز به علت رشد بیشتر مخمر و در نتیجه افزایش میزان بیشتر گاز دی‌اکسیدکربن بالاتر بود. خمیر ترش حاوی پپتید (۳٪) باعث نرمی نان شده، قابلیت جویدن و پذیرش کلی نان را نسبت به شاهد بهبود می‌بخشد (جدول ۵) ( $p < 0.05$ ). نان حاوی پپتید (۳٪) نسبت به نان شاهد از نظر طعم و مزه امتیاز بالاتری داشتند. پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد از

**Table 5** Sensory analysis of breads fermented with different sourdough

Properties	Bread prepared by		F
	Modified sourdough made by total hydrolyzed protein (3%)	Common sourdough	
shape	4.80 ± 0.42	3.20 ± 0.91	t= 5.00, sig= 0.00
taste	4.7 ± 0.13	3.60 ± 0.16	t= 5.69, sig= 0.00
Crust color	4.90 ± 0.31	3.50 ± 0.85	t= 4.88 sig= 0.00
Ability to chew	4.5 ± 0.70	3.30 ± 0.94	t= 3.02 sig= 0.00
acidity	4.6 ± 0.16	3.4 ± 0.22	t=4.366; sig= 0.00
Overall acceptability	4.90 ± 0.31	3/00 ± 0.81	t= 6.86, sig= 0.00

Different small superscript indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

پروتئین کل هیدرولیز شده‌ی آمارانت بر رشد فلور میکروبی خمیر ترش و ویژگی‌های نان بود. پپتیدهای آمارانت حاصل از پروتئین کل تاثیر بسزایی بر رشد لاکتوباسیلوس پلانٹاروم و ساکارومایسس سرویزیه در محیط آزمایشگاهی و خمیر ترش داشتند. همچنین این نوع پپتید سبب افزایش حجم و اسیدیته قابل تیترو و کاهش سختی نان در مقایسه با نمونه شاهد گردید. نان تهیه شده از خمیر ترش اصلاح شده خواص حسی و ماندگاری بیشتری داشت و کیفیت آن بهبود یافت. با توجه به

## ۴- نتیجه گیری

استفاده از غذاهای عملگرا، مکمل‌های رژیمی و دارویی که حاوی پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های غذایی هستند، روز به روز در حال گسترش است و از جمله علل آن می‌توان به میزان پروتئین بالا، عملگرایی خوب، ترکیبات زیست فعال و مقدار کم عوامل ضد تغذیه‌ای اشاره نمود. نتایج این تحقیق نشان دهنده‌ی تاثیر غلظت پپتیدهای زیست فعال حاصل از که

- bread. *Food microbiology*, 24(2), 165-174.
- [7] Montoya-Rodríguez, A., Gómez-Favela, M. A., Reyes-Moreno, C., Milán-Carrillo, J., & González de Mejía, E. (2015). Identification of bioactive peptide sequences from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed proteins and their potential role in the prevention of chronic diseases. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 14(2), 139-158.
- [8] Karimi, N., Nikoo, M., Gavlighi, H. A., Gheshlaghi, S. P., Regenstein, J. M., & Xu, X. (2020). Effect of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) protein hydrolysates (SPH) and (-)-epigallocatechin gallate (EGCG) on sourdough and bread quality. *LWT*, 131, 109800.
- [9] Scilingo, A. A., Eugenia, S., Ortiz, M., Nora, E., & An, C. (2002). *Amaranth protein isolates modified by hydrolytic and thermal treatments . Relationship between structure and solubility*. 35, 855-862.
- [10] Silva-Sánchez, C., De La Rosa, A. B., León-Galván, M. F., De Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & De Mejía, E. G. (2008). Bioactive peptides in amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) seed. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(4), 1233-1240.
- [11] Amiri, S., Mokarram, R. R., Khiabani, M. S., Bari, M. R., & Khaledabad, M. A. (2022). Characterization of antimicrobial peptides produced by *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium lactis* BB-12 and their inhibitory effect against foodborne pathogens. *LWT*, 153, 112449.
- [12] Barba de la Rosa, A.P. Barba Montoya, A. Pedro Martínez-Cuevas, P. Hernández-Ledesma, B. León-Galván, M.F. De León-Rodríguez, A. and González, C. 2010. Tryptic amaranth glutelin digests induce endothelial nitric oxide production through inhibition of ACE: Antihypertensive role of amaranth peptides. *Nitric oxide*, 23, 106-111.
- [13] Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Li, J., Wu, F., Yang, N., and Xu, X. (2014). Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*, 7, 609-620.
- [14] Vermeulen, N., Gánzle, M. G., & Vogel, R. F. (2006). Influence of peptide supply and cosubstrates on phenylalanine metabolism of *Lactobacillus sanfranciscensis* DSM20451T and *Lactobacillus plantarum* TMW1.
- نتایج بالا ممکن است پروتئین هیدرولیز شده‌ی آمارانت به عنوان یک افزودنی طبیعی بر خمیرترش و نان موثر باشد.
- ### ۵- تقدیر و تشکر
- بخشی از هزینه های این مقاله توسط پژوهشکده زیست فناوری دانشگاه ارومیه تامین گردیده است.
- ### ۶- منابع
- [1] Delgado, M. C. O., Tironi, V. A., & Añón, M. C. (2011). Antioxidant activity of amaranth protein or their hydrolysates under simulated gastrointestinal digestion. *LWT - Food Science and Technology*, 44(8), 1752-1760.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.04.002>
- [2] Zhou, Y., Yang, H., Zong, X., Cui, C., Mu, L., & Zhao, H. (2018). Effects of wheat gluten hydrolysates fractionated by different methods on the growth and fermentation performances of brewer's yeast under high gravity fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 53(3), 812-818.
- [3] Falade, A. T., Emmambux, M. N., Buys, E. M., & Taylor, J. R. N. (2014). Improvement of maize bread quality through modification of dough rheological properties by lactic acid bacteria fermentation. *Journal of Cereal Science*, 60(3), 471-476.  
<https://doi.org/10.1016/j.jcs.2014.08.010>
- [4] Arendt, E. K., Ryan, L. A., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of bread. *Food Microbiology*, 24(2), 165-174.
- [5] Rabiei, S., Rezaei, M., Nikoo, M., Khezri, M., Rafieian-Kopai, M., & Anjomshoa, M. (2021). Antioxidant properties of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) protein hydrolysates prepared with enzymatic hydrolysis using a commercial protease and microbial hydrolysis with *Bacillus licheniformis*. *Food Science and Technology International*, 10820132211005297.
- [6] Acosta, C., Carpio, C., Vilcacundo, R., & Carrillo, W. (2016). Identification of proteins isolate from amaranth (*Amaranthus caudatus*) by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis with water and NaCl 0.1 m solvents. *Asian J. Pharm. Clin. Res*, 9(3), 331-334.
- Arendt, E. K., Ryan, L. A., & Dal Bello, F. (2007). Impact of sourdough on the texture of

- F. (2019). Assessing the sensitizing and allergenic potential of the albumin and globulin fractions from amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) grains before and after an extrusion process. *Medicina*, 55(3), 72.
- [24] Janssen, F., Pauly, A., Rombouts, I., Jansens, K. J., Deleu, L. J., & Delcour, J. A. (2017). Proteins of amaranth (*Amaranthus* spp.), buckwheat (*Fagopyrum* spp.), and quinoa (*Chenopodium* spp.): A food science and technology perspective. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(1), 39-58.
- [25] Duan, S., Zhang, Y. X., Lu, T. T., Cao, D. X., & Chen, J. D. (2011). Shrimp waste fermentation using symbiotic lactic acid bacteria. *Advanced Materials Research*, 194, 2156-2163.
- [26] Zhang, Q., Ren, J., Zhao, M., Zhao, H., Regenstein, J. M., Li, Y., & Wu, J. (2011). Isolation and characterization of three novel peptides from casein hydrolysates that stimulate the growth of mixed cultures of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(13), 7045-7053.
- [27] Corsetti, A., Gobbetti, M., Balestrieri, F., Paoletti, F., Russi, L., & Rossi, J. (1998). Sourdough lactic acid bacteria effects on bread firmness and staling. *Journal of Food Science*, 63(2), 347-351.
- [28] Fadda, C., Sanguinetti, A. M., Del Caro, A., Collar, C., & Piga, A. (2014). Bread staling: updating the view. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(4), 473-492.
- [29] Guo, L., Xu, D., Fang, F., Jin, Z., & Xu, X. (2020). Effect of glutathione on wheat dough properties and bread quality. *Journal of Cereal Science*, 96, 103116.
- [30] Vijaykrishnaraj, M., Roopa, B. S., & Prabhasankar, P. (2016). Preparation of gluten free bread enriched with green mussel (*Perna canaliculus*) protein hydrolysates and characterization of peptides responsible for mussel flavour. *Food Chemistry*, 211, 715-725.
- [31] Stromeck, A., Hu, Y., Chen, L., & Ganzle, M. G. (2011). Proteolysis and bioconversion of cereal proteins to glutamate and  $\gamma$ -aminobutyrate (GABA) in rye malt sourdoughs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(4), 1392-1399.
468. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(11), 3832-3839.
- [15] Katina, K., Arendt, E., Liukkonen, K. H., Autio, K., Flander, L., & Poutanen, K. (2005). Potential of sourdough for healthier cereal products. *Trends in Food Science & Technology*, 16(1-3), 104-112.
- [16] Liu, A., Jia, Y., Zhao, L., Gao, Y., Liu, G., Chen, Y., . . . Liu, S. (2018). Diversity of isolated lactic acid bacteria in Ya'an sourdoughs and evaluation of their exopolysaccharide production characteristics. *Lwt*, 95, 17-22. 435 doi:10.1016/j.lwt.2018.04.061
- [17] Cagno, R.D. Angelis, M.D. Lavermicocca, P. Vincenzi, M.D. Giovannini, C. and Faccia, M. 2002. Proteolysis by Sourdough Lactic Acid Bacteria: Effects on Wheat Flour Protein Fractions and Gliadin Peptides Involved in Human Cereal Intolerance. *Applied environmental microbiology*. 68(2), 623-633.
- [18] Meignen, B., Onno, B., Gelinis, P., Infantes, M., Guilois, S., & Cahagner, B. (2001). Optimization of sourdough fermentation with *Lactobacillus brevis* and baker's yeast. *Food Microbiology*, 18(3), 239-245.
- [19] Phimolsiripol, Y., Siripatrawan, U., Tulyathan, V., & Cleland, D. J. (2008). Effects of freezing and temperature fluctuations during frozen storage on frozen dough and bread quality. *Journal of Food Engineering*, 84(1), 48-56.
- [20] Yu, Yafang, Li Wang, Haifeng Qian, Hui Zhang, Yan Li, Gangcheng Wu, Xiguang Qi, Meijuan Xu, and Zhiming Rao. 2019. "Effect of Selected Strains on Physical and Organoleptic Properties of Breads." *Food Chemistry* 276: 547-53. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.10.048>
- [21] Torrieri, E., Pepe, O., Ventrino, V., Masi, P., & Cavella, S. (2014). Effect of sourdough at different concentrations on quality and shelf life of bread. *LWT - Food Science and Technology*, 56(2), 508-516.
- [22] Chinma, C. E., Anuonye, J. C., Ocheme, O. B., Abdullahi, S., Oni, S., Yakubu, C. M., & Azeez, S. O. (2016). Effect of acha and bambara nut sourdough flour addition on the quality of bread. *LWT*, 70, 223-228.
- [23] Cárdenas-Torres, F. I., Reyes-Moreno, C., Vergara-Jiménez, M. D. J., Cuevas-Rodríguez, E. O., Milán-Carrillo, J., Gutiérrez-Dorado, R., ... & Cabrera-Chávez,



## The effect of biopeptides of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus*) on quality of Baguette bread

Karimi, N. <sup>1</sup>, Zeynali, F. <sup>2\*</sup>, Rezazad Bari, M. <sup>3</sup>, Nikoo, M. <sup>4</sup>, Mohtarami, F. <sup>5</sup>, Kadivar, M. <sup>6</sup>

1. PhD Student, Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

2. Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

3. Professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

4. Associate Professor, Department of Pathobiology, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran.

5. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Urmia University, Urmia, Iran.

6. Professor, Department of Food Science and Technology, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received 2021/ 09/ 20

Accepted 2022/ 01/ 01

#### Keywords:

Amaranth,  
Hydrolyzed protein,  
Sourdough,  
Bread characteristics.

**DOI:** 10.52547/fsct.19.122.101

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1401.19.122.16.9

\*Corresponding Author E-Mail:  
f.zeynali@urmia.ac.ir

### ABSTRACT

Bioactive peptides are special protein components that have a significant effect on human body function. In this study, the effect of proteins and peptides resulting from the hydrolysis of amaranth proteins (total protein, albumin, and globulin) at levels 1 to 5% and different hydrolysis times (0.5, 1.5, 3, and 5 hours) on the properties of sourdough and the quality of bread were investigated. The results showed that the peptides obtained by hydrolysis of total amaranth protein in 3 hours had the greatest effect on the growth of *Lactobacillus Plantarum* (PTCC 1896) (11.40 Log CFU / mL) and *Saccharomyces cerevisiae* (PTCC 5052) (8.32 Log CFU / mL) in vitro. These microbes are the main flora of sourdough and different amounts of peptides on their growth were statistically significant compared to the control sample. The titratable acidity and pH after 16 hours of fermentation at 30 ° C in the wet dough containing 5% peptide were 13.33 mL NaOH and 4.6, respectively, which was higher than other treatments. The highest amount of water activity, specific volume, titratable acidity, and the lowest enthalpy in bread was prepared from sourdough containing 3% peptide. Therefore, bread made from sourdough containing 3% peptides was selected as the best treatment to increase the quality of bread.