DOI: http://dx.doi.org/ 10.22104/JIFT.2019.3643.1876

فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، دوره ۷، شماره ۲، صفحه ۳۱۱-۲۹۹، زمستان ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

استخراج آنزیمی پروتئین سبوس برنج رقم طارم و بررسی خواص عملکردی آن بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی ماست کم‌چرب

نایب غلامی[۱]، زینب رفتنی امیری[۲*]، رضا صفری[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی

۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳. استادیار پژوهشکده اکولوژی دریای خزر ساری

(تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۱، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۴/۲۹، تاریخ پذیرش: ۹۸/۸/۱۴)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی خواص کارکردی پروتئین سبوس برنج رقم طارم با استفاده از آنزیم فلاورزایم و تاثیر آن بر ویژگی‌های کیفی ماست بوده است. پس از انجام فرایند هیدرولیز (pH=۸ برای مدت h ۲)، پروتئین استخراج شده از نظر خواص عملکردی مورد ارزیابی قرار گرفته و در سطوح ۰، ۱، ۱/۵ و ۲ ٪ به ماست کم چرب اضافه و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن بررسی گردید. درصد پروتئین اولیه سبوس ۱۸/۵۳٪ و میزان جذب آب پروتئین سبوس برنج و هیدرولیز شده به‌ترتیب ۲/۵۶±۰/۹ و ml/g ۵/۴۸±۱/۰ محاسبه شد. مقدار حلالیت پروتئین هیدرولیز شده و خام به‌ترتیب ۸۴/۰۹±۳/۲ و ۶۵/۱۷±۴/۵ ٪ بوده است. ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین استخراج شده به‌ترتیب m^2/g ۹/۱۲ و min ۷۱/۳۸ و برای پروتئین هیدرولیز نشده به‌ترتیب m^2/g ۱/۵۵ و min ۲۹/۷۷ محاسبه شد. افزایش غلظت پروتئین در فرمولاسیون ماست منجر به افزایش ویسکوزیته شد. با افزایش درصد پروتئین در فرمولاسیون ماست، اسیدیته به‌طور معنی‌داری افزایش و pH به میزان جزئی کاهش یافت. همچنین آب اندازی کاهش و موجب بهبود و تقویت ژل ماست شد. همچنین نمونه ها از لحاظ رنگ و طعم باهم اختلاف معنی داری نداشتند. با توجه به نتایج حاصله، استفاده از ۱/۵ ٪ پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج در فرمولاسیون ماست کم‌چرب توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، طارم، ماست کم چرب، فلاورزایم.

* نویسنده مسئول: zramiri@gmail.com

۱. مقدمه

سبوس برنج ۳ تا ۸٪ از دانه برنج را تشکیل می‌دهد و حدود ۱۲ تا ۱۵٪ پروتئین دارد. سالانه مقادیر زیادی سبوس برنج به‌عنوان فراورده جانبی تولید برنج در کشور تولید می‌گردد که اغلب به مصرف خوراک دام رسیده و مقدار بسیار اندکی در جیره غذایی انسان و بخش صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرد. سبوس برنج به‌دلیل داشتن فیبر و هم‌چنین خواص آنتی اکسیدانی بالا با داشتن توکوفرول، اوریزانول، فنول و سایر ترکیبات مغذی مانند پروتئین‌ها، ویتامین‌های E و B پتانسیل خوبی برای کاربرد در صنعت غذا دارد [۱،۲]. هم‌چنین کیفیت پروتئینی سبوس برنج بالاتر از گندم و ذرت می‌باشد. از لحاظ ترکیب اسید آمینه پروتئین سبوس برنج که لیزین و ترئونین بالاتری دارد و هم-چنین نرخ پروتئینی ۱/۶ تا ۱/۹ که قابل مقایسه با کازئین شیر که ۲/۵ می‌باشد و خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نیز دارد [۳] که به‌عنوان یک منبع ارزان قیمت ضد آلرژی مبتنی برپایه گیاهی با کیفیت بالای پروتئین قابل جایگزینی می‌باشد [۲]. از سوی دیگر خواص شیمیایی و عملکردی مانند خاصیت امولسیفایری مناسب، کف کنندگی و پایداری کف مناسب، افزایش ویسکوزیته و کاهش آب اندازی بالای آن سبب گردیده که به‌عنوان پروتئین برتر غلات معرفی شود و بالاتر از کنجاله سویا، نشاسته سیب‌زمینی، سورگوم، گردو و بادام زمینی قرار گیرد [۴]. حلالیت یکی از مهم‌ترین خواص پروتئین‌ها می‌باشد که روی سایر خواص پروتئین‌ها مانند امولسیفایری، کف کنندگی و جذب آب تاثیر گذار می‌باشد [۵]. هم‌چنین پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم‌هایی مانند فیتاز و زایلاناز دارای خاصیت کف کنندگی مناسبی هستند [۶]. پروتئین سبوس برنج دارای خواص امولسیفایری مناسبی می‌باشد که می‌توان به‌عنوان یک امولسیفایر در آماده‌سازی مواد غذایی استفاده گردد [۳]. با توجه به خواص عملکردی پروتئین سبوس برنج روش‌های مختلفی جهت استخراج این پروتئین‌ها یافت شده است که از آن جمله می‌توان به روش‌های فیزیکی هموژن کردن و اولتراسوند، قلیایی و آنزیمی اشاره نمود. با توجه به چالش‌های موجود در استفاده از این پروتئین مانند حلالیت کم و وجود پیوندهای دی-سولفیدی [۷]، بایستی روش مناسب استخراج را جهت دست-یابی به حداکثر بازدهی، حلالیت و خلوص بالا و در ادامه عملکرد مناسب جهت استفاده بهینه در مواد غذایی را به‌کار برد [۸].

استخراج آنزیمی یکی از روش‌های استخراج پروتئین می‌باشدکه موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها و بهبود خواص عملکردی آن‌ها و هم‌چنین سرعت انجام روش آنزیمی بالا و قابل کنترل می‌باشد و محصولی با ویژگی‌های خاص و با ثبات تولید می‌شود که در آن از آنزیم‌های مختلف جهت هیدرولیز پروتئین استفاده می‌شود، از این جمله می‌توان به کربوهیدرولازها اشاره نمودکه پروتئین‌های تحت حصار فیتات‌ها را آزاد می‌کند [۸]. استفاده از پروتئازهای آلکالاز و فلاورزایم راندمان هیدرولیز را تا ۹۳ ٪ بالا می‌برد و همچنین سبب افزایش طعم و نیز تبدیل پروتئین به پپتیدهای کوچک با وزن مولکولی کمتر و افزایش حلالیت شده و از طرفی اثرات سوء استفاده از قلیا مانند کاهش مواد مغذی و تغییر رنگ را ندارد [۹]. در روش آنزیمی، ساختمان اسیدهای آمینه در پروتئین هیدرولیز شده حفظ گردیده در حالی‌که در روش‌های اسیدی و یا قلیایی برخی از اسیدهای آمینه از جمله لیزین و متیونین تحت تاثیر قرار می‌گیرند. هر چند که قیمت آنزیم‌های تجاری بیشتر از انواع اسیدها و بازها می‌باشد ولی باید به این نکته توجه نمود که روش‌های آنزیمی روش‌های دوستدار محیط زیست بوده و فاقد آلودگی زیست محیطی می‌باشند. آنزیم‌ها به‌دلیل دارا بودن فعالیت آنزیمی در دامنه وسیعی از pH، کارآیی و کاربرد گسترده‌تری نسبت به سایر روش‌ها دارند.

ماست شبکه سه بعدی پروتئینی می‌باشد که دراثر فعالیت باکتری‌های لاکتیکی با بهم پیوستن رسوبات پروتئینی کازئینی شکل می‌گیرد. گلبول‌های چربی و پروتئین‌های دناتوره شده به‌عنوان پرکننده در این شبکه نقش مهمی در ساختار، ویسکوزیته و آب اندازی آن ایفا می‌کنند. با کاهش یا حذف چربی اثرات نامطلوبی در بافت محصول و خصوصیات حسی آن نزد مصرف کننده ایجاد می‌شود [۱۰]. جهت رفع این نقیصه، روش‌های متعددی مانند افزایش ماده خشک با افزودن پروتئین-ها جهت تقویت ماتریکس پروتئینی، جلوگیری از آب اندازی و افزایش ظرفیت نگه‌داری آب استفاده می‌گردد [۱۱]. هم‌چنین افزایش باندهای پروتئینی موجب افزایش ویسکوزیته، تقویت و افزایش الاستیک ماتریکس ژل ماست می‌شود [۱۲]. با توجه به مطالب بیان شده در این پژوهش به منظور استفاده بهینه از ضایعات برنج، استخراج آنزیمی پروتئین هیدرولیز شده از سبوس برنج رقم طارم با آنزیم فلاورزایم انجام شد و بعد از تعیین برخی خصوصیات عملکردی پروتئین هیدرولیز شده

حاصله، تاثیر آن بر بهبود خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست کم چرب مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد اولیه

سبوس رقم طارم از یکی از کارخانه‌های شالیکوبی شهرستان محمود آباد تهیه شد. شیر خام (۱/۵٪ چربی) از شرکت پگاه گیلان، کشت آغازگر YC-X11، شرکت هانس کریستیان دانمارک، محتوی *لاکتوباسیلوس بولگاریکوس* زیرگونه *دلبروکی* و *استرپتوکوکوس ترموفیلوس* در بسته‌های ۵۰ واحدی از نمایندگی شرکت کریستین هنسن و آنزیم فلاورزایم از شرکت نووزایم دانمارک با فعالیت آنزیمی ۱۰۰۰ L تهیه شدند. ظروف مورد استفاده جهت بسته بندی ماست از جنس پلی پروپیلن دربدار ۱۰۰ و ۵۰۰ g با قطر ۸۵ mm بوده که از بازار محلی خریداری شد. سایر مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی مرک استفاده شد.

۲.۲. روش‌ها

۱.۲.۲. تهیه پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج

سبوس رقم طارم با الک با مش ۸۰ غربال و چربی‌زدایی با استفاده از هگزان انجام شد [۶] و سپس مطابق روش گناسامبادوم و هیتشراچی [۱۳] کنسانتره پروتئینی به شرح ذیل به‌دست آمد، بدین صورت که سبوس چربی‌زدایی شده و خشک شده و با آب دیونیزه شده به نسبت ۱ m/v به ۵ جهت تنظیم pH مخلوط و سپس با سانتریفوژ یخچال دار شرکت کوکوسان ژاپن با ۷۰۰۰ g به مدت ۱۵ min سانتریفیوژ شد و سوپرناتانت حاصله جمع‌آوری شد. طی مرحله بعد به‌وسیله اسید به pH ۴ تا ۴/۵ رسانده و دوباره سانتریفیوژ و سپس قسمت جامد حاصله را جداسازی کرده و در ادامه با فریز درایر واکو ۲ زیربوس آلمان منجمد شد. در مرحله بعد مقدار مشخصی از کنسانتره حاصل با آب مقطر مخلوط و با سود ۱molar به pH برابر ۸ رسانده شد. بعد از رساندن دما به ۵۰°C و اضافه نمودن آنزیم فلاورزایم به مقدار ۱/۵٪ میزان پروتئین سبوس برنج، فرایند هیدرولیز به مدت ۲ h انجام شد. جهت ثابت نگه داشتن pH، سود ۱molar اضافه و در حمام بخار قرار داده شد و سپس با سانتـــریفیوژ کردن سوپرناتانت به‌دست آمد که با کاغـذ واتمن شماره ۴ صاف شد [۶].

۲.۲.۲. ترکیب شیمیایی سبوس برنج و بازده استخراج

ترکیب شیمیایی سبوس برنج و پروتئین هیدرولیز شده به روش AOAC [۱۴] محاسبه شد. نیتروژن کل بر اساس روش کجدال اندازه‌گیری و سپس پروتئین خام با استفاده از فاکتور ۵/۹۵ محاسبه شد و بازده استخراج از معادله (۱) محاسبه گردید:

درصد بازده = (۱)

۱۰۰× (گرم سبوس برنج/گرم کنسانتره پروتئینی) استخراج

۳.۲.۲. آزمون‌های پروتئین هیدرولیز شده

درجه هیدرولیز پروتئین به روش تامنارات هیب و همکاران [۱۵] انجام شد. درجه هیدرولیز پروتئین می‌تواند نشان دهنده باندهای کووالانتی پپتیدی بر تعداد کل باندها در واحد وزن باشد. درجه هیدرولیز پروتئین میتواند نشان دهنده باندهای کووالانتی پپتیدی بر تعداد کل باندها در واحد وزن باشد و بر اساس معادله (۲) محاسبه می‌شود.

$$DH=B\times N_b\times 1/a\times 1/M_P\times 1/h_{tot}\times 100 \qquad (۲)$$

B مقدار باز مصرف شده بر حسب میلی لیتر است که برای کنترل pH در هنگام هیدرولیز آنزیمی استفاده شده است. N_b نرمالیته باز (سود ۰/۱N)، a میانگین درجه جداسازی گروه‌های $a\text{-}NH_2$ (1/a=1.13)، M_P برابر است با جرم پروتئین N×۵/۹۵/g و h_{tot} کل باندهای پپتیدی در پروتئین سوبسترا ۸/۴ me/g پروتئین سبوس برنج است.

جذب آب پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش یاداو و همکاران [۱۶] انجام شد. بدین صورت که ابتدا ۲/۵g از پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج با ۳۰ml آب مقطر با استفاده از یک میله شیشه‌ای مخلوط شد. سپس دمای محلول تا ۹۰ °C افزایش و برای این منظور به مدت ۱۵ min در حمام آب شرکت اختریان ایران حرارت داده شد. خمیر حرارت داده شده تا دمای اتاق سرد و سپس به مدت ۱۰min در ۳۰۰۰ g سانتریفوژ شد. محلول رویی جدا و در آون ممرت آلمان با دمای ۱۱۰ °C به مدت ۲۴ h خشک گردید تا مقدار مواد جامد محلول آن اندازه‌گیـــری شود. ظرفیت آب جذب شده برحسب

وزن خشک مطابق معادله (۳) محاسبه شد.

(۳) اندیس جذب آب g/g = وزن آب جذب شده g/وزن نمونه اولیه g

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش برا و مخرجی [۱۷] و مطابق معادله (۴) انجام شد.

(۴) اندیس حلالیت در آب g/g = وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتانت g/وزن نمونه اولیه g

ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج به روش گوپتا و همکاران [۷] انجام شد. ۰/۵g کنسانتره پروتئینی و ml ۵۰ بافر سیترات molar ۰/۵ در pH=۵-۷-۹ و ml ۱۰ روغن ذرت تصفیه شده به یک مخلوط‌کن پاناسونیک ایران اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت min ۲ مخلوط و بلافاصله به یک استوانه مدرج ml ۱۰۰ انتقال داده شد. جهت تعیین پایداری امولسیون حجم کل سوسپانسیون و ارتفاع امولسیون اندازه‌گیری و ظرفیت امولسیون کنندگی از معادله (۵) تعیین شد:

(۵) ظرفیت امولسیون کنندگی ٪ = حجم کل مخوط/حجم لایه امولسیون × ۱۰۰

۴.۲.۲. تهیه ماست

بعد از گرم کردن مقدماتی شیر تا $40\ ^oC$ ، پروتئین هیدرولیز شده سبوس در سطوح ۰، ۱، ۱/۵ و ۲٪ اضافه شد. هموژنیزاسیون شیر انجام شد و دمای شیر به $95\ ^oC$ رسانده شد و به مدت min ۵ در این دما نگه‌داری شد و سپس تا دمای $43\ ^oC$ خنک شد. مایه‌زنی ماست با استفاده از استارتر YC-X11 به مقدار ۲٪ انجام شد و در انکوباتور ممرت آلمان در دمای $42\ ^oC$ قرار گرفت. بعد از رسیدن به pH برابر ۴/۵ تا ۴/۷ به یخچال منتقل شد و به مدت ۱۸ تا h ۲۴ نگه‌داری شد.

۵.۲.۲. آزمون‌های ماست

pH ماست کم چرب با استفاده از pH متر دیجیتال بوش آلمان اندازه‌گیری شد. اسیدیته ماست به روش تیتراسیون با سود N ۰/۱ و معرف فنل فتالئین انجام شد. ویسکوزیته ماست کم چرب با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مدل DVII ساخت کشور آمریکا و با استفاده از اسپیندل شماره ۶۴ اندازه‌گیری شد. نمونه ها پس از h ۱۸ سرد کردن در دمای $4\ ^oC$ در سرعت برشی rpm ۱۰۰و زمان s ۶۰ [۱۸] و ظرفیت نگه‌داری آب ماست کم چرب با استفاده از روش رفتنی امیری و همکاران [۱۸] انجام شد. جهت اندازه گیری ظرفیت نگه‌داری آب ماست از سانتریفوژ استفاده و g ۵ نمونه ماست در تیوب سانتریفوژ توزین و نمونه‌ها به مدت min ۳۰ در دمای $10\ ^oC$ و g ۴۵۰۰ سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت دور ریخته و رسوب باقیمانده توزین شد. ظرفیت نگه‌داری آب از تقسیم وزن رسوب حاصله به وزن اولیه ماست توزین شده به‌دست آمد. ارزیابی حسی با کمک ۱۰ ارزیاب آموزش دیده و با روش هدونیک ۵ نقطه‌ای انجام شد. نمونه‌های ماست min ۱۰ قبل از مصرف شدن در دمای اتاق قرار گرفتند. از ارزیابان خواسته شد تا خصوصیات رنگ، بو، بافت، طعم، حالت خامه‌ای، شیرینی و پذیرش کلی نمونه‌های ماست را به دقت مورد بررسی قرار داده و به نمونه-های ماست امتیاز دهند [۱۸].

۳.۲. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

جهت آنالیز آماری نمونه‌های ماست در سطوح غلظت ۰، ۱، ۱/۵ و ۲ ٪ از پروتئین هیدرولیز شده با استفاده آنزیم فلاورزایم، در قالب طرح کاملا تصادفی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ تجزیه و تحلیل شد و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ ٪ استفاده شد. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار انجام شد.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. ترکیب شیمیایی سبوس برنج و پروتئین هیدرولیز شده

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی نمونه‌های سبوس برنج در جدول (۱) نشان داده شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود بیشترین ترکیب شیمیایی سبوس برنج کربوهیدرات است و پس از آن به‌ترتیب پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر و فیبر خام قرار دارد. در یک مطالعه کشاورز هدایتی و همکاران [۱۹] ترکیب شیمیایی چهار نمونه سبوس برنج را بررسی نمودند و مشخص گردید که در رقم سبوس طارم میزان رطوبت،

جدول (۱) ترکیبات شیمیایی سبوس برنج و پروتئین هیدرولیز شده.

Table 1 Chemical composition of rice bran and hydrolyzed protein.

Sample نمونه	Moisture(%) رطوبت(٪)	Protein(%) پروتئین(٪)	Fat(%) چربی(٪)	Ash(%) خاکستر(٪)	Crude fiber(%) فیبر خام(٪)	Carbohydrate(%) کربوهیدرات (٪)
سبوس برنج Rice Bran	12.13±0.11[a]	18.28±0.07[b]	14.97±0.04[a]	11.43±0.04[a]	8.13±0.07[a]	35.05±0.2[a]
پروتئین هیدرولیز شده Hydrolyzed Protein	3.96±0.18[b]	73.12±0.1.46[a]	1.26±0.12[b]	4.99±0.47[b]	1.63±0.39[b]	15.02±2.23[b]

Different letters in each column indicated significant statistical different at P<0.05.

پروتئین، چربی، خاکستر، فیبر خام و کربوهیدرات به‌ترتیب ۱۲/۰۳، ۱۸/۰۲، ۱۵/۰، ۱۱/۴۴، ۸/۸ و ۳۴/۷۱ ٪ است که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد. باتاچاریا [۲۰] مقدار چربی سبوس برنج را ۲۳-۱۳٪، فیبر را ۱۴-۶٪، پروتئین را ۱۷-۱۴٪ و خاکستر را در محدوده ۱۱/۵۵-۶/۶۸٪ گزارش نمودند. آمیساه و همکاران [۲۱] مقدار کربوهیدرات سبوس برنج را حدود ۴۶/۳۴-۲۶/۴۱٪ گزارش نمودند. سبوس می‌تواند یک ترکیب مناسب برای فرمولاسیون مواد غذایی خصوصا غذای کودک مورد استفاده قرار بگیرد [۲۲]. سبوس هم‌چنین می‌تواند به‌عنوان غذا دارو در جلوگیری از بروز بیماری‌های قلبی، کبدی و سنگ کلیه دخیل باشد [۲۳]. سبوس هم‌چنین منبع غنی از ویتامین ای، ترکیبات اریزانولی و الکل‌های ترپنی است که می‌تواند به‌عنوان جزئی از داروها، لوازم آرایشی و غذاهای عملگر مورد استفاده قرار بگیرد [۲۴، ۲۵]. یئوم و همکاران [۲۶] ترکیبات شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده و سبوس برنج چربی گیری شده را مورد بررسی قرار دادند و اعلام نمودند که میزان پروتئین افزایش و کربوهیدارت کاهش می‌یابد که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین مقدار رطوبت و خاکستر در پروتئین هیدرولیز شده کاهش یافت که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. وجود مقادیر بالای پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده نشان دهنده این مطلب است که حلالیت پروتئین‌ها در آب کاهش یافته است و با سایر ترکیبات نظیر نشاسته و فیبر ترکیب شده است. در هر حال بسیاری از این باندهای پروتئینی درگیر شده به pH حساس هستند و ممکن است در شرایط قلیایی تجزیه شوند [۲۷]. این نتایج با نتایج پژوهش برا و موخرجی [۱۷] مطابقت دارد که آن‌ها مقدار محتوی پروتئین را در حدود ۷۵٪ اعلام نمودند.

۲.۳. بازده استخراج و درجه هیدرولیز پروتئین سبوس برنج

بازده استخراج پروتئین هیدرولیز نشده ۰/۷±۲۳/۸۵٪ و ب ۳۰۱
پروتئین هیدرولیز شده ۱/۲۴±۳۳/۴۷٪ بود که نشان می‌دهد بازده استخراج افزایش یافته است. این نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیز منجر به استخراج پروتئین به همان اندازه ترکیبات محلول می‌شود. در یک پژوهش نشان داده شد که آنزیم فلاورزایم در هیدرولیز پروتئین‌های سبوس برنج نسبت به آنزیم‌های دیگر موثرتر عمل می‌نماید بدین شکل که موجب افزایش راندمان هیدرولیز و سبب افزایش طعم و موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها از طریق تبدیل پروتئین‌ها به پپتید های کوچک می‌شود [۱۵]. نتایج مشابهی در مورد بازده استخراج در پروتئین‌های هیدرولیز شده کانولا و کلزا به‌دست آمده است [۲۸، ۲۹]. آنزیم‌های اندوپروتئازی باندهای پپتیدی زنجیره‌های درونی پروتئین را می‌شکنند در حالی‌که فلاورزایم یک آنزیم اگزوپپتیداز است، بنابراین فعالیت ترکیبی فلاورزایم می‌تواند باعث بهبود بازده هیدرولیز پروتئین شود [۶، ۳۰]. یئوم و همکاران [۲۶] بازده پروتئین‌های به‌دست آمده از سبوس برنج را ۳۹٪ گزارش نمودند که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد. چاروئن و همکاران [۳۱] بازده استخراج پروتئین هیدرولیز شده و محتوی پروتئین در دو واریته سبوس برنج Mali و PNP را به‌ترتیب ۲۳/۰ و ۲۱/۳٪ برای بازده و ۳۰/۹ و ۳۰/۸٪ برای محتوی پروتئین گزارش نمودند که کمتر از نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است. با توجه به این‌که در استخراج و هیدرولیز پروتئین عوامل مختلفی از جمله روش استخراج آنزیمی و زمان استخراج موثر هستند هر دو پارامتر در

تجزیه سوبسترای درون سبوس موثر بوده و موجب هیدرولیز پروتئین می‌شوند [۲۳، ۳۲]. درجه هیدرولیز پروتئین سبوس برنج بعد از h ۲ تیمار مطابق مطالعات و پژ.هش‌های محققین [۱۵و۲۳] ، ۱۸/۵۳٪ محاسبه گردید. در یک پژوهش سامنارات هیب و همکاران [۱۵] درجه هیدرولیز پروتیئن سبوس برنج را با استفاده از آنزیم‌های مختلف آلکالاز، فلاورزایم و نئوتراس طی شش ساعت اندازه‌گیری نمودند که مشخص گردید طی دو ساعت تیمار با آنزیم فلاورزایم درجه هیدرولیز پروتئین حدودا ۸/۴ است که کمتر از مقدار به‌دست آمده از پژوهش حاضر است. درجه هیدرولیز بالاتر پروتئین نشان دهنده مقادیر بالاتر باندهای پپتیدی است که جدا و هیدرولیز شده‌اند [۳۳]. درجه هیدرولیز پروتئین در این مطالعه با پروتئین‌های هیدرولیز شده آلبومین و گلوبولین که زیر ۱۵٪ به‌دست آمد برابر است [۳۴]. در پژوهشی دیگر ژائو و همکاران [۳۵] پروتئین سبوس برنج را با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز، فلاورزایم، تریپسین، آلکالاز و نئوتراز در زمان‌های مختلف از ۰ تا min ۲۴۰ هیدرولیز نمودند و مشخص شد که آنزیم فلاورزایم در مدت h ۲ درجه هیدرولیز پروتئینی برابر ۲/۳۸ ٪ داشته است که کمتر از مقدار به‌دست آمده در پژوهش حاضر است. چاروئن و همکاران [۳۱] درجه هیدرولیز دو واریته Mali و PNP که با آنزیم‌های فلاورزایم و آلکالاز در شرایط بهینه استخراج شده بود را به‌ترتیب ۱۹/۹۲ و ۲۱/۰۵٪ گزارش نمودند که مقدار به‌دست آمده نشان‌دهنده این امر است که باندهای پپتیدی پروتئین به‌وسیله آنزیم هیدرولیز شده است و غلظت گروه‌های آمین در پروتئین‌های هیدرولیز شده افزایش می‌یابد. دلیل اختلاف در مقادیر به‌دست آمده مرتبط با نوع آنزیم‌های استفاده شده به منظور هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا، شرایط هیدرولیز و نوع سوبسترای پروتئین است. یئوم و همکاران [۲۶] درجه هیدرولیز پروتئین سبوس برنج را مرتبط با زمان هیدرولیز دانستند و اعلام نمودند که درجه هیدرولیز با گذشت زمان روند افزایشی دارد و به میزان حدود ۲۶٪ در h ۲ هیدرولیز می‌رسد.

۳.۳. جذب آب و حلالیت پروتئین هیدرولیز شده

ظرفیت جذب آب به توانایی نگه‌داری آب ارتباط دارد و شامل پیوند با آب، هیدرودینامیک آب، قدرت مویینگی آب و به دام انداختن فیزیکی آب است. اندیس جذب آب به خاصیت آبگریزی، pH، دما، قدرت یونی، غلظت پروتئین‌ها، نوع و تعداد اسیدهای آمینه ارتباط دارد [۳۵، ۳۶]. اندیس جذب آب بالا برای حفظ تازگی و احساس چشایی مطلوب در فراورده‌های غذایی لازم است و اندیس جذب آب به حفظ رطوبت و کاهش سینرسیس در فراورده کمک می‌کند [۳]. حلالیت یکی از خصوصیات کاربردی پروتئین‌های هیدرولیز شده است که رابطه بسیار نزدیکی با آمینواسیدهای آبدوست دارد [۳۷]. حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده عموما در گستره ۹۰-۷۵ درصد قرار دارد که بازهم بسته به شرایط هیدرولیز، pH و نوع آنزیم متفاوت است [۳۵]. مقدار حلالیت پروتئین هیدرولیز شده و هیدرولیز نشده به‌ترتیب ۳/۲±۸۴/۰۹ و ۴/۵±۶۵/۱۷ ٪ به‌دست آمد. مقدار حلالیت پروتئین با مقدار به‌دست آمده از پژوهش ژائو و همکاران [۳۵] مطابقت دارد. نتایج پژوهش‌های محققین نشان می‌دهد که معمولا میزان حلالیت پروتئین‌ها بالای ۶۰ ٪ می‌باشد که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد [۳۸]. با توجه به اینکه حلالیت در آب یکی از مهم‌ترین خصوصیات پروتئین‌ها است، بر روی سایر خصوصیات یعنی امولسیون کنندگی، کف کنندگی، پایداری و تشکیل ژل نیز نقش مهمی دارد [۳۹]. پروتئین‌ها وابسته به pH ای که دارند بارهای الکتریکی مثبت و منفی با خود حمل می‌کنند بنابراین دفع الکترواستاتیکی و هیدراتاسیون یونی پروتئین‌ها حلالیت آن‌ها را افزایش می‌دهد [۴۰]. چاروئن و همکاران [۳۱] حلالیت پروتئین بستگی به اندازه پپتیدهای پروتئین دارد. به‌طورکلی پپتیدهای کوتاه زنجیر نسبت به انواع بلند زنجیر حلالیت بیشتری دارند که به‌طور مستقیم بستگی به گروه‌های کربوکسیل و آمینی اسیدهای آمینه پروتئین‌ها دارد. بنابراین حلالیت اسیدهای آمینه پروتئین‌ها، پپتیدها و اسیدهای آمینه به‌طور قوی بستگی به بار منفی یون‌ها دارد. چاروئن و همکاران [۳۱] میزان حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده سبوس برنج که در شرایط مختلف به‌دست آمده بود را در محدوده ۴۳/۰- ۲۷/۲۸٪ گزارش نمودند که با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین میزان جذب آب پروتئین سبوس برنج و پروتئین هیدرولیز شده آن به‌ترتیب ۰/۹±۲/۵۶ و ml/g ۱/۰±۵/۴۸ محاسبه شد. در یک پژوهش یادآو و همکاران [۱۶] میزان جذب آب پروتئین سبوس واریته‌های مختلف برنج را بین ۱/۹۵ تا ml/g ۲/۹۷ گزارش نمودند و میزان جذب آب را مرتبط با

درجه هیدرولیز پروتئین‌ها و شرایط هیدرولیز دانستند. ژائو و همکاران [۳۵] ضمن بررسی تاثیر روش‌های مختلف بر میزان جذب آب پروتئین‌های سبوس برنج نشان دادند که عملیات هیدرولیز منجر به افزایش خاصیت جذب آب پروتئین‌ها می‌شود که با نتایج این پژوهش مطابقت دارد.

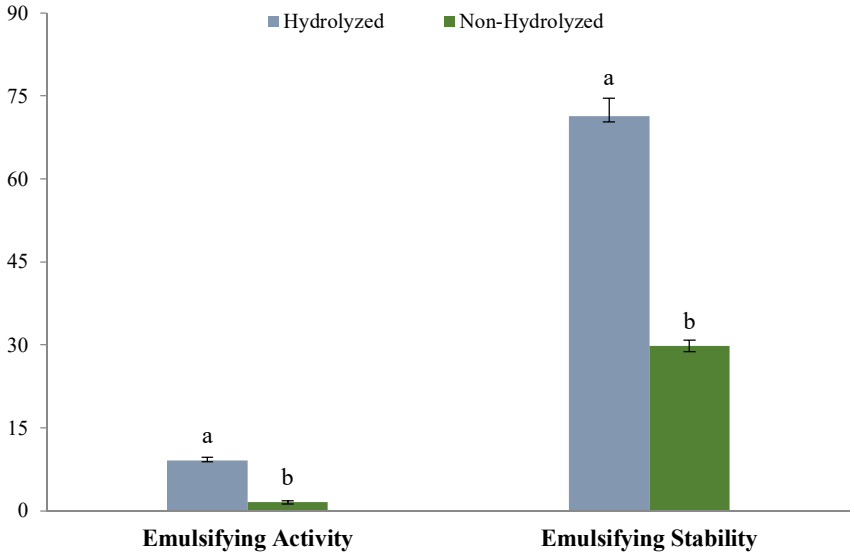
۴.۳. ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون

توانایی تولید امولسیون در ترکیبات با ماهیت پروتئینی و پپتیدی مرتبط با جذب آن‌ها در سطح قطره‌های روغن، در برگرفتن این قطره‌ها و هم‌چنین جلوگیری از اتصال مجدد قطره‌ها بعد از فرایند امولسیون‌سازی و هموژنیزاسیون تعریف می‌گردد [۴۱]. حلالیت، خصوصیات هیدروفوبی و وزن مولکولی پروتئین‌ها و پپتیدها مهم‌ترین خصوصیت موثر بر قدرت امولسیون کنندگی پروتئین‌ها می‌باشد. به‌طور کلی پپتیدهایی که اسیدهای آمینه آن‌ها بیشتر از نوع آبگریز است و زنجیره طویل‌تری دارند دارای حلالیت و قدرت امولسیون کنندگی بالاتری هستند [۴۱]. اندازه‌گیری ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری آن به صورت توام می‌تواند نتایج قابل اطمینانی در مورد اثرات پروتئینازی امولسیفایرها در اختیار قرار دهد [۴۲]. ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج با استفاده از آنزیم فلاورزایم به‌ترتیب ۹/۱۲ m^2/g و ۷۱/۳۸ min محاسبه شد. این پارامتـــرها برای پروتئین هیدرولیز نشده به‌ترتیب ۱/۵۵ m^2/g و ۲۹/۷۷ min بود. چاروئن و همکاران [۳۱] ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده دو واریته سبوس برنج کشور تایلند را ۵/۰۵ و ۸/۷۸ m^2/g پروتئین گزارش نمودند که از نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر کمتر است. به‌طور کلی در هنگام عمل هیدرولیز میزان حلالیت پپتیدها افزایش می‌یابد و آن‌ها به فضای میان آب و روغن مهاجرت می‌نمایند [۳۰، ۳۸]. پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌توانند به‌عنوان ترکیبات فعال سطحی در نظر گرفته شوند چراکه آن‌ها هر دو دسته اسیدهای آمینه آبدوست و چربی‌دوست را در کنار یکدیگر دارند که خصوصیات سورفاکتانت به آن‌ها می‌بخشد. با توجه به اینکه پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌توانند بین بخش‌های آبدوست و آبگریز تعادل برقرار کنند در نهایت منجر به افزایش قدرت امولسیون کنندگی خواهند شد [۳۸، ۴۱]. در صورتی‌که زمان هیدرولیز طولانی و یا هیدرولیز با شدت بالا انجام شود، پایداری امولسیون حاصل از پروتئین‌های هیدرولیز شده کاهش خواهد یافت [۴۳، ۴۴]. به عبارت دیگر پپتیدهایی که وزن مولکولی بسیار پائین دارند خواص آمفیفیل کافی ندارند. لی و همکاران [۳۸] نشان دادند که استفاده از آنزیم تریپسین در هیدرولیز پروتئین سبوس برنج باعث افزایش قدرت امولسیون کنندگی در پروتئین در مقایسه با نمونه‌های هیدرولیز شده می‌شود.

یئوم و همکاران [۲۶] بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون را به‌ترتیب معادل ۸ m^2/g و ۵۰ min به‌دست آوردند که کمتر از نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است، پس می‌توان گفت آنزیم فلاورزایم برای هیدرولیز بر روی خاصیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون موثرتر از آنزیم پروتئاز و سرم آلبومین گاوی استفاده شده در پژوهش یئوم و همکاران [۲۶] بوده است. بین میزان حلالیت پروتئین‌ها در آب و خصوصیات امولسیون کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده رابطه مستقیم و منطقی وجود دارد. با افزایش هیدرولیز پروتئین میزان حلالیت آن افزایش می یابد و در نتیجه میزان خصوصیات امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین هیدرولیز شده افزایش می یابد. نتایج بررسی در پژوهش‌های مختلف نشان می‌دهد که خصوصیات امولسیون کنندگی پروتئین ممکن است با درجه هیدرولیز پروتئین، اندازه و وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده، کنفورماسیون پروتئین و بار منفی آن رابطه داشته باشد [۴۵]. پپتیدها و پروتئین‌های با خاصیت امولسیون کنندگی بالا می‌توانند به‌دلیل توانایی آرایش در ساختارهای مناطق بین سطحی امولسیون کشش سطحی را بین دو فاز آب و روغن را کاهش دهند [۳۱، ۴۶، ۴۷].

۵.۳. تاثیر پروتئین هیدرولیز شده برخصوصیات ماست

نتایج مربوط به pH و اسیدیته نمونه‌های مختلف ماست در جدول (۲) نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده در فرمولاسیون ماست اسیدیته به‌طور معنی‌داری افزایش و pH به میزان جزئی کاهش یافته است. دیو و شا [۴۸] نشان دادند که استفاده از ترکیبات پروتئینی مانند آب پنیر و یا کازئین در فرمولاسیون ماست منجر به افزایش اسیدیته ماست می‌شود که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.



شکل (۱) فعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین‌های هیدرولیز شده و نشده

Fig. 1. Effect of flavourzyme enzyme on emulsifying activity and emulsifying stability index of hydrolyzed and non-hydrolyzed protein

جدول (۲) خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست حاوی پروتئین هیدرلیز شده.

Table 2 Physicochemical properties of yogurt containing different levels of hydrolyzed protein.

پروتئین هیدرولیز شده (٪) Hydrolyzed Protein(%)	0	1	1.5	2
pH	4.53±0.04^{b}	4.46±0.03^{b}	4.33±0.03^{a}	4.30±0.03^{a}
اسیدیته(درصد اسید لاکتیک) Acidity (% Lactic Acid)	1.35±0.04^{d}	1.51±0.03^{c}	1.61±0.03^{b}	1.72±0.04^{a}
ویسکوزیته Viscosity (mPa.s at 100 rpm)	104.0±2.1^{d}	122.9±2.7^{c}	145.1±3.0^{b}	172.96±2.5^{a}
ظرفیت نگه‌داری آب Water holding capacity(g/100g)	31.7±1.08^{d}	36.21±0.75^{c}	41.75±0.89^{b}	46.10±1.79^{a}

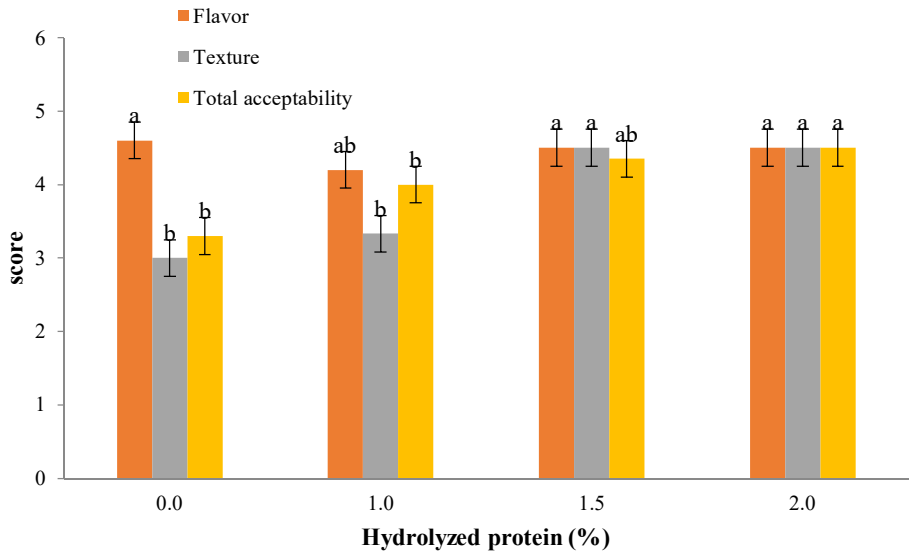
Different letters in each row indicated significant statistical different at P<0.05.

گنزالز- مازتینز و همکاران [۴۹] نیز مشخص نمودند که استفاده از پروتئین‌های آب پنیر افزوده شده به فرمولاسیون ماست منجر به افزایش اسیدیته ماست طی دوره نگه‌داری می‌شود. شاکری و همکاران [۵۰] تاثیر استفاده از پروتئین کازئین هیدرولیز شده در اسیدیته ماست را مورد بررسی قرار دادند که در پژوهش آن‌ها با افزایش غلظت پروتئین‌های هیدرولیز شده اسیدیته افزایش یافت و مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر است. روماناس و همکاران [۵۱] تاثیر پروتئین‌های هیدرولیز شده سویا بر pH و اسیدیته نمونه‌های مختلف ماست طی دوره نگه‌داری را مورد بررسی قرار دادند و مشخص گردید که روز اول نگه‌داری pH نمونه فاقد پروتئین از نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده بالاتر است که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد. هم‌چنین آن‌ها، اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌های شاهد و نمونه‌های حاوی پروتئین‌های هیدرولیز شده سویا از نظر اسیدیته نشان ندادند.

در دسترس قرار گرفتن گروه‌های تیول در پروتئین‌ها بر خصوصیات ژل تشکیل شده تاثیر می‌گذارد [۵۲]. همانطور که در جدول (۲) نشان داده شد، افزایش غلظت پروتئین‌های هیدرولیز شده در فرمولاسیون ماست منجر به افزایش ویسکوزیته و کاهش آب‌اندازی ماست شد. در یک پژوهش

همایونی راد و همکاران [۵۳] تاثیر آنزیم کیموترپسین بر هیدرولیز نسبی پروتئین‌های شیر و اثر آن در بستنی کم‌چرب را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که با افزایش سطوح آنزیم مقدار هیدرولیز پروتئین افزایش و ویسکوزیته بستنی کاهش می‌یابد که مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش حاضر نیست که دلیل اختلاف، اضافه کردن مستقیم آنزیم به فرمولاسیون بستنی می‌باشد در حالی‌که در این پژوهش در ابتدا پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم تولید شد و سپس پروتئین‌های هیدرولیز شده به ماست اضافه شدند. نتایج بررسی‌های مولکولی پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج نشان می‌دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده سبوس برنج اندازه گسترده‌ای از پپتیدها را شامل می‌شوند که معمولا پلی پپتیدها و پپتیدهای با وزن مولکولی پائین و بالا هستند. پروتئین‌های هیدورلیز شده بخش کوچکی از ماکرومولکول‌های پروتئینی بزرگ هستند [۹]. چاروئن و همکاران [۳۱] خصوصیات عملکردی و کاربردی پروتئین‌های هیدرولیز شده سبوس برنج در امولسیون روغن در آب را مورد بررسی قرار دادند و نشان داند که اسیدهای آمینه گلوتامین، آلانین، والین و لوسین تشکیل داده است. این اسیدهای آمینه با افزایش جذب آب و خصوصیات کف کنندگی منجر به افزایش ویسکوزیته ماست می‌شوند. این نتایج مطابق با نتایج به‌دست آمده از پژوهش‌های روماناس و همکاران [۵۱]، سودینی و همکاران [۵۴] ؛ ژائو و همکاران [۵۵] و تمیم و رابینسون [۵۶] می‌باشد. آن‌ها گزارش کردند که افزودن پروتئین‌های هیدرولیز شده کازئین و آب پنیر به میزان g/100g ۰/۳-۰/۵ به شیر منجر به کاهش زمان تخمیر، افزایش ویسکوزیته ماست و کاهش آب اندازی ماست می‌شود. هم‌چنین در پژوهش‌های آن‌ها مشخص گردید که اضافه کردن پروتئین‌های کازئین هیدرولیز شده منجر به رشد یکنواخت استرپتوکوکوس ترموفیلوس می‌شود و به‌دلیل افزایش در تعداد باکتری‌های پروبیوتیک در ماست بسیار مطلوب است [۵۷]. نتایج مربوط به پذیرش حسی نمونه‌های مختلف ماست در شکل (۲) نشان می‌دهد که نمونه‌ها از نظر رنگ و طعم با هم اختلاف معنی‌دار نداشته‌اند. در مورد بافت نمونه‌های حاوی ۱/۵ و ۲ ٪ پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج امتیاز بالاتری داشتند که با نتایج به‌دست آمده از بخش ویسکوزیته نیز مطابقت دارد.

از نظر پذیرش حسی، نمونه حاوی ۱/۵٪ پروتئین هیدرولیز شده بالاترین امتیاز پذیرش حسی کلی را داشته و با نمونه حاوی ۲٪ پروتئین اختلاف معنی دار نداشتند. همانطور که در بخش‌های قبل نشان داده شد استفاده از پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج بر روی خصوصیات کاری مانند ویسکوزیته اثر داشت و آن را افزایش داد که خود در پذیرش حسی و بافت توسط مصرف-



شکل (۲) نتایج پذیرش حسی نمونه‌های ماست حاوی پروتئین هیدرولیز شده

Fig. 2. Sensory properties of yogurt containing hydrolyzed protein

کننده اثر دارد. از سوی دیگر استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده با افزایش جذب آب بر طعم نمونه ها و احساس دهانی آن‌ها اثرگذار است. شاکری و همکاران [۵۰]، تاثیر مکمل‌های پروتئینی مختلف را بر خصوصیات حسی ماست غنی شده مورد بررسی قرار دادند و مشخص شد که نمونه‌های غنی شده با پروتئین ها نسبت به نمونه شاهد امتیاز پذیرش حسی بالاتری داشتند که با نتایج این پژوهش نیز مطابقت دارد.

۴. نتیجه‌گیری

سبوس برنج یکی از مهم‌ترین ضایعات صنایع تبدیلی در استان مازندران و محصول جانبی کارخانه‌های شالیکوبی است که به‌دلیل وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای نمی‌تواند به‌طور مستقیم مورد استفاده انسان قرار گیرد. پروتئین هیدرولیز شده سبوس برنج که در این پژوهش با استفاده از آنزیم فلاورزایم به‌دست آمد، به‌دلیل دارا بودن درجه هیدرولیز بالا، بازده استخراج مناسب، ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون قابل رقابت با کنسانتره پروتئینی به منظور غنی سازی ماست کم‌چرب مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی ماست نشان داد که تاثیر استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین بر pH، اسیدیته و ویسکوزیته ماست معنی‌دار بود. با توجه به نتایج، استفاده از ۱/۵٪ پروتئین هیدرولیز شده در فرمولاسیون ماست می‌تواند در صنعت مورد استفاده قرار بگیرد.

مراجع

[1] Aguilar-Garcia, C., Gavino, G., Baragano-Mosqueda, M., Hevia, P. Gavino, V.C. (2007). Correlation of tocopherol, tocotrienol, γ-oryzanol and total polyphenol content in rice bran with different antioxidant capacity assays. *Food Chem.,* 102(4), 1228-1232.

[2] Phongthai, S., Rawdkuen, S. (2015). Preparation of rice bran protein isolates using three-phase partitioning and its properties. *FABJ.*, 3(2), 137-149.

[3] Chandi, G.K., Sogi, D.S. (2007). Functional properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Eng.*, 79(2), 592-597.

[4] Sun, Q., Xiong, C.S.L. (2014). Functional and pasting properties of pea starch and peanut protein isolate blends. *Carbohydr. Polym.,* 101, 1134-1139.

[5] Kinsella, J.E., Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 7(3), 219-280.

[6] Wang, M., Hettiarachchy, N.S., Qi, M., Burks, W., Siebenmorgen, T. (1999). Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem*, 47(2), 411-416.

[7] Gupta, S., Chandi, G.K., Sogi, D.S. (2008). Effect of extraction temperature on functional properties of rice bran protein concentrates. *INT. J. FOOD ENG.*, 66, 103-116.

[8] Tang, S., Hettiarachchy, N.S. and Shellhammer, T.H. (2002). Protein extraction from heat-stabilized defatted rice bran. 1. Physical processing and enzyme treatments. *J. Agric. Food Chem..,* 50(25), 7444-7448.

[9] Hamada, J.S. (2000). Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases. *J. Food Sci.,* 65(2), 305-310.

[10] Aguirre-Mandujano, E., Lobato-Calleros, C., Beristain, C.I., Garcia, H.S. Vernon-Carter, E.J. (2009). Microstructure and viscoelastic properties of low-fat yoghurt structured by monoglyceride gels. *LWT-FOOD SCI. TECHNOL.*, 42(5), 938-944.

[11] Demirci, T., Aktaş, K., Sözeri, D., Öztürk, H.İ., Akın, N. (2017). Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. *J. Funct. Foods*, 36, 396-403.

[12] Damin, M.R., Alcântara, M.R., Nunes, A.P., Oliveira, M.N. (2009). Effects of milk supplementation with skim milk powder, whey protein concentrate and sodium caseinate on acidification kinetics, rheological properties and structure of nonfat stirred yogurt. *LWT-FOOD SCI. TECHNOL.*, 42(10), 1744-1750.

[13] Gnanasambandam, R., HelTiarachchy, N.S. (1995). Protein concentrates from unstabilized and stabilized rice bran: preparation and properties. *J. Food Sci.,* 60(5), 1066-1069.

[14] AOAC. (1990). Official methods of analysis. Vol. I. 15th ed. AOAC, Arlington, VA.

[15] Thamnarathip, P., Jangchud, K., Jangchud, A., Nitisinprasert, S., Tadakittisarn, S., Vardhanabhuti, B. (2016). Extraction and characterisation of R iceberry bran protein hydrolysate using enzymatic hydrolysis. *INT. J. FOOD SCI. TECH.,* 51(1), 194-202.

[16] Yadav, R.B., Khatkar, B.S., Yadav, B.S. (2013). Electrophoretic characterization and functional properties of rice proteins from Indian rice cultivars. *Int. J. Food Prop.*16(8), 1776-1788.

Application of Rice Bran Protein Hydrolysates in Oil in Water Emulsions: Their Stabilities to Environmental Stresses. World Academy of Science, Engineering and Technology. *INT. J. FOOD ENG.* 12(8), 240-246.
[32] Patsanguan, S., Hisaranusorn, N., Phongthai, S., Rawdkuen, S. (2014). Rice Bran Protein Isolates: Preparation and their Physico-Chemical and Functional Properties. *FABJ.,* 2(3), 169-182.
[33] Ma, Y.S., Wang, L.T., Sun, X.H., Zhang, J.Q., Wang, J.F., Li, Y. (2014). Study on hydrolysis conditions of flavourzyme in soybean polypeptide alcalase hydrolysate and soybean polypeptide refining process. *Adv. J. Food Sci. Technol.,* 6(9), 1027-1032.
[34] Uraipong, C., Zhao, J. (2016). Rice bran protein hydrolysates exhibit strong in vitro α-amylase, β-glucosidase and ACE-inhibition activities. *J. Sci. Food Agric*., 96(4),1101-1110.
[35] Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W., Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chem.*, 134(3),1360-1367.
[36] Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J.C. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Res. Int.,* 39(9), 945-963.
[37] Trevino, S.R., Scholtz, J.M., Pace, C.N. (2007). Amino acid contribution to protein solubility: Asp, Glu, and Ser contribute more favorably than the other hydrophilic amino acids in RNase Sa. *J. Mol. Biol.*, 366(2), 449-460.
[38] Li, X., Xiong, H., Yang, K., Peng, D., Peng, H., Zhao, Q. (2012). Optimization of the biological processing of rice dregs into nutritional peptides with the aid of trypsin. *J. Food Sci. Technol.*, 49(5), 537-546.
[39] Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F. (1999). Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *J. Am. Oil Chem. Soc.,*, 76(12), 1455-1460.
[40] El Nasri, N.A., El Tinay, A.H. (2007). Functional properties of fenugreek (Trigonella foenum graecum) protein concentrate. *Food chem.*, 103(2), 582-589.
[41] Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F., Hayes, K.D. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis). . *J. Food Sci.,* 74(2),C126-C133.
[42] Pearce, K.N., Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *J. Agric. Food Chem..,* 26(3), 716-723.
[43] Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., Zhou, H.M. (2013). Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. *INT. FOOD RES. J.,* 20(5), 2081.
[17] Bera, M.B. Mukherjee, R.K. (1989). Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci.,* 54(1), 142-145.
[18] Raftani Amiri, Z., Mahmodi, M, M J., Alimi, M. (2013). Effect of maltodextrin as a fat replacer on the quality of non-fat yogurt. J. Food res., 23(1), 133 – 142
[19] Keshavarz Hedayati, A.A., Alami, M., Motamedzadehgan, A., maghsodlo, Y., ghorbani, M., daraei garme khani, A. (2011). Chemical composition and physicochemical properties of Iranian rice bran. J. *Innov. Food Sci. Tech.,* 4(3), 1 - 7
[20] Bhattacharya, K.R. (1988). Rice bran: regional extension service centre (rice milling) scientific series no. 7. Department of Food, Government of India, CFTRI, Mysore, 570013.
[21] Amissah, J.G.N., Ellis, W.O., Oduro, I., Manful, J.T. (2003). Nutrient composition of bran from new rice varieties under study in Ghana. *Food Control*, 14(1), 21-24.
[22] Abdul-Hamid, A., Luan, Y.S. (2000). Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food chem..*, 68(1), 15-19.
[23] Hanmoungjai, P.Y.L.E., Pyle, D.L., Niranjan, K. (2001). Enzymatic process for extracting oil and protein from rice bran. *J. Am. Oil Chem. Soc.,* 78(8), 817-821.
[24] Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J.F., de Teran, L.C., Bautista, J. (2006). Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. *Food Chem.,* 98(4), 742-748.
[25] Yasumatsu, K., Sawada, K., Moritaka, S., Misaki, M., Toda, J., Wada, T., Ishii, K. (1972). Whipping and emulsifying properties of soybean products. *Agr. Biol. Chem.,* 36(5), 719-727.
[26] Yeom, H.J., Lee, E.H., Ha, M.S., Ha, S.D., Bae, D.H. (2010). Production and physicochemical properties of rice bran protein isolates prepared with autoclaving and enzymatic hydrolysis. *J. KOREAN SOC. APPL. BI.*, 53(1), 62-70.
[27] Shih, F.F., Champagne, E.T., Daigle, K., Zarins, Z. (1999). Use of enzymes in the processing of protein products from rice bran and rice flour. *Nahrung*, 43(1), 14-18.
[28] Aoe, S., Oda, T., Tatsumi, K., Yamauchi, M., Ayano, Y. (1993). Extraction of soluble dietary fibers from defatted rice bran. *Cereal chem.*, 70, 423-423.
[29] Alashi, A.M., Blanchard, C.L., Mailer, R.J., Agboola, S.O., Mawson, A.J., He, R., Girgih, A., Aluko, R.E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemist.*, 146, 500-506.
[30] Zhang, H.J., Wang, J., Zhang, B.H., Zhang, H. (2014). Antioxidant activities of the fractionated protein hydrolysates from heat stable defatted rice bran. *INT. J FOOD SCI . TECH.,* 49(5),1330-1336.
[31] Charoen, R. Tipkanon, S. Savedboworn, W. Phonsatta, N. Panya. A. (2018). Functionality and

yogurt textural and sensorial properties: a review. *J. DAIRY RES.,* 80(4) ,400-409.

[44] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chem.,* 102(4), 1317-1327.

[45] Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C., Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.*, 36(5), 883-892.

[46] Kinsella, J.E., Melachouris, N. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*,, 7(3), 219-280.

[47] McClements, D.J. (2015). *Food emulsions: principles, practices, and techniques*. CRC press.

[48] Dave, R.I., Shah, N.P. (1998). The influence of ingredient supplementation on the textural characteristics of yogurt. *Aust. J. Dairy Technol.,* 53(3): 180.

[49] González-Martınez, C., Becerra, M., Cháfer, M., Albors, A., Carot, J.M., Chiralt, A. (2002). Influence of substituting milk powder for whey powder on yoghurt quality. *TRENDS FOOD SCI. TECH.,* 13(9-10), 334-340.

[50] Shakeri, M., Beyraghi tosi, Sh., Mortazavi, S.A. (2006). Effects of whey protein concentrate and fructooligosaccharide on the rheological and sensory properties of reduced-fat probiotic yoghurt. Iranian Food Sci. Tech., 3(2), 1 – 9 [in Persian].

[51] Roumanas, D., Moatsou, G., Zoidou, E., Sakkas, L. Moschopoulou, E. (2016). Effect of enrichment of bovine milk with whey proteins on biofunctional and rheological properties of low fat yoghurt-type products. *Curr. Res. Nutr. Food Sci.,* 4(Special Issue Nutrition in Conference October 2016), 105-113.

[52] Vasbinder, A.J., De Kruif, C.G. (2003). Casein–whey protein interactions in heated milk: the influence of pH. *Int. Dairy J.,* 13(8), 669-677.

[53] Homayoni rad, A., Ehsani, M.R., Ebrahimzadeh Mosavi, M.A., Valizadeh, M., Emam Jomeh, Z. (2004). Improving the quality of low-fat ice cream by hydrolyzing of casein micelles with chymosin(1). Iranian J. Agric. Sci., 36(3), 765 -773.

[54] Sodini, I., Montella, J., Tong, P.S. (2005). Physical properties of yogurt fortified with various commercial whey protein concentrates. *J. Sci. Food Agric*, 85(5), 853-859.

[55] Zhao, Q.Z., Wang, J.S., Zhao, M.M., Jiang, Y.M., Chun, C. (2006). Effect of Casein Hydrolysates on Yogurt Fermentation and Texture Properties during Storage. *FOOD TECHNOL. BIOTECH.,* 44(3).

[56] Tamime, A.Y., Robinson, R.K. (2007). *Tamime and Robinson's yoghurt: science and technology*. Elsevier.

[57] Karam, M.C., Gaiani, C., Hosri, C., Burgain, J., Scher, J. (2013). Effect of dairy powders fortification on

Research Article

Enzymatic extraction of rice-bran protein from Tarom variety and its functional effects on Physico-Chemical properties of low-fat yogurt

Nayeb Gholami[1], Zeinab Raftani Amiri [2*], Reza Safari[3]

1. MSc Student, Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Iran.
2. Associate professor, Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Assistant Professor, Assistant professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Iran.

Abstract
In this study hydrolyzed protein was obtained from rice bran of Tarom cultivar by using flavourzyme enzyme for 2 hours and at pH 8. The chemical composition of rice bran and hydrolyzed protein was measured. Degree of protein hydrolysis of rice bran was calculated to be 18.53% after 2 hours of treatment. The water absorption of rice bran and its hydrolyzed protein was calculated to be 2.56 ± 0.9 ml/g and 5.48 ± 1.0 ml/g, respectively. The solubility of hydrolyzed and non-hydrolyzed proteins was 84.09 ± 3.2 and 65.17 ± 4.5, respectively. The emulsifying capacity and emulsifying stability of hydrolyzed protein were calculated to be 9.12 m2 /g and 71.38 min, using the flavourzyme enzyme, respectively. These parameters for non-hydrolyzed protein were 1.55 m^2/g and 29.77 min, respectively. Hydrolyzed protein was added to yoghurt at 0, 1, 1.5 and 2% levels, and the physicochemical properties of yogurt were measured. Increasing the concentration of hydrolyzed proteins in yogurt formulation resulted in increased viscosity. By increasing the amount of hydrolyzed protein in the formulation of yogurt, acidity significantly increased and the pH decreased to a significant extent. Using 1.5% of the hydrolyzed protein in low fat yogurt formulation is recommended.

Keywords: Hydrolyzed protein, Tarom, Low fat yogurt, Flavourzyme.

[*] Corresponding author: zramiri@gmail.com