جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۴ شماره ۳/ سال ۱۳۹۳

اثر خمیرترش و اسیدی‌کردن شیمیایی خمیر بر الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های پلیمری گلوتن گندم

سیدهادی پیغمبردوست[1*]، مهسا پورامینی[2]، ابوالفضل گلشن تفتی[3] و مصطفی ولیزاده[4]

تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۳/۷/۱٤

[1] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[2] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[3] استادیار بخش تحقیقات فنی و مهندسی کشاورزی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی کرمان
[4] استاد گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[*] مسئول مکاتبه: Email: peighambardoust@tabrizu.ac.ir

چکیده

تجزیهٔ پروتئین‌های گلوتن گندم در طول فرآیند تخمیر خمیرترش در کیفیت نان نقش بسزایی دارد. در این پژوهش، اثر اسیدی کردن بیولوژیکی و شیمیایی بر الگوی الکتروفورزی گلوتن گندم مورد بررسی قرار گرفت. خمیرترش با دو نوع آرد تیره و روشن و با افزودن کشت فعال لاکتوباسیلوس پلانتاروم، لاکتوباسیلوس روتری و مخلوط آن‌ها (۱۰۷ cfu/g) تهیه شد و خمیر ترش حاصله به میزان ۲۰ درصد به خمیر اضافه گردید. اسیدی کردن شیمیایی خمیر با مخلوط اسید استیک و اسید لاکتیک انجام شد. فرآیند هیدرولیز با استفاده از تکنیک الکتروفورزSDS-PAGE مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل از الکتروفورز نشان داد که میزان شکستن پروتئین در نمونه‌های خمیرترش تهیه شده با آرد تیره به مراتب بیشتر از نمونه‌های حاوی آرد روشن بود. استفاده از خمیرترش حاصل از آرد تیره به میزان ۲۰ درصد در تهیهٔ خمیر نان به دلیل بالا بودن فعالیت پروتئولیتیک آنزیم‌های آرد منجر به هیدرولیز زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا گردید. لاکتوباسیل‌ها به‌ویژه لاکتوباسیلوس پلانتاروم با تولید اسیدهای آلی و ایجاد شرایط اپتیمم برای فعالیت پروتئازهای آرد، باعث هیدرولیز گلوتنین‌ها شدند. اسیدی کردن شیمیایی نیز منجر به هیدرولیز زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا در خمیر آردهای روشن و تیره گردید.

واژگان کلیدی: الکتروفورز، خمیرترش، اسیدی کردن شیمیایی، پروتئین گلوتن گندم

مقدمه

فرآیند تخمیر خمیرترش از قدیمی‌ترین روش‌های بیوتکنولوژی است که از دیرباز برای تولید نان‌های چاودار و گندم مورد استفادهٔ بشر بوده است (آرنت و همکاران ۲۰۰۷ و گنزل و همکاران ۲۰۰۸). خمیرترش، خمیر حاصل از مخلوط آرد و آب است که توسط میکروارگانیسم‌ها تخمیر شده است. استفاده از خمیرترش در تولید نان گندم باعث بهبود خصوصیات

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

خمیر و نیز عطر و طعم و بافت نان شده، فرآیند بیاتی را به تأخیر انداخته و از فساد میکروبی در نان جلوگیری می‌کند (کاتینا و همکاران ۲۰۰۲ و هانسن و شیبرله ۲۰۰۵). فرآیند تخمیر خمیرترش در بهبود ارزش تغذیه‌ای فرآورده‌های غلات و جلوگیری از قابلیت دسترسی زیستی نشاسته نیز مؤثر است (کاتینا و همکاران ۲۰۰۶ و گوسمن و همکاران ۲۰۰۷). فلور میکروبی خمیرترش عموماً حاوی مخمرها و باکتری‌های اسید لاکتیک بوده و اثر متقابل این میکروارگانیسم‌ها برای فعالیت متابولیکی آن حائز اهمیت است (دیوویست و وانکانیت ۲۰۰۷). بیش از ۵۰ گونه از باکتری‌های اسید لاکتیک (عمدتاً جنس لاکتوباسیلوس) و بیش از ۲۰ گونه از انواع مخمر (مخصوصاً جنس‌های ساکارومایسس و کاندیدا) در اکوسیستم خمیرترش وجود دارند (ایاکومین و همکاران ۲۰۰۹). باکتری‌های اسید لاکتیک درنحوهٔ متابولیسم کربوهیدرات بسیارمتنوع عمل کرده ولی عمدتاً به دو گروه هموفرمنتاتیو و هتروفرمنتاتیو طبقه‌بندی می‌شوند. باکتری‌های هموفرمنتاتیوعمدتاً اسیدلاکتیک تولید کرده ولی هتروفرمنتاتیوها علاوه بر اسیدلاکتیک مقادیر قابل توجهی اسیداستیک نیز تولید می‌کنند (دکوک و کاپله ۲۰۰۵).

پروتئین گلوتن گندم از دو جزء گلوتنین و گلیادین تشکیل شده است. گلیادین‌ها، پروتئین‌های مونومری هستند که توسط پیوندهای دی سولفید بین مولکولی شکل می‌گیرند. این پروتئین‌ها الاستیسیتهٔ کمتری داشته و در ویسکوزیته خمیر شرکت دارند (ونگ و همکاران ۲۰۰۷) .گلوتنین‌ها، پروتئین‌های پلیمری هستند که زیرواحدهای آن‌ها توسط پیوندهای دی‌سولفید بین مولکولی به هم اتصال یافته‌اند، اگرچه در آن‌ها پیوندهای خارج مولکولی نیز وجود دارد. گلوتنین‌ها برخلاف گلیادین‌ها، چسبنده و الاستیک بوده و مسئول قوت خمیر و الاستیسیتهٔ آن هستند (گنزل و همکاران ۲۰۰۷). گلوتنین‌ها به اجزاء با وزن مولکولی بالا[1] و وزن مولکولی پایین[2] طبقه‌بندی می‌شوند. پروتئین‌های گلوتن روی خواص نانوایی خمیر تأثیر دارند. در هنگام تشکیل خمیر، گلوتنین‌ها و گلیادین-ها تشکیل شبکهٔ گلوتنی داده که می‌تواند گاز دی-اکسیدکربن را در خود نگه دارد. تغییرات جزئی در ساختار گلوتن ممکن است باعث تغییرات قابل توجهی در خواص خمیر شود (لوپونن و همکاران ۲۰۰٤). خواص رئولوژیکی خمیر گندم و حجم نان تحت تأثیر پروتئین-های گلوتنین با وزن مولکولی بالا قرار دارد (ونگ و همکاران ۲۰۰۷).

باکتری‌های اسید لاکتیک در طول فرآیند تخمیر خمیرترش نقش کلیدی داشته و با تولید اسیدهای آلی (عمدتاً اسید لاکتیک) باعث اسیدی شدن سریع خمیرترش می‌شوند. باکتری‌های اسیدلاکتیک دارای فعالیت پروتئولیتیک بوده و با آزاد کردن اسیدهای آمینه و پپتیدهای کوچک (گوبتی و همکاران ۲۰۰۵)، نه تنها در رشد و فعالیت متابولیکی سایر میکروارگانیسم‌ها، بلکه در گسترش عطر وطعم نان نقش دارند (گنزل و همکاران ۲۰۰۷). مخمرها و آرد غلات نیز دارای آنزیم‌های پروتئیناز و پپتیداز بوده که می‌توانند در پروتئولیز نقش داشته باشند (گوسمن و همکاران ۲۰۰۷). تئوری‌های متناقضی در مورد منشأ فعالیت پروتئولیتیک در سیستم خمیرترش وجود دارد. بسیاری از محققین معتقدند پروتئولیز در خمیرهای ترش اساساً ناشی از pH پایین و فعالیت پروتئازهای درونی آرد در نتیجهٔ تشکیل اسید توسط باکتری‌های اسید لاکتیک رخ می‌دهد (ویزر و همکاران ۲۰۰۸). شرایط اسیدی موجود در خمیرترش، نه تنها حلالیت پروتئین‌ها را افزایش می‌دهد، بلکه یک محیط ایده‌آل از نظر تطابق pH با پروتئینازهای آسپارتیک غلات فراهم می‌کند. پروتئینازهای آسپارتیک، فعال‌ترین گروه پروتئیناز موجود در خمیرترش می‌باشند (لوپونن و همکاران ۲۰۰٤). اسیدهای آلی نیز باعث تغییراتی در ساختار خمیر می‌شوند. وهلر و همکاران (۱۹۹۷) گزارش کردند که خمیرهای حاوی اسیدهای استیک و سیتریک

[1]- HMW

[2]- LMW

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

در هنگام مخلوط‌کردن پایداری کمتری داشته و نسبت به خمیرهای بدون اسید، ویسکوزتر بودند.

تکنیک الکتروفورز ژل پلی‌آکریل‌آمید دودسیل سولفات سدیم (SDS-PAGE) از جمله روش‌هایی است که معمولاً برای جداسازی و شناسایی پروتئین‌های ذخیره‌ای گندم مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش برای تعیین ترکیب گلوتنین‌های با وزن مولکولی پائین یا بالا (به‌منظور بررسی تغییرات انجام‌گرفته در پروتئین‌ها در هنگام مخلوط‌کردن خمیر، پخت و یا در طول نگهداری) مورد استفاده قرار گرفته است (بین و لوخارت ۲۰۰۰ و گوسمن و همکاران ۲۰۰۷). ژل الکتروفورز می‌تواند اطلاعاتی دربارهٔ وزن مولکولی و بارهای پروتئینی ارائه نماید (ورنر ۱۹۹۵). به‌هرحال خمیرترش یک سیستم بیولوژیکی پیچیده‌ای است و مطالعهٔ تغییرات صورت‌گرفته در پروتئین‌های پلیمری گلوتن در طول فرآیند تخمیر خمیرترش می‌تواند اطلاعات مفیدی را در زمینهٔ فرآیند تهیه نان با استفاده از خمیرترش ارائه دهد. در این پژوهش سعی شده است که شرایط بهینه برای آزمون الکتروفورز و با در نظر گرفتن عوامل مختلف مورد بررسی قرار گرفته و بهترین شرایط این تکنیک معرفی شود. همچنین تأثیر فرآیند تخمیر خمیرترش و اسیدی‌کردن شیمیایی بر ساختار پروتئین‌های گلوتن با استفاده از روش الکتروفورز SDS-PAGE بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

آرد

در این پژوهش از دو نوع آرد تیره با درجه استخراج ۸۳ و آرد روشن با درجه استخراج ٥٦ درصد از یک نوع گندم داخلی (واریته مغان) برای تهیهٔ خمیرترش استفاده شد. تنها تفاوت نمونه‌های مورد بررسی در درصد استخراج (میزان سبوس گیری) آن‌ها و نه در نوع گندم بود. گندم‌ها در کارخانه آرد اطهر (مراغه) تبدیل به آرد شدند. ترکیب شیمیایی آردها در جدول ۱ نشان داده شده است. آزمون فارینوگراف آردهای مورد بررسی بر طبق روش AACC به شماره ۲۱-٥٤ انجام شد.

تهیهٔ سوسپانسیون باکتری

لاکتوباسیلوس‌های پلانتاروم ۱۰۵۸ ATCC[1] (باکتری هتروفرمنتاتیو اختیاری) و *روتری* ۱٦٥٥ ATCC (باکتری هتروفرمنتاتیو اجباری) از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی و عفونی ایران[2] تهیه شدند. باکتری‌ها دو بار در محیط کشت MRS broth در دمای ۳۷°C به مدت ۲٤ ساعت کشت و گرمخانه‌گذاری گردیدند. تودهٔ سلولی با سانتریفوژ کردن کشت‌های باکتریایی در دور ۸۰۰۰×g و به مدت ۱۰ دقیقه، شستشو با آب مقطر استریل و سانتریفوژ کردن مجدد به‌دست آمد.

تهیهٔ خمیرترش

خمیرترش با راندمان خمیر (DY[3]) ۲۰۰ از آردهای روشن و تیره با استفاده از کشت‌های فعال باکتری‌های *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*، لاکتوباسیلوس روتری و مخلوط آن‌ها به میزان 10^7 باکتری به ازاء هر گرم خمیر تلقیح و تهیه شد. فرآیند تخمیر در دمای ۳۰°C و به مدت ۲٤ ساعت در یک انکوباتور شیکردار انجام شد. نمونه‌های خمیرترش حاوی لاکتوباسیل‌ها و مخلوط آن‌ها به میزان ۲۰ درصد (وزن آرد) در فرمولاسیون خمیر مورد استفاده قرار گرفتند. مقدار افزودن ۲۰ درصد بر اساس وزن مرطوب آرد بهترین نتایج را ازلحاظ کیفیت حسی محصول نهایی به همراه دارد (پیغمبردوست و همکاران ۱۳۸۹). خمیرهایی نیز از آردهای روشن و تیره بدون خمیرترش تهیه شدند. از مخلوط اسیدهای استیک و لاکتیک به نسبت مولی ۱ به ٤ و تنظیم pH در ٤/۳ برای تهیهٔ خمیرهای کنترل استفاده شد (ریزلو و همکاران ۲۰۰٦). به فرمولاسیون خمیر ۱ درصد بهبود دهنده و ۲ درصد نیز نمک طعام اضافه گردید. در این مطالعه به منظور حذف اثرات احتمالی مداخلهٔ مخمر، از آن استفاده

[1] American Type Culture Collection
[2] Persian Type Culture Collection (PTCC)
[3] Dough Yield

نشد. خمیرها پس از تهیه و تخمیر به‌روش غوطه‌وری در ازت مایع منجمد و در فریزر ۲۵- درجهٔ سانتی‌گراد برای آزمون‌های بعدی نگهداری شدند.

آزمون الکتروفورز

برای انجام آزمون الکتروفورز، نمونه‌های خمیر با دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک شده و پس از پودر شدن، در بسته‌های غیرقابل‌نفوذ به رطوبت تا انجام آزمایش‌های بسته‌بندی شدند. آزمون الکتروفورز به روش لاملی (۱۹۷۰) با کمی تغییرات برای یافتن شرایط بهینه برای آزمون الکتروفورز به شرح ذیل انجام شد.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی آردهای مصرفی*

نوع آرد	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)	**درجه استخراج (٪)**	پروتئین خام (٪)	گلوتن مرطوب (٪)
آرد تیره	۱۱/۸۸	۰/۸۸	**۸۳**	۱۱/۵۰	۲۷/۱
آرد روشن	۱۲/۶۰	۰/۴۲	**۵۶**	۱۱/۲۵	۲۶/۰

* داده‌ها میانگین سه تکرار هستند. نتایج بر اساس ۱۴٪ رطوبت آرد می باشند.

تعیین غلظت محلول پلی‌آکریل آمید

برای حصول بهترین ژل با اندازهٔ منافذ مناسب از مخلوط آکریل‌آمید (مقادیر۱۶/۲۴گرم، ۱۸ گرم و۲۰ گرم و بیس‌آکریل‌آمید (به نسبت ۹۵ و ۵ درصد) استفاده شد.

تعیین محلول رنگ آمیزی ژل

دو محلول رنگ‌آمیزی به‌شرح زیر تهیه گردیدند: الف) ۳۷۵ میلی‌گرم آبی کوماسی در یک ارلن کوچک ریخته شد و به آن ۲۵۰ میلی لیتر متانول مطلق اضافه گردید. محلول حاصله به مدت ٤ ساعت با بهم زن مغناطیسی به هم زده و سپس صاف شد. محلول دیگر حاوی ٦٠ گرم TCA و ۱۲۵ میلی لیتر آب مقطر بود. محلول‌های فوق همراه با ۸۷/۵ میلی‌لیتر اسید استیک گلاسیال در بالون ژوژهٔ یک لیتری ریخته و سپس به حجم رسانده شدند. ب) محلول رنگ‌آمیزی دوم شامل ١٤٤ میلی‌گرم آبی کوماسی، ٦٠ میلی‌لیتر متانول، ٢٤ میلی‌لیتر اسید استیک و٦٠ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر بود که به مدت ٦ ساعت بهم زده شد.

تعیین مقدار نمونهٔ تزریق شده به درون چاهک‌ها

مقادیر۱۰ میکرولیتر و ۲۰ میکرولیتر از نمونه به درون چاهک‌ها تزریق گردید و اثر این مقادیر روی باندهای پروتئینی در ژل بررسی شد.

آزمون تعیین شدت جریان

از شدت جریان‌های ۲۸، ۳۰ و۳۲ میلی‌آمپر برای آزمون الکتروفورز استفاده شد. همچنین شدت جریان‌های ثابت و متغیر که با دو دستگاه مختلف ایجاد می‌شدند، نیز مورد مقایسه قرار گرفتند.

تعیین مدت زمان رنگ بری

در این آزمون، زمان‌های ۷-٦ ساعت و ١٤-١٢ ساعت برای رنگ‌بری ژل مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

ویژگی‌های فارینوگرافی آردهای مصرفی در جدول ۲ نشان داده شده است. آردهای تیره و روشن از لحاظ ویژگی‌های فارینوگرافی اختلاف معنی‌داری با یکدیگر داشتند. افزایش درصد استخراج آرد منجر به افزایش درصد جذب آب آرد شد به‌طوریکه میزان آن از ٥٥/٥ درصد در آرد روشن به ٦٥/٥ درصد در آرد تیره افزایش یافت. مقدار جذب آب آرد تابع عوامل مختلفی است که مهم‌ترین آن‌ها مقدار پروتئین و درجهٔ استخراج آرد است. بنابراین هر قدر میزان پروتئین و درجهٔ استخراج آرد بالاتر باشد، مقدار جذب آب هم افزایش می‌یابد. پایداری خمیر نیز با افزایش میزان استخراج آرد کاهش ولی میزان نرم‌شدن خمیر افزایش یافت. به‌هرحال تغییر در ویژگی‌های فارینوگرافی ممکن است به دلیل

اختلاف در بخش اندوسپرم مابین آردهای با میزان استخراج مختلف باشد.

جدول ۲- ویژگی‌های فارینوگرافی آردهای مورد استفاده

نوع آرد	جذب آب (٪)	زمان گسترش خمیر (دقیقه)	پایداری خمیر (دقیقه)	نرم شدن خمیر (BU)
آرد تیره	٦٥/٥^{a}	١/٧^{b}	٦/٤^{b}	٥٤^{a}
آرد روشن	٥٥/٥^{b}	٢/٢^{a}	١٠/٦^{a}	٤٠^{b}

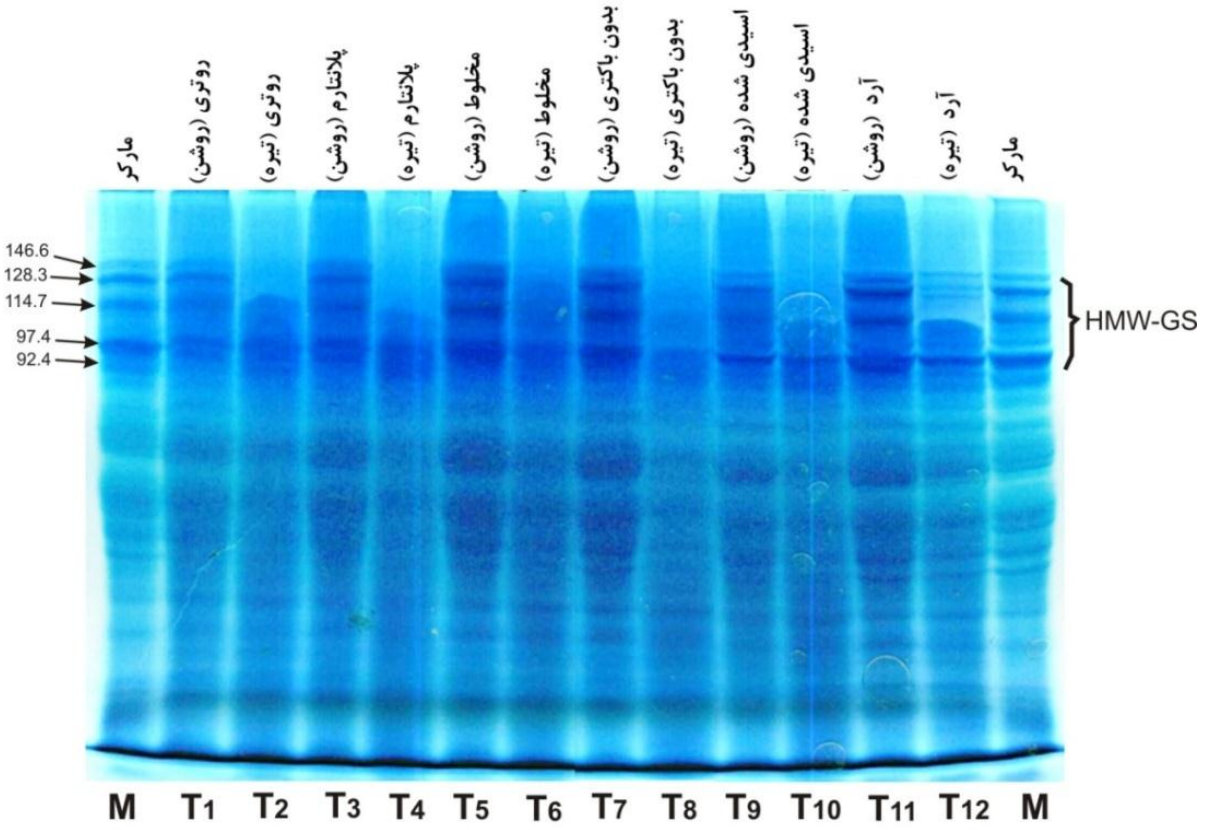
در هر ستون میانگین‌هایی که دارای حروف غیرمشترک هستند بنابر آزمون دانکن اختلاف معنی‌داری با هم دارند ($p<0.05$)

تعیین شرایط اپتیمم برای الکتروفورز خمیرترش

مخلوط ۲۰ گرم آکریل‌آمید و بیس‌آکریل‌آمید (به نسبت ۹۵ و ۵ درصد) ژل مقاوم با اندازهٔ منافذ مناسب برای جداسازی گلوتنین‌ها فراهم کرد. در خصوص محلول رنگ‌آمیزی ژل، محلول ب (محلول حاوی ١٤٤ میلی‌گرم آبی کوماسی) باندهای پروتئینی ایجاد شده را به رنگ آبی تیره رنگ‌آمیزی کرد که پس از رنگ‌بری به سرعت رنگ خود را از دست نداد. با این محلول، باندهای پروتئینی واضح تر مشاهده شد و آنالیز ژل راحت‌تر انجام گرفت. تزریق ۱۰ میکرولیتر نمونه به درون چاهک، باندهای پروتئینی کمی را روی ژل ایجاد کرد. به‌هرحال به دلیل اینکه احتمالاً مقدار پروتئین در نمونه‌های خمیرترش نسبتاً زیاد بود، تزریق مقدار بیشترنمونه به درون چاهک (۲۰ میکرولیتر)، نتیجهٔ بهتری داد. استفاده از شدت جریان پائین (۲۸ میلی‌آمپر) و متغیر برای الکتروفورز نمونه‌های خمیرترش مناسب‌تر بود. در شدت جریان‌های بالاتر (۳۰ و ۳۲ میلی‌آمپر)، مدت زمان الکتروفورز کاهش یافت و جداسازی باندها با دقت کمتری انجام شد. مقایسهٔ دو حالت رنگ‌بری به مدت ١٤-١٢ ساعت و ٧-٦ ساعت نیز نشان داد که استفاده از زمان کوتاه‌تر نتیجهٔ بهتری در پی دارد. ژل‌های آماده، پس از رنگ‌بری در داخل آب مقطر قرار داده شده که به مرور زمان کم‌رنگ‌تر شدند. بنابراین بهتر است رنگ‌بری به طور کامل انجام نشود تا در طی مدت نگهداری نیز با از دست‌رفتن تدریجی رنگ ژل، آنالیز با مشکل مواجه نگردد.

اثر خمیرترش و اسیدی شدن شیمیایی روی الگوی الکتروفورزی پروتئین‌های گلوتن

تغییراتی که در پروتئین‌های گلوتن در طول فرآیند تخمیر خمیرترش حاصل از دو نوع آرد (تیره و روشن) صورت گرفته در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- آزمون الکتروفورز SDS-PAGE پروتئین‌های گلوتن در خمیرترش‌های اسیدی شدهٔ شیمیایی و بیولوژیکی حاصل از آردهای تیره و روشن

(مارکر مولکولی سیگما و واحد آن KDa است)

با مقایسهٔ نمونهٔ T_1 (خمیر آرد روشن حاوی ۲۰ درصد خمیرترش دارای *لاکتوباسیلوس روتری*) با نمونهٔ T_{11} (کنترل) می‌توان دریافت که این نمونه حاوی تمام زیرواحدهای با وزن مولکولی بالای موجود در نمونهٔ کنترل بوده و بنابر این هیدرولیز محسوسی در چنین خمیری صورت نگرفته است. این زیرواحدها دارای وزن‌های مولکولی kDa ۱٤٦/٦، ۱۲۸/۳، ۱۱٤/۷، ۹۷/٤، ۹۲/٤ بودند. تیمار T_2 (خمیر آرد تیره حاوی ۲۰ درصد خمیرترش دارای *لاکتوباسیلوس روتری*) دارای زیرواحدهای گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا با وزن‌های مولکولی kDa ۹۷/٤، ۹۲/٤ بود. تعداد باندهای پروتئینی موجود در این نمونه نسبت به نمونهٔ کنترل (T_{12}) کمتر بود (شکل ۱). عدم وجود یک باند پروتئینی روی ژل نشان‌دهندهٔ آن است که پروتئین مذکور تجزیه شده و در محیط ژل وجود ندارد. وقتی حلالیت گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا در محلول عصاره‌گیر SDS کاهش می‌یابد، از محیط خارج می‌شوند. این مطلب بیانگر آن است که میزان پلیمریزاسیون گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا کاهش می‌یابد. تیل و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کردند که دپلیمریزاسیون پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا تحت شرایط اسیدی صورت گرفته و درشرایط خنثی امکان‌پذیر نیست.

با مقایسهٔ الگوی الکتروفورزی دو تیمار T_1 و T_2 می‌توان دریافت که هیدرولیز زیرواحدهای گلوتنین با وزن مولکولی بالا فقط در خمیرهای آرد تیره حاوی ۲۰ درصد خمیرترش صورت گرفته است. با توجه به این‌که آغازگر

به کار رفته در تهیهٔ خمیرترش با دو آرد تیره و روشن یکسان بوده و شرایط تهیهٔ هر دو نوع خمیرترش نظیر بازدهی خمیر، دما و زمان تخمیر نیز یکسان بوده است، بنابر این به احتمال قوی درصد استخراج آرد در میزان هیدرولیز پروتئین‌ها در خمیرترش نقش داشته است. آردهای با درصد استخراج بالا دارای میزان سبوس و خاکستر بیشتری هستند. سبوس گندم حاوی موادمعدنی و میکرونوترینت‌هایی است که برای رشد باکتری‌های اسید لاکتیک مهم است. از سوی دیگر، با افزایش درصد استخراج آرد، ظرفیت بافری سیستم خمیرترش نیز افزایش یافته که نتیجهٔ آن فعالیت بیشتر باکتری‌ها در خمیرترش و تولید بیشتر اسیدهای آلی می‌باشد (هانسن و هانسن ۱۹۹٤ و دکوک و کاپله ۲۰۰۵). البته وجود مقادیر بیشتر آنزیم‌های درون‌زیست آرد در آردهای تیره (درجه استخراج بالا) دلیل دیگر هیدرولیز بیشتر در نمونه‌های حاوی آرد تیره است.

نمونهٔ T_3 (خمیر آرد روشن حاوی ۲۰ درصد خمیرترش دارای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) نسبت به نمونهٔ کنترل دارای باندهای پروتئینی کم‌رنگ‌تری در قسمت گلوتنین با وزن مولکولی بالا بود (شکل ۱). به‌هرحال چنین به‌نظر می‌رسد که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در هیدرولیز برخی از گلوتنین‌ها در آرد روشن نقش داشته است. کاتینا و همکاران (۲۰۰۲) گزارش کردند که *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* در مقایسه با سایر لاکتوباسیل‌های موجود در خمیرترش بیشترین میزان اسید را تولید کرده و باعث کاهش سریع‌ترpH و ایجاد شرایط مناسب برای فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک گندم شده است.

نمونهٔ T_4 (خمیر آرد تیره حاوی ۲۰ درصد خمیرترش دارای *لاکتوباسیلوس پلانتاروم*) مشابه نمونهٔ T_2 دارای باندهای پروتئینی کمتری در قسمت گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا بود. گلوتنین‌های HMW با وزن‌های مولکولی بالاتر در این نمونه ناپدید شده بودند و تنها باندهای با وزن‌های مولکولی kDa ۹۷/٤، ۹۲/٤ قابل مشاهده بودند (شکل ۱). با مقایسهٔ الگوی الکتروفورزی خمیرترش‌های تهیه شده از آردهای تیره و روشن با آغازگر *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* (T_3و T_4) می‌توان دریافت که میزان هیدرولیز پروتئین‌های گلوتنین در خمیرترش حاصل از آرد تیره بیشتر از آرد روشن بوده است. در خصوص خمیرترش‌های حاصل از مخلوط *لاکتوباسیلوس پلانتاروم* و *لاکتوباسیلوس روتری* (T_5و T_6) و همچنین نمونه‌های بدون باکتری (T_7وT_8)، میزان هیدرولیز در نمونه‌های تهیه شده با آرد تیره بیشتر از آرد روشن مشاهده شد (شکل ۱). به‌هرحال مخلوط دو باکتری باعث کاهش سریع‌تر pH و زمان اسیدی کردن خمیر به نفع آنزیم های پروتئولیتیک آرد شده‌اند (پیغمبردوست و همکاران ۱۳۸۹). لوپونن (۲۰۰٤) گزارش کرد که هیدرولیز گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا در خمیرترش‌های تهیه شده با آرد کامل گندم به دلیل فعالیت پروتئولیتیکی بالاتر نسبت به آرد سفید سریع‌تر صورت گرفت. وی همچنین اظهار داشت که آنزیم‌های پروتئاز آرد گندم در غیاب کشت‌های آغازگر و تحت شرایط اسیدی قادر به هیدرولیز گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا هستند.

پژوهش اخیر نشان داد که گلوتنین‌ها به‌وسیلهٔ سیستم آنزیمی *لاکتوباسیل‌های پلانتاروم* و *روتری* خمیرترش هیدرولیز نشدند. نتایج مشابهی نیز توسط دی‌کاگنو و همکاران (۲۰۰۲) گزارش شده است. گوسمن و همکاران (۲۰۰۷) گزارش کردند که در نمونه‌های خمیر حاوی ۲۰ درصد خمیرترش که در دماهای ۳۷ و ۲۸ درجهٔ سانتی-گراد و به‌ترتیب برای مدت ٤ و ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شده بودند، هیدرولیز اجزاء گلوتنین صورت نگرفت. البته باید توجه داشت که میزان پروتئولیز به سویهٔ لاکتوباسیل نیز بستگی دارد. سویه‌های *لاکتوباسیلوس برویس*، *سانفرانسیسنسیس* و *الیمنتاریوس* قادر به هیدرولیز پلی‌پپتیدها بوده در حالیکه *لاکتوباسیلوس هیلگاردی* ظرفیت اندکی برای انجام هیدرولیز دارد (کلارک و آرندت ۲۰۰۵). به‌هرحال هیدرولیز گلوتنین‌ها عمدتاً به میزان pH و فعالیت پروتئینازهای آرد بستگی

دارد. فعالیت اپتیمم این آنزیم‌ها در pH≤٤ است (گوسمن و همکاران ۲۰۰۷). مطالعات نشان داده که آنزیم‌های کربوکسی پپتیداز سرینی و پروتئیناز آسپارتیک آرد گندم در شرایط اسیدی قادر به هیدرولیز پروتئین‌های گلوتن است (کاوامورا و یونزاوا ۱۹۸۲).

در این پژوهش اثر اسیدی‌کردن شیمیایی نیز روی هیدرولیز گلوتن آرد گندم مورد بررسی قرار گرفت. نمونهٔ T_9 (خمیر اسیدی‌شدهٔ آرد روشن) حاوی گلوتنین-های با وزن مولکولی بالا با وزن‌های مولکولی kDa ١٤٦/٦، ١٢٨/٣، ٩٢/٤ بود. در این نمونه، دو نوار پروتئینی با وزن‌های مولکولی kDa ١١٤/٧ و ٩٧/٤ کم-رنگ‌تر از سه نوار دیگر مشاهده شدند که بیانگر این مطلب است که پروتئین‌های مذکور در آستانهٔ ناپدیدشدن قرار دارند. نمونهٔ T_{10} (خمیر اسیدی‌شدهٔ آرد تیره) فقط دارای یک نوار پروتئینی کم‌رنگ با وزن مولکولی ٩٧/٤kDa بود (شکل ۱). بنابراین در مورد خمیر اسیدی-شده با روش شیمیایی نیز میزان پروتئولیز در نمونهٔ تهیه شده از آرد تیره به مراتب شدیدتر بود. تیل و همکاران (۲۰۰۳) با نشان‌دارکردن فلورسانس پروتئین-های گندم و بررسی میزان هیدرولیز گلوتن نشان دادند که شدت هیدرولیز پروتئین‌های گلیادین و گلوتنین در خمیرهای اسیدی به‌مراتب بیشتر از هیدرولیز توسط آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتری‌های اسید لاکتیک بود. به-هرحال اسیدهای آلی منجر به افزایش حلالیت جزء گلوتنین آرد گندم شده و با بازکردن پروتئین گلوتن و عدم تشکیل پیوندهای جدید باعث تضعیف خمیر می-گردند (کلارک و آرندت ۲۰۰۵ و آرندت و همکاران ۲۰۰۷).

نتیجه‌گیری

هر چند *لاکتوباسیل‌های پلانتاروم* و *روتری* مورد استفاده در این پژوهش دارای فعالیت پروتئولیتیکی ناچیزی بودند، ولی با تولید اسیدهای آلی و ایجاد شرایط اپتیمم برای فعالیت پروتئازهای آرد، در هیدرولیز گلوتنین‌ها نقش داشتند. میزان تخریب پروتئین‌های پلیمری در خمیرترش‌های تهیه شده با آرد تیره به مراتب بیشتر از آرد روشن بود. اسیدی‌کردن شیمیایی منجر به هیدرولیز زیرواحدهای گلوتنین‌های با وزن مولکولی بالا در خمیر آردهای روشن و تیره گردید که شدت هیدرولیز در خمیر آرد تیرهٔ اسیدی‌شده بیشتر مشاهده شد.

منابع مورد استفاده

پیغمبردوست س ه، گلشن تفتی الف، خراسانچی ن، حجازی م االف، رأفت س ع، ۱۳۸۹، مقایسهٔ اثرات خمیرترش خشک با خمیرترش تازه روی ویژگی‌های حسی و بیاتی نان قالبی. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۰، ۱۷۵-۱٦۳.

AACC, 2005. AACC Approved Methods St Paul, Minnesota, USA: AACC, American Association of cereal chemists.

Arendt EK, Ryan LAM and Dal Bello F, 2007. Impact of sourdough on the texture of bread. Food Microbiology 26: 693-699.

Bean SR and Lookhart GL, 2000. Electrophoresis of cereal storage proteins. Journal of Chromatography-A 881: 23-36.

Clarke CI and Arendt EK, 2005. A review of the application of sourdough technology to wheat breads Advances in Food and Nutrition Research. Pp 137-161.

Decock P and Cappelle S, 2005. Bread technology and sourdough technology. Trends in food Science and Technology 16: 113-120.

De VuystL and Vancanneyt M, 2007. Biodiversity and identification of sourdough lactic acid bacteria. Food Microbiology 24: 120-127.

Di Cagno R, De Angelis M, Lavermicocca P, De Vincenzi M, Giovannini C, Faccia M and Gobbetti 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: 623-633.

Ganzle MG, Loponen J and Gobbetti M, 2008. Proteolysis in sourdough fermentations: mechanisms and potential for improved bread quality. Trends in food Science and Technology 19: 513-521.

Ganzle MG, Vermeulen N and Vogel RF, 2007. Carbohydrates, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough. Food Microbiology 24: 128-138.

Gobbetti M, De Angelis M, Corsetti A and Di Cagno R, 2005. Biochemistry and physiology of sourdough lactic acid bacteria. Trends in Food Science and Technology 16: 57-69.

Gocmen D, Gurbuz O, Kumral AY, Dagdelen AF and Sahin I, 2007. The effects of wheat sourdough on glutenin patterns, dough rheology and bread properties. European Food Research and Technology 225, 821-830.

Hansen Aand Hansen B, 1994. Influence of wheat flour type on the production of flavor compounds in wheat sourdoughs. Journal of Cereal Science 19, 185-190.

Hansen A and Schieberle P, 2005. Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: Applied and fundamental aspects. Trends in Food Science and Technology 16: 85-94.

Iacumin L, Cecchini F, Manzano M, Osualdini M, Boscolo D, Orlic S and Giuseppe C, 2009. Description of the microflora of sourdoughs by culture-dependent and culture-independent methods. Food Microbiology 26: 128-135.

Katina K, Heinio RL, Autio K, Poutanen K, 2006. Optimization of sourdough process for improved sensory profile and texture of wheat bread. LWT-Food Science and Technology 39: 1189- 1202.

Katina K, Sauri M, Alakomi HL and Mattila-Sandholm T, 2002. Potential of lactic acid bacteria to inhibit rope spoilage in wheat sourdough bread. LWT-Food Science and Technology 35: 38-45.

Kawamura Y and Yonezawa D, 1982.Wheat flour proteases and their action on gluten proteins in dilute acetic acid. Agricultural Biological Chemistry 46: 767-773.

Laemmeli UK, 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Loponen J, 2004. Prolamin degradation in sourdoughs. PhD Thesis, Faculty of Agriculture and Forestry, University of Helsinki, Finland.

Loponen J, Mikola M, Katina K, Sontag-Strohm T and Salovaara H, 2004. Degradation of HMW Glutenins during Wheat Sourdough Fermentations. Cereal Chemistry 81: 87-93.

Rizzello CG, De Angelis M, Coda R and Gobbetti M, 2006. Use of selected of sourdough lactic acid bacteria to hydrolyze wheat and rye proteins responsible for cereal allergy. European Food Research and Technology 223: 405-411.

Thiele C, Ganzle MG and Vogel RF, 2003. Fluorescence labeling of wheat proteins for determination of gluten hydrolysis and depolymerization during dough processing and sourdough fermentation. Food Chemistry 51: 2745-2752.

Thiele C, Grassl S andGanzle M, 2004. Gluten hydrolysis and depolymerization during sourdough fermentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry 52: 1307-1314.

Wang YG, Khan K, Hareland G and Nygard G, 2007. Distribution of protein composition in bread wheat flour mill streams and relationship to breadmaking quality. Cereal Chemistry 84: 271-275.

Wehrle K, Grau H and Arendt EK, 1997. Effects of lactic acid, acetic acid and table salt on fundamental rheological properties of wheat dough. Cereal Chemistry 74: 739-744.

Werner WE, 1995. Ferguson plot analysis of high molecular weight glutenin subunits by capillary electrophoresis. Cereal Chemistry 72: 248-251.

Wieser H, Vermeulen N, Gaertner F and Vogel RF, 2008. Effects of different Lactobacillus and Enterococcus strains and chemical acidification regarding degradation of gluten proteins during sourdough fermentation. European Food Research and Technology 226: 1495-1502.

Effect of sourdough and chemical acidification on electrophoretic pattern of polymeric proteins of wheat gluten

SH Peighambardoust[1], M Pouramini[2], A Golshan Tafti[3] and M Valizadeh[4]

Received: March 02, 2013 Accepted: October 06, 2014

[1]Associate Professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]MSc Graduated Student, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3]Assistant Professor, Department of Agricultural Engineering Research, Kerman Agricultural and Natural Resources Research Centre, Kerman, Iran
[4]Professor, Department of Agronomy and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Proteolysis of wheat gluten proteins during fermentation of dough by sourdough lactic acid bacteria strongly affects the quality of the corresponding bread. In this study, effect of biological as well as chemical acidification on electrophoretic pattern of wheat gluten protein was investigated. Low and high extraction rate wheat flours were used to prepare sourdoughs. Sourdough samples were prepared with active culture of *L. plantarum* and *L. reuteri* containing 10^7 cfu/g and added at a level of 20% (w/w) to the dough. Chemical acidification was obtained with adding a mixture of acetic and lactic acids. Glutenin fractions were analysed by sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) technique. The electrophoretic results indicated that the degradation of gluten proteins were higher in the sourdoughs originated from a high extraction rate flour. Sourdough addition led to the hydrolysis of high molecular weight (HMW) glutenin subunits due to the higher proteolytic activity of the high extraction rate flour. The lactobacilli (especially *L. plantarum*) had an important role in glutenin hydrolysis due to the production of organic acids and also creation of optimum conditions for the activation of flour proteases. Chemical acidification caused the hydrolysis of HMW glutenin subunits in the doughs from both low and high extraction rate flours.

Key words: Electrophoresis, Sourdough, Chemical acidification, Wheat gluten protein