مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهاردهم، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۸، صفحات ۱۰۲-۸۹

اثر زمان فرآیند بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده کینوآ با آلکالاز و پانکراتین

یوسف صادقیان امین[۱]، علیرضا صادقی‌ماهونک[۲]، محمد قربانی[۳]، مهران اعلمی[۳]، حمید جوشقانی[۴]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان،گرگان، ایران
۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@gau.ac.ir
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۳- دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گلستان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۵ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۱۸

چکیده

سابقه و هدف: سالیان زیادی است که برای کاهش اکسیداسیون لیپیدها و افزایش ماندگاری محصولات غذایی از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود. اما باتوجه به معایب کاربردی و محدودیت های قانونی از نقطه نظر ایمنی آنتی‌اکسیدان‌ها و شلاته‌کننده‌های سنتزی، محققین به‌دنبال استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های از منابع طبیعی هستند. هدف این تحقیق، بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوآ بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوآ با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین بر درجه هیدرولیز، حلالیت، امولسیون‌کنندگی، کف‌کنندگی، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال هیدروکسیل، قدرت احیاءکنندگی، مهار رادیکال ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (TEAC)، و شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش قابل توجه حلالیت، فعالیت امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی به‌ویژه در شرایط اسیدی می‌گردد. همچنین پس از هیدرولیز آنزیمی، مهار رادیکال آزاد DPPH (از ۱۶/۸۵ به ۵۶/۰۴٪)، مهار رادیکال هیدروکسیل (از ۲۶/۳۱ به ۶۳/۹۱٪)، قدرت احیاءکنندگی (از ۰/۴۴ به ۰/۹۵ جذب در ۷۶۵nm)، مهار رادیکال ABTS (از ۳۰/۰۱ به ۶۸/۴۲٪)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس (از ۰/۷۳ به ۱/۸۳mM)، شلاته‌کنندگی یون آهن (از ۳۶/۹۱ به ۷۰/۶۴٪) و شلاته‌کنندگی یون مس (از ۳/۷۶ به ۱۰/۷۶٪) در بالاترین مقدار افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر اثر هیدرولیز آنزیمی بر بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین کینوآ و تولید هیدرولیزشده‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بود. همچنین، اثر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (آلکالاز و پانکراتین) بر هر یک از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت بود.

واژگان کلیدی: آلکالاز، پانکراتین، کینوآ، ویژگی‌های عملکردی، هیدرولیز آنزیمی

• مقدمه

پراکسیداسیون لیپیدها در سیستم‌های غذایی موجب از بین رفتن کیفیت غذا مانند ایجاد عطر و طعم تند، طعم غیرقابل قبول و کاهش عمرماندگاری محصول می‌شود. تنش اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های مربوط به سن ایفا می‌کند. از این بیماری‌ها می‌توان به آلزایمر، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد مانند تصلب شرایین، دیابت، آرتریت روماتوئید (۱) و در نهایت سرطان در نتیجه آسیب اکسیداتیو DNA(۲) نام برد. همچنین، تنش اکسیداتیو موجب شروع یا تشدید بیماری‌های قلبی- عروقی مانند تصلب شرائین در بیمارانی با سندروم متابولیک می‌شود (۳). بنابراین با توجه به ارتباط مستقیم و نزدیک بروز بیماری‌ها و تنش‌های اکسیداتیو، کنترل رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو یکی از راه‌های مهم

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

کاهش سرعت رشد و یا جلوگیری از بروز بیماری‌ها و اختلالات ناشی از آن‌هاست. در صنایع برای پیشگیری از اکسیداسیون لیپیدها در محصولات مختلف از آنتی‌اکسیدان-های سنتزی (BHA، BHT و پروپیل گالات‌ها) استفاده می-شود، اما به‌علت خطرات بالقوه، استفاده از این آنتی‌اکسیدان‌ها در برخی محصولات غذایی و در برخی کشورها محدود یا ممنوع شده است. از این رو تحقیقات بسیاری در خصوص استخراج، شناسایی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف از منابع طبیعی انجام گرفته است.

یکی از این منابع طبیعی، پروتئین‌ها هستند که جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی انسان‌ها دارند. پروتئین‌ها به‌عنوان منبع تأمین انرژی و اسیدهای آمینه ضروری برای رشد و حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی انسان شناخته می‌شوند. اخیراً، پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع حیوانی و گیاهی مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. این ترکیبات، بخش‌های پروتئینی ویژه‌ای هستند که درون توالی پروتئین اولیه، غیرفعال می‌باشند و به‌طورکلی این پپتیدها حاوی ۲ تا ۲۰ آمینواسید هستند (۴). پپتیدهای آنتی‌اکسیدان ترکیباتی سلامتی بخش، ایمن، با وزن مولکولی کم، هزینه اندک، فعالیت بالا و جذب آسان هستند. همچنین از دیگر مزایای این ترکیبات نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌توان به پایداری بالاتر در شرایط مختلف، بی‌خطر بودن، ارزش تغذیه-ای و عملکردی (Functional) آن‌ها اشاره کرد (۵). از ویژگی-های این پپتیدها می‌توان به فعالیت‌های تسکین دهنده (Opiate-like)، قابلیت اتصال به مواد معدنی (Mineral binding)، تعدیل کننده ایمنی (Immunomodulatory)، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد لخته‌شدن خون، کاهندگی کلسترول خون و ضدفشار خون، ضد آلرژی‌زایی، بهبود زیست دسترسی (Bioavailability) و ضدسرطانی اشاره کرد (۶). اگرچه مکانیزم دقیق عملکرد آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و هیدرولیز شده‌ها هنوز به‌طور دقیق مشخص نیست، اما نتایج مطالعات مختلف حاکی از اثر بازدارندگی پراکسیداسیون لیپیدها (۷)، مهار رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی است (۸).

یکی از منابع با ارزش گیاهی، کینوآ (*Chenopodium quinoa*) است که منبع غنی از ترکیبات مغذی و پروتئین محسوب می‌شود. دانه کینوآ دارای ۱۶/۵- ۱۲/۹ درصد پروتئین است (۹). پروتئین دانه کینوآ عمدتا شامل گلوبولین و آلبومین و مقدار جزئی پرولامین است (۱۰). دانه کینوآ منبع غنی از پیش‌ساز ویتامین A و ویتامین E و ویتامین‌های گروه B است (۱۱). مقدار خاکستر کل دانه کینوآ بالا می‌باشد و در حدود ۳/۴ درصد است (۱۲). دانه کینوآ دارای کمترین مقدار اسید فیتیک در مقایسه با غلات است و اثر ممانعت‌کنندگی آن بر جذب آهن به مراتب کمتر می‌باشد (۱۳). باتوجه به اهمیت استفاده از منابع پروتئینی طبیعی در رژیم غذایی، همچنین اصلاح ساختار پروتئینی با هدف بهبود ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی، هدف از این مطالعه بررسی اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین در زمان‌های مختلف بر درجه هیدرولیز، ویژگی‌های عملکردی و شاخص-های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئین کینوآ بود.

• مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: دانه کینوآ، آلکالاز، پانکراتین، تری-کلرواستیک اسید TCA (Trichloroacetic acid)، کوماسی بلو (G250)، DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)، ABTS {2,2′-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt}، پتاسیم پرسولفات، ترولوکس، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، تیوباربیتوریک اسید TBA (Thiobarbituric acid)، سدیم دودسیل سولفات SDS (Sodium dodecyl sulphate) از شرکت سیگما خریداری شدند. روغن هسته انگور (Olitalia، ایتالیا)، اتانول، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم کلراید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسید فسفریک (مرک، آلمان) نیز در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج پروتئین: به‌منظور چربی‌زدایی،دانه‌های خشک کینوآپس از آسیاب و الک کردن به نسبت ۱:۴ (وزنی/ حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق همزده شدند. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا شده و آرد حاصل در دمای اتاق خشک گردید و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد.عملیات استخراج پروتئین از پودر چربی‌زدایی شده به این صورت بود که پودر کینوآبه نسبت ۱:۱۰ با محلول M-۰/۳۳NaCl ، pH=۹/۲۵ مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت همزده شد، سپس محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژگردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در pH =۴/۵ (pH ایزوالکتریک پروتئین) تنظیم شد. سپس در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در ۴۵۰۰×gبه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در ۴۵۰۰×g، به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژگردید و با تنظیم pH=۷/۲ با افزودن سود M ۱ ،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

دوباره به حالت محلول تبدیل شد. سپس کنسانتره پروتئین حاصل به روش انجمادی خشک شده و در دمای ۴°C نگهداری شد. تمامی فرآیندها در دمای اتاق انجام گرفت (۱۴).

هیدرولیز کینوآ: برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، کینوآ را در غلظت ۵ درصد وزنی – حجمی در بافر فسفات ۰/۲ M (pH=۷/۴) حل نموده و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم‌زدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط مهیا شد. سپس آنزیم پانکراتین و آلکالاز به‌طور مجزا در نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۵ درصد وزنی - وزنی به سوسپانسیون حاوی کینوآ افزوده شد. دمای واکنش برای پانکراتین ۴۰°C و برای آلکالاز ۵۰ °C و در مقدار pHهای به‌ترتیب ۷/۴ و ۸ در مقدار بهینه فعالیت هر آنزیم ثابت نگه‌داشته شدند. زمان واکنش در شرایط هم‌زدن مداوم با دور ۲۰۰rpm در مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰و۳۰۰ دقیقه متغیر در نظر گرفته شد. برای غیرفعال کردن فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب۹۰°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور ۵۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ °C- نگهداری گردید (۱۵).

درجه هیدرولیز: سوسپانسیون کینوآ هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید ۱۰درصد در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴°C انکوبه شد. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید با روش بردفورد (۱۶) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز بر حسب مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی TCA به پروتئین موجود در سوسپانسیون (پس از رقیق‌سازی با آب مقطر به حجم مساوی) و بر حسب درصد محاسبه شد.

ویژگی‌های عملکردی

انحلال‌پذیری: برای تعیین میزان انحلال‌پذیری پروتئین‌های هیدرولیز شده از روشJamdar و همکاران (۱۷) با مقدار جزئی اصلاحات استفاده شد. به این شکل که، برای ارزیابی اثر هر pH بر حلالیت پروتئین‌ها، ۲۰۰mg پروتئین هیدرولیز شده در۲۰ ml آب مقطر پراکنده و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ N در مقادیر ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم شد. محلول در ۱۰۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت با استفاده از روش بردفورد تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت بر پروتئین محلول اولیه تعیین گردید.

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: ویژگی‌های امولسین‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (۱۸) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا ۵ml روغن هسته انگور و ۱۵ml محلول ۱درصد پروتئین با هم مخلوط و pH با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ N به ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ تنظیم شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر در سرعت ۲۰۰۰۰rpm برای ۱ دقیقه هموژن گردید. سپس، ۵۰µl نمونه امولسیون در زمان ۰ و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از ته ظرف برداشته و با ۵ml محلول ۰/۱درصد سدیم دودسیل سولفات مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در ۵۰۰nm با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه (A_0) و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون (A_{10}) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از معادلات زیر به‌کار گرفته شد:

(۱)

$$EAI\ (m^2/g) = (۲\times ۲/۳۰۳\times A_0)/ ۰/۲۵\times \text{وزن پروتئین(گرم)}$$

$$ESI\ (\%) = (A_0 - A_{10}/A_0) \times ۱۰۰ \qquad (۲)$$

ویژگی‌های کف‌کنندگی: ظرفیت و پایداری کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (۱۸) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. حجم ۱۵ml محلول ۰/۵درصد نمونه با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ N ، pHآن به ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ تنظیم و هموژنیزاسیون در سرعت ۱۶۰۰۰rpm برای ۲ دقیقه با هدف ورود هوا به درون محلول در دمای محیط انجام گرفت. نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج ۲۵ml منتقل و حجم کل پس از ۱ دقیقه خوانده شد. ظرفیت کف کنندگی (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه شد:

(۳)

$$FC\ (\%) = (A/B) \times ۱۰۰$$

در اینجا، Aحجم کف پس از زدن (ml) و Bحجم اولیه محلول قبل از زدن (ml) می‌باشد.

نمونه‌های زده شده در دمای ۲۵ °C برای ۱۰ دقیقه نگهداری، سپس حجم کف خوانده شد. پایداری کف (FS) با معادله زیر محاسبه گردید:

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

(۴)

$$FS\ (\%) = (A\ /B) \times ۱۰۰$$

در اینجا، A حجم کف پس از نگهداری (ml) و B حجم اولیه محلول قبل از زدن (ml) می‌باشد.

ویژگی‌های ضداکسایشی

مهار رادیکال آزادDPPH: درصد مهار رادیکال آزاد DPPHبا استفاده از روش Wu و همکاران (۱۹) با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای کینوآ هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰mg/ml) حل شدند. سپس، ۱/۵ml از هر نمونه با ۱/۵ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

(۵)

$$I\ (\%) = [\ \frac{Ablank-Asample}{Ablank}] \times 100$$

در اینجا A_{blank} جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPH مخلوط شد)، A_{sample} جذب نمونه می‌باشند.

مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$: فعالیت مهار رادیکال ABTS پودرهای کینوآ هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط You و همکاران (۲۰) با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال $ABTS^+$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷mM و ۲/۴۵mM پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۶-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام گرفت. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با استفاده از PBS (۰/۲M, pH 7.4) تا جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴nm رقیق شد. سپس ۴۰µl از هر نمونه (با غلظت ۱۰mg /mL) به ۴ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس و به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳۴nm اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با واکنش ۴۰µl ترولوکس (۱۰۰۰ µM، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۱۰۰، ۵۰) با ۴ml محلول رقیق شده $ABTS^+$ تهیه شد. درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ نمونه‌ها بر اساس معادله زیر محاسبه گردید. همچنین، فعالیت مهار رادیکال $ABTS^+$ بر اساس منحنی استاندارد ترولوکس به شکل ظرفیت ضداکسایشی معادل ترولوکس (TEAC, mM) بیان گردید.

(۶)

$$AA\ (\%) = [\ \frac{Ablank-Asample}{Ablank}] \times 100$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کینوآ هیدرولیز شده) هستند.

قدرت احیاءکنندگی: برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰mg/ml) با ۰/۵ml بافرفسفات ۰/۲M (pH6.6) و ۰/۵mlپتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد وزنی - حجمی مخلوط - شد. مخلوط در دمای ۵۰°C برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ml محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ml سوپرناتانت با ۱ml آب مقطر و ۰/۲ml فریک کلراید ۰/۱ درصد وزنی – حجمی مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰nm پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (۲۱).

مهار رادیکال هیدروکسیل: فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از اکسیداسیون ۲-داکسی ریبوز بر طبق روش Kim و Minamikawa (۲۲) و با اندکی اصلاحات تعیین شد. برای این آزمون، ۰/۲ml از مخلوط ۱۰mM ($FeSO_4$-EDTA)، ۰/۵ml (۱۰mM) آلفاداکسی ریبوز، ۰/۲ml نمونه هیدرولیز شده، ۰/۹ml سدیم فسفات بافر ۰/۲M (pH 7.4) و ۰/۲ml پراکسید هیدروژن (۱۰mM) با هم مخلوط - شدند. مخلوط در ۳۷ °C برای ۱ ساعت انکوبه شد. سپس، ۱ml تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲/۸ درصد و ۱ml تیوباربیتوریک اسید ۱ درصد برای توقف واکنش به مخلوط افزوده شد. مخلوط برای ۱۵ دقیقه در حمام آب جوش قرار، در یخ سرد شده، سپس جذب آن در ۵۳۲nm با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه شاهد استفاده گردید. نتایج به شکل درصد مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از معادله زیر اندازه‌گیری شد:

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

(۷)

$$\text{بازدارندگی}\% = (1- A_s/A_b) \times ۱۰۰$$

در اینجا، A_b جذب شاهد و A_s جذب نمونه است.

شلاته‌کنندگی یون آهن: فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر طبق روش Jamdar و همکاران (۱۷) اندازه‌گیری شد. ابتدا ۱ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰mg/ml) با ۰/۰۵ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ml محلول فروزین[1] (۵mM) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲nm خوانده شد. آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

(۸)

$$\text{شلاته‌کنندگی یون آهن}(\%) = [(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times ۱۰۰$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کینوآ هیدرولیز شده) هستند.

شلاته کنندگی یون مس: فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش Kong و Xiong (۲۳) اندازه‌گیری شد. در ابتدا، ۱ml محلول ۰/۲mM سولفات مس با ۱ml کینوآ هیدرولیز شده در فالکون ۱۵ml مخلوط و برای۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ۱ml محلول تری کلرواستیک اسید ۱۱/۳ درصد افزوده و نمونه‌ها در ۲۵۰۰rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن، ۲ml از سوپرناتانت به ۱ml محلول ۱۰٪ پیریدین و ۲۰µl پیروکاتکول ویولت افزوده و مخلوط ورتکس و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در ۶۳۲ nm خوانده و فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس با استفاده از معادله زیر تعیین گردید:

(۹)

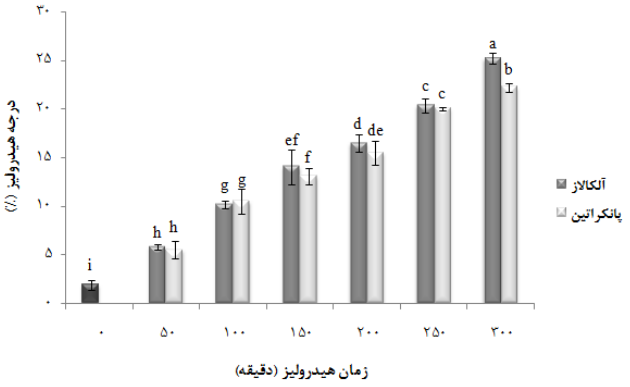
$$\text{شلاته‌کنندگی یون مس}(\%) = [۱ - (A_{sample} / A_{blank})] \times ۱۰۰$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کینوآ هیدرولیز شده) هستند.

تجزیه و تحلیل آماری: در پژوهش حاضر، اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز کینوآ (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ دقیقه) با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین (نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۵ درصد وزنی-وزنی) بر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت ضداکسایشی کینوآ هیدرولیز شده با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفت تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند.کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در ($p<۰/۰۵$) انجام گردید.

• یافته‌ها

درجه هیدرولیز: شکل ۱، اثر زمان فرآیند هیدرولیز با هر یک از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین را بر درجه هیدرولیز پروتئین کینوآ نشان می‌دهد. نتایج حاکی از افزایش پیوسته درجه هیدرولیز در طول زمان فرآیند بود. بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین کینوآ (۲۵/۲۳ درصد) در این مطالعه مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و در زمان ۳۰۰ دقیقه به‌دست آمد. اگرچه در سایر بازه‌های زمانی، تفاوتی بین مقدار این شاخص در نمونه‌های هیدرولیزشده با آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

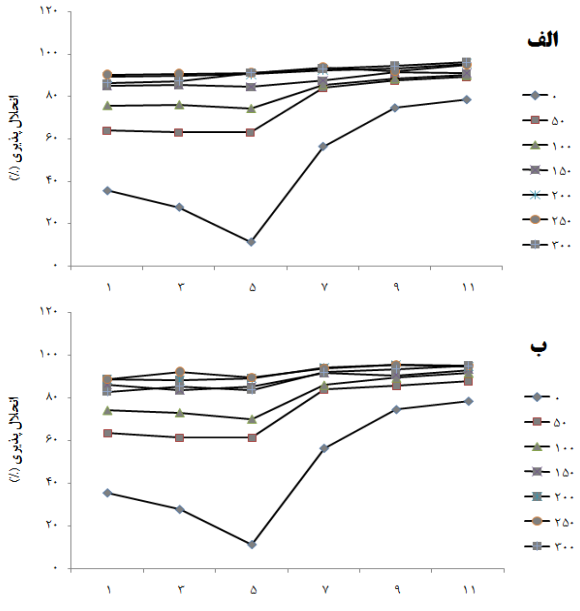


شکل ۱. اثر زمان هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین بر درجه هیدرولیز پروتئین کینوآ

انحلال‌پذیری: در این آزمون، انحلال‌پذیری کینوآ و هیدرولیز شده‌های کینوآ تحت تأثیر pH های مختلف بررسی گردید. نتایج حاکی از افت شدید حلالیت پروتئین کینوآ در pH اسیدی به‌ویژه نزدیک به نقطه ایزوالکتریک (۵-۴) بود (شکل ۲، الف و ب). اما هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوآ با آلکالاز و پانکراتین به مقدار قابل توجهی موجب بهبود حلالیت به‌ویژه در این pH شد. همچنین با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی، حلالیت پروتئین و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی افزایش یافت. تفاوتی بین میزان انحلال پذیری در نمونه های هیدرولیز شده با آلکلاز و پانکراتین مشاهده نشد ($P<۰/۰۵$).

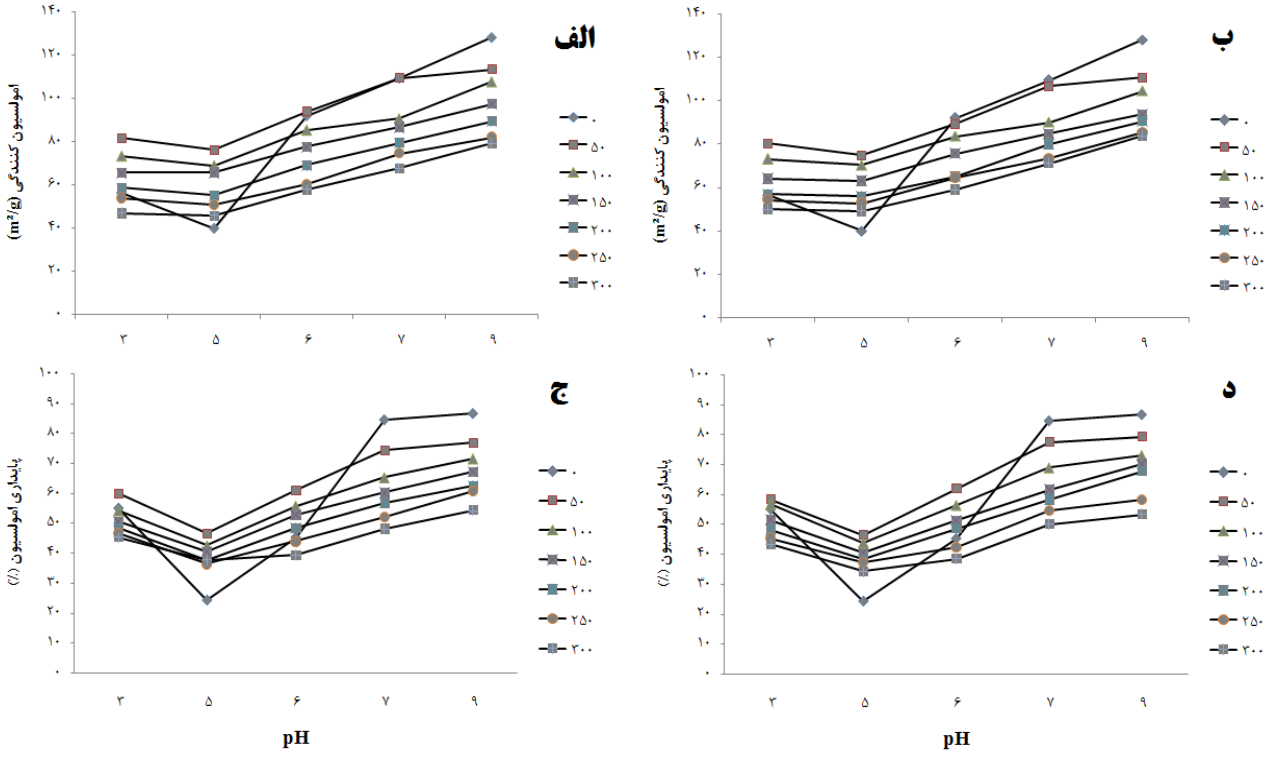
[1] 3-(2-pyridyl)-5,6-Diphenyl-1,2,4-triazine-4′,4″-disulphonic acid

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]



شکل ۲. اثر هیدرولیز آنزیمی با، الف) آلکالاز و ب) پانکراتین بر حلالیت پروتئین کینوآ در pHهای مختلف

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: در این مطالعه، امولسیون-کنندگی و پایداری امولسیون در پروتئین دانه کینوآ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این ارزیابی نیز حاکی از اثر pH و در نتیجه حلالیت پروتئین‌ها بر مقدار امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون‌های تولید شده بودند. بدین شکل که امولسیون‌کنندگی پروتئین کینوآ در pH اسیدی و نزدیک به نقطه ایزوالکتریک در کم‌ترین مقدار خود بود (شکل ۳، الف و ب). اما تنها ۵۰ دقیقه هیدرولیز پروتئین با هر یک از آنزیم-های آلکالاز و پانکراتین به مقدار مشخصی موجب بهبود این شاخص گردید. اگرچه تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین نمونه‌های هیدرولیزشده با آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد. همچنین در pH های بالاتر از ۶ نیز مقدار این شاخص‌های افزایش یافت. از طرف دیگر، پایداری امولسیون‌های تولید شده نیز تحت تأثیر pH و زمان هیدرولیز آنزیمی قرار گرفت (شکل ۳، ج و د). هیدرولیز جزئی در زمان ۵۰ دقیقه بهترین پایداری امولسیون را نشان داد. اما درجات بالاتر هیدرولیز و شکست بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، قابلیت تشکیل فیلم در اطراف قطرات امولسیون را کاهش داد و پایداری امولسیون‌ها را نیز تحت تأثیر قرار داد.



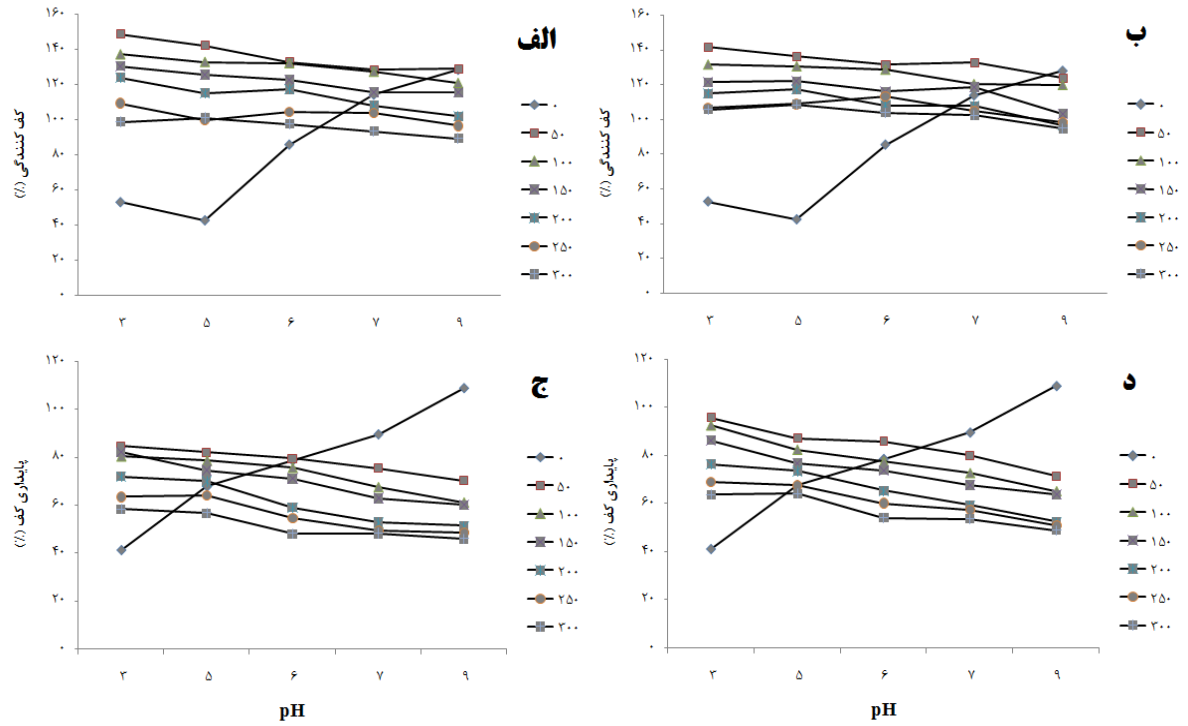
شکل ۳. اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی با الف و ج) آلکالاز، ب و د) پانکراتین بر فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین کینوآ

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

ویژگی‌های کف‌کنندگی: در این مطالعه، اثر نوع آنزیم، زمان هیدرولیز و pH های مختلف بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولید شده در پروتئین کینوآ و هیدرولیزشده‌های آن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴، الف-د). نتایج نشان‌دهنده کم‌ترین مقدار کف‌کنندگی در پروتئین هیدرولیزنشده کینوآ و در pH اسیدی بود. اما فرآیند هیدرولیز آنزیمی به‌مدت ۵۰ دقیقه موجب تولید هیدرولیزشده‌هایی با بالاترین ظرفیت کف‌کنندگی شد. همچنین، هیدرولیزشده‌های حاصل از فعالیت آلکالاز و پانکراتین از روند مشابهی تحت تأثیر زمان و شرایط pH برخوردار بودند. مشابه نتایج حاصل از امولسیون-کنندگی، نمونه‌های هیدرولیزشده در زمان‌های بالاتر، پایداری کف کم‌تری از خود نشان دادند.

مهار رادیکال آزادDPPH: اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین در زمان‌های مختلف بر فعالیت مهار رادیکال DPPH در پروتئین کینوآ بررسی شد (شکل ۵، الف). به‌طورکلی، ۵۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی (صرف‌نظر از نوع آنزیم) موجب افزایش مهار این رادیکال از حدود ۱۶درصد به بیش از ۳۰درصد شد. همچنین، مهار رادیکال DPPH پس از هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به‌مدت ۳۰۰ دقیقه، به‌ترتیب افزایش و کاهش یافت. در بین نمونه‌های هیدرولیزشده نیز، پروتئین هیدرولیزشده با آلکالاز پس از ۳۰۰ دقیقه، بالاترین درصد مهار رادیکال DPPH (۵۶ درصد) را نشان داد ($p<0/05$).

مهار رادیکال آزادABTS: یکی دیگر از شاخص‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، مهار رادیکال کاتیونی ABTS و ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال آزاد معادل ترولوکس است. نتایج حاصل از این تحقیق حاکی از اثر قابل توجه فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر مقدار این شاخص در پروتئین کینوآ بود (شکل ۵، ب). بدین شکل که فعالیت مهار رادیکال ABTS در پروتئین کینوآ از حدود ۳۰ درصد در نمونه هیدرولیزشده به حداکثر ۶۵ و ۶۸ درصد ، به‌ترتیب پس از ۲۵۰ و ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین رسید. همچنین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نیز در بالاترین مقدار به ۱/۸ mM و ۱/۸۲ mMمعادل ترولوکس در شرایط فوق، رسید. این یافته‌ها حاکی از اثر متفاوت هر یک از آنزیم-های آلکالاز و پانکراتین در تولید پپتیدهایی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت است.



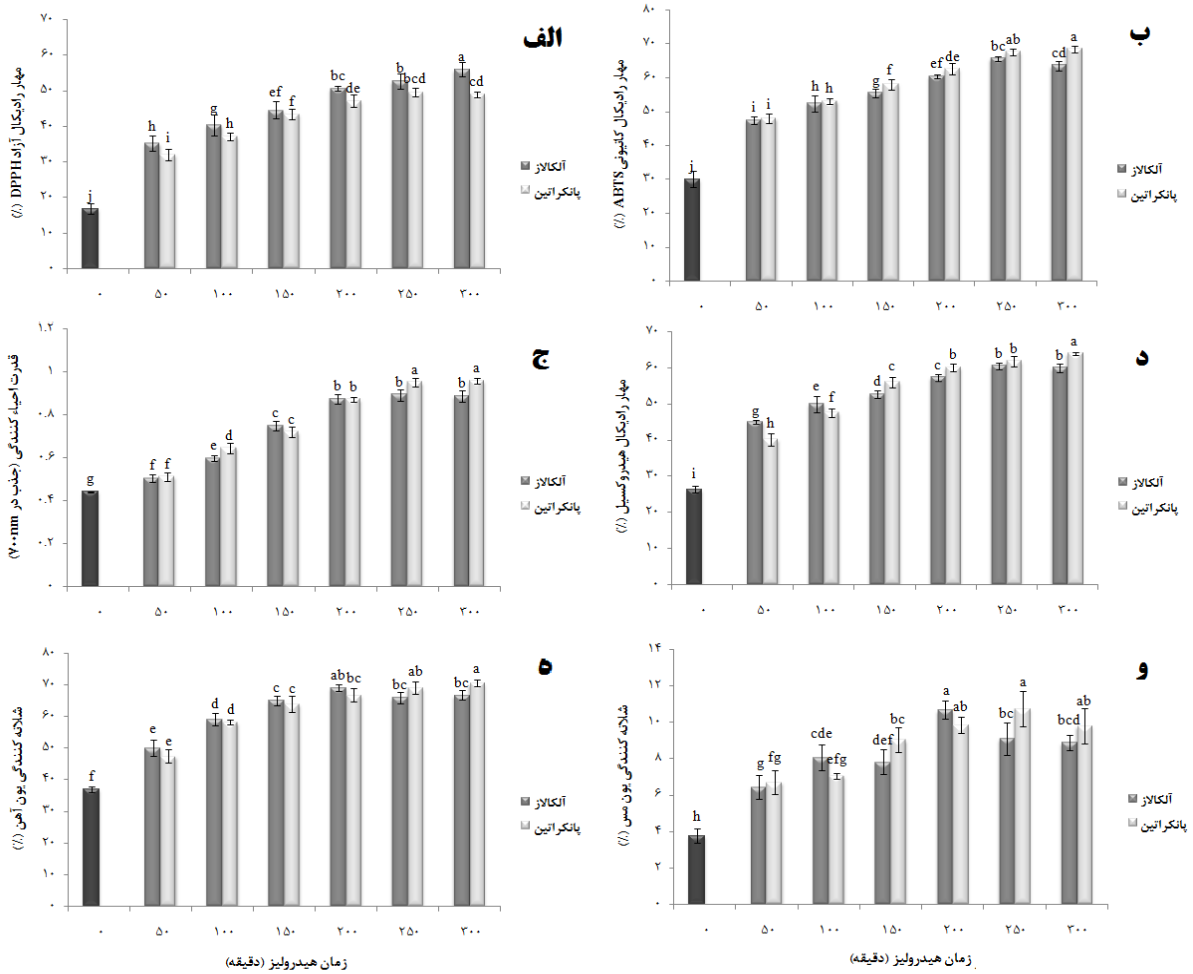
شکل ۴. اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی با الف و ج) آلکالاز، ب و د) پانکراتین بر فعالیت کف‌کنندگی و پایداری کف پروتئین کینوآ

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

قدرت احیاءکنندگی: توانایی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی کینوآ در احیاء کمپلکس فری‌سیانید به شکل فروس، یکی دیگر از شاخص‌های مورد مطالعه در این تحقیق بود. نتایج حاصل از این آزمون نیز نشان‌دهنده اثر افزایش زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی کینوآ به‌ترتیب پس از ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین بود (شکل ۵، ج). اما زمان بیشتر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و درجات بالاتر هیدرولیز، اثری بر مقدار این شاخص و قدرت احیاءکنندگی نمونه‌ها نشان نداد.

مهار رادیکال هیدروکسیل: اثر زمان و نوع آنزیم بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین کینوآ بررسی گردید. نتایج حاکی از افزایش بیش از دو برابر مقدار این شاخص در پروتئین اولیه پس از هیدرولیز آنزیمی بود (شکل ۵، د). به‌طورمثال، تنها ۵۰ دقیقه هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین موجب افزایش مهار رادیکال هیدروکسیل از حدود ۲۶ درصد به‌ترتیب به حدود ۴۴ و ۴۰ درصد شد ($p<0/05$). در بین نمونه‌های مختلف نیز، بالاترین درصد مهار رادیکال هیدروکسیل مربوط به نمونه هیدرولیزشده با پانکراتین پس از ۳۰۰ دقیقه (حدود ۶۴ درصد) بود. تفاوت در کارایی و عملکرد دو آنزیم در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از دلایل این نتایج می‌باشند.

شلاته‌کنندگی یون آهن: فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در پروتئین کینوآ و هیدرولیزشده‌های آهن بین ۳۶/۹۱-۷۰/۶۳ درصد متغیر بود. نتایج حاکی از اثر قابل ملاحظه فرآیند هیدرولیز آنزیمی در بهبود قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین کینوآ بود (شکل ۵، ه). در نمونه‌های هیدرولیزشده با آلکالاز و پانکراتین، مقدار این شاخص به‌ترتیب پس از ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه هیدرولیز به حداکثر مقدار خود رسید. اما افزایش زمان هیدرولیز تأثیری بر قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن در کینوآهای هیدرولیز شده نشان نداد.



شکل ۵. اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوآ با آلکالاز و پانکراتین در زمان‌های مختلف بر الف) مهار رادیکال آزاد DPPH، ب) مهار رادیکال آزاد ABTS ، ج) قدرت احیاءکنندگی ، د) مهار رادیکال هیدروکسیل، ه) شلاته‌کنندگی یون آهن ، و) شکلاته‌کنندگی یون مس

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

شلاته‌کنندگی یون مس: فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس در پروتئین کینوآ و هیدرولیزشده‌های آن نیز به‌عنوان یک عامل تشدید کننده اکسیداسیون ارزیابی شد. مقدار این شاخص از حدود ۳ درصد در پروتئین اولیه به بیش از ۶ درصد پس از ۵۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی افزایش یافت (شکل ۵، و). فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس تحت تأثیر زمان فرآیند هیدرولیز قرار گرفت. بدین شکل که با افزایش زمان تا ۲۰۰ دقیقه، مقدار این شاخص به بالاترین حد خود رسید. اما افزایش زمان و درجه هیدرولیز اثری بر شلاته‌کنندگی یون مس نداشتند. همچنین بین نمونه‌های هیدرولیزشده با آلکالاز و پانکراتین نیز تفاوت قابل ملاحظه‌ای مشاهده نشد.

• بحث

درجه هیدرولیز: نتایج این تحقیق نشان‌دهنده این نکته است که کارایی هیدرولیز آنزیمی بسته به شرایط فرآیند، نوع آنزیم و زمان هیدرولیز متفاوت است. به‌طور مثال، افزایش زمان فرآیند موجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد (۲۰). در تحقیقی، You و همکاران (۲۴) اثر زمان فرآیند هیدرولیز با آنزیم‌های پاپائین و پرتامکس را بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان (Loach) بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که با افزایش زمان فرآیند از ۲ به ۴ و سپس ۶ ساعت، درجه هیدرولیز نمونه‌ها به‌ترتیب از ۱۸ درصد به ۲۳ و ۲۸ درصد افزایش یافت. در پژوهش دیگری نیز، پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیان با پاپائین به‌مدت ۲ ساعت تحت تیمار پپسین و سپس ۲ ساعت تحت اثر پانکراتین قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که ۲ ساعت هیدرولیز با پپسین اثر کمی بر درجه هیدرولیز گذاشت و مقدار این شاخص تنها ۱ درصد افزایش یافت در حالی‌که ۲ ساعت هیدرولیز با پانکراتین، درجه هیدرولیز نمونه‌ها را از ۳۸ درصد به ۴۷ درصد افزایش داد. آن‌ها علت تفاوت عملکرد دو آنزیم را در قابلیت پانکراتین در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد بیان کردند.

انحلال‌پذیری: نتایج این تحقیق بیان‌کننده اثر زمان فرآیند هیدرولیز و درجه هیدرولیز بر حلالیت پروتئین‌های کینوآ بودند. با افزایش درجه هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی پپتیدها،حساسیت به pH کم و حلالیت در محدوده وسیعی از pH حفظ می‌شود. اگر چه در PH قلیایی تأثیر زمان هیدرولیز بر حلالیت تفاوت معناداری نشان نمی دهد.

افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pH های مختلف را می‌توان به تأثیر مثبت هیدرولیز آنزیمی کنترل شده بر کاهش وزن مولکولی و افزایش گروه‌های باردار نسبت داد. همچنین، هیدرولیز آنزیمی موجب شکسته شدن توده‌های نامحلول و رهایش بیشتر اسیدهای آمینه آب‌دوست از ساختار درونی پروتئین‌های می‌شود (۲۵).

در تحقیق مشابهی، Aluko و Monu (۱۴) اثر زمان و درجه هیدرولیز را بر حلالیت کنسانتره پروتئین دانه کینوآ بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که بیشترین حلالیت در درجه هیدرولیز ۴۸ درصد بدست آمد. اما اولترافیلتراسیون تأثیری بر مقدار این شاخص نداشت. مشابه یافته‌های این تحقیق، حلالیت پروتئین‌های بادام زمینی پس از هیدرولیز آنزیمی به بیش از ۸۰ درصد افزایش یافت. همچنین، حساسیت این شاخص به شرایط اسیدی و به‌ویژه محدوده نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها کاهش یافت (۱۷).

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: نتایج حاصل از این تحقیق موید آنست ارتباط بین ظرفیت امولسیون کنندگی با حلالیت پروتئین در شرایط مختلف pH است. به طوری که، کاهش شدید حلالیت و رسوب پروتئین‌ها در pH اسیدی و نزدیک به نقطه ایزوالکتریک، موجب از دست رفتن ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی می‌شود. هیدرولیز آنزیمی با بهبود حلالیت و همچنین در دسترس قرار گرفتن بخش هیدروفوب پروتئین سبب بهبود ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری آن می شود.

یافته‌ها حاکی از عدم قابلیت استفاده از پروتئین کینوآ هیدرولیز نشده با هدف غنی‌سازی و امولسیون‌کنندگی در محصولات مختلف غذایی و در pH اسیدی است. Elsohaimy و همکاران (۲۰۱۵) گزارش نمودند که ایزوله پروتئین کینوآ از قابلیت امولسیون کنندگی پایین برخودار است (۲۶).

به‌عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیند هیدرولیز، امولسیون-کنندگی پروتئین‌ها تحت تأثیر درجه هیدرولیز قرار گرفت. به-طور مثال، هیدرولیز جزئی ایزوله پروتئین سویا موجب بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی شد. اما با ادامه زمان و افزایش درجه هیدرولیز، از مقدار این شاخص کاسته شد (۱۵). علت این یافته را می‌توان به عدم قابلیت پپتیدهای با وزن مولکولی پائین به تشکیل فیلم پایدار و کارآمد در اطراف قطرات روغن نسبت داد (۱۴). همچنین، به‌علت اینکه پپتیدهای با وزن مولکولی بسیار پایین از ویژگی دوگانه‌دوستی مناسب برای پایدارسازی و تشکیل امولسیون برخوردار نیستند، از این رو به سطح قطرات روغن مهاجرت نکرده و در فاز آبی تجمع می-کنند (۱۷).

ویژگی‌های کف کنندگی: کف مخلوط کلوئیدی با فاز پیوسته مایع و فاز پراکنده گاز است و از نظر ترمودینامیکی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

ناپایدار می باشد. Jayasena و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف وابسته به PH می‌باشد و PH قلیایی هر دو اینها را برای پروتئین بهبود می بخشد (۲۷). Mahajan و Dua (۲۰۰۳) بهبود کف کنندگی پروتئین در PH قلیایی را به دلیل افزایش بارالکتریکی و انعطاف پذیری مولکول نسبت دادند (۲۸). تحقیقات مختلفی، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و زمان هیدرولیز بر ظرفیت و پایداری کف-کنندگی هیدرولیزشده‌های پروتئینی را بررسی کرده‌اند. عواملی مانند حلالیت پروتئین‌ها در شرایط مختلف pH، درجه هیدرولیز، نوع پپتیدهای حاصل، قابلیت تشکیل فیلم، از موارد مؤثر بر این شاخص‌ها هستند (۱۵). بدین شکل که اثر افزایش درجه هیدرولیز تحت تأثیر زمان فرآیند و نوع آنزیم بر کاهش طول زنجیره پپتیدها و عملکرد آن‌ها در ایجاد و پایدارسازی کف مؤثر است. نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌های Jamdar و همکاران (۱۷) است که اثر pHهای مختلف بر ظرفیت کف-کنندگی و پایداری کف پروتئین بادام زمینی هیدرولیز شده در درجات مختلف را بررسی کردند. هیدرولیز آنزیمی با کاهش وزن مولکولی و افزایش انعطاف‌پذیری پپتیدها، موجب تسهیل تشکیل غشای بین سطحی و تولید کف می‌شود (۱۴). اگرچه پپتیدهای کوچک حاصل از درجه هیدرولیز بالا قابلیت بالایی در حفظ هوای زیادی در محلول و ظرفیت کف‌کنندگی بالایی هستند، اما این پپتیدها قدرت کافی برای پایدار نمودن کف-های تولید شده را ندارند.

شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال آزاد DPPH: عوامل مختلفی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مؤثر هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به زمان فرآیند، درجه هیدرولیز و عملکرد هر آنزیم بر تولید پپتیدهای فعال و رهایش اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدان لیپوفیل اشاره کرد. در مورد اثر زمان فرآیند و در نتیجه درجه هیدرولیز، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌گردد (۱۷). از طرف دیگر، نتایج حاصل از این تحقیق نیز حاکی از عملکرد مؤثرتر آلکالاز در تولید هیدرولیزشده‌های با قابلیت بالاتر مهار رادیکال DPPH بود. بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات انجام گرفته در خصوص ویژگی‌ها و عملکرد این آنزیم، از آنجائی‌که واکنش پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب تولید شده تحت تأثیر فعالیت آلکالاز با رادیکال لیپوفیل DPPH با سرعت بیشتری انجام می‌پذیرد، لذا این ترکیبات از قابلیت بالاتری در مهار این رادیکال در مقایسه با انواع هیدروفیل (که به مقدار بیشتری در اثر فعالیت پانکراتین رهایش می‌یابند) برخوردارند (۲۰). علت این فعالیت را می-توان به افزایش گروه‌های با زنجیره‌های جانبی حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب نسبت داد که موجب سهولت دسترسی بیشتر این پپتیدها برای واکنش با رادیکال‌های آزاد DPPH می‌شوند (۲۶). مشابه نتایج حاصل از این تحقیق، با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ درصد به ۲۳ درصد، مهار رادیکال آزاد DPPH از ۸۳/۵ درصد به ۹۵/۵ درصدافزایش یافت. اما با افزایش درجه هیدرولیز به بیش از ۲۳ درصد، از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته شد (۲۴).

مهار رادیکال آزاد ABTS: ارزیابی مهار رادیکال محلول در آب ABTS یکی دیگر از شاخص‌های تعیین قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر این شاخص است. همان‌گونه که در بحث مربوط به مهار رادیکال DPPH بیان شد، عملکرد هر آنزیم از نظر نوع رهایش اسیدهای آمینه خاص (لیپوفیل یا هیدروفیل) می‌تواند بر مهار رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد. این پپتیدها از طریق اهداء اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد موجب توقف یا کاهش سرعت فرآیند اکسیداسیون می‌شوند. در این رابطه، نمونه‌های هیدرولیزشده با پانکراتین به‌دلیل افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفیل نسبت به آلکالاز، از واکنش‌پذیری با رادیکال محلول در آب ABTS برخوردار بودند (۲۴). همچنین زمان فرآیند نیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش اسیدهای آمینه آزاد بر مقدار این شاخص مؤثر است. در تحقیق مشابهی، اثر هیدرولیز پروتئین استخراج شده از عضله نوعی ماهی با پپسین (تا درجه هیدرولیز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) بر مهار رادیکال آزاد ABTS بررسی شد. در بین نمونه‌های مختلف، هیدرولیزشده‌های با درجه هیدرولیز ۲۰ درصد از بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد ABTS برخوردار بودند. همچنین، هضم ثانویه با پانکراتین نیز موجب بهبود فعالیت هیدرولیزشده‌ها در مهار این رادیکال گردید (۲۷).

قدرت احیاءکنندگی: قدرت احیاءکنندگی یکی دیگر از شاخص‌ها نشان دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان است. این شاخص نیز همانند سایر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر نوع پپتید، درجه هیدرولیز و عملکرد آنزیم‌ها بر رهایش اسیدهای آمینه خاص قرار می‌گیرد. به‌طورمثال، محققین بیان کردند که آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین عموما از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و احیاءکنندگی خوبی برخوردارند (۲۸). در نتیجه رهایش بیشتر این آمینواسیدها در

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

طول زمان فرآیند هیدرولیز، تحت تأثیر عملکرد هر آنزیم بر قدرت احیاءکنندگی محصول نهایی مؤثر است.

باتوجه به این‌که هر آنزیم عملکرد متفاوتی بر رهایش اسیدهای آمینه خاص دارد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌ها نیز تحت تأثیر ترکیب اسیدهای آمینه آزاد شده قرار می‌گیرد. بنابراین فعالیت بالاتر هیدرولیزشده با یک آنزیم در مهار برخی رادیکال‌های آزاد نسبت به هیدرولیزشده-های حاصل از آنزیم‌های دیگر ممکن است در خصوص همه انواع رادیکال‌ها و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی صدق نکند. به-طورمثال، Ambigaipalan و همکاران (۲۹) هیدرولیز پروتئین‌های موجود در آرد هسته خرما را با استفاده از آنزیم-های آلکالاز، فلوورزایم (Flavourzyme) و ترمولیزین (Thermolysin) به‌صورت مجزا یا در ترکیب با هم انجام دادند. در بین تیمارهای مختلف، نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز از کم‌ترین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS برخوردار بودند؛ درحالی‌که بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و مهار رادیکال هیدروکسیل بیشتری داشتند.

مهار رادیکال هیدروکسیل: کارایی پروتئین‌ها در مهار رادیکال هیدروکسیل به ترکیب اسیدآمینه‌ای آن‌ها بستگی دارد. لذا، اثر زمان و درجه هیدرولیز و عملکرد آنزیم‌ها در رهایش این پپتیدها و اسیدهای آمینه بر فعالیت هیدرولیزشده‌ها در مهار این نوع رادیکال مؤثرند. به‌طورمثال، فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده سویا به توالی لوسین-لوسین-پرولین-هیستیدین-هیستیدین این پپتیدها وابسته است (۳۰). یا اسیدهای آمینه‌ای مانند تیروزین و سیستئین در پروتئین‌های شیر و آب پنیر قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (۳۱). در زمینه اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و درجه هیدرولیز نتایج مشابهی توسط دیگر پژوهشگران به‌دست آمد. به‌طورمثال، نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های You و همکاران (۲۴) بود که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸درصد به ۲۳ درصد، مهار رادیکال هیدروکسیل از ۴۵/۵ درصد به ۶۵/۱ درصد افزایش یافت، اما افزایش بیشتر درجه هیدرولیز از ۲۳ درصد به ۳۳ درصد موجب کاهش درصد فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل گردید.

شلاته‌کنندگی یون آهن: آهن یکی از یون‌های فلزی است که موجب تخریب مولکول‌های زیستی و ایجاد بیماری‌های مختلف می‌شود. از این رو شلاته‌کردن فلزات انتقالی مانند آهن و مس با استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها یا پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی ضروری است (۱۸). نتایج حاصل از تحقیقات متعددی حاکی از اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی بود. در تحقیقی، هیدرولیز پروتئین‌های موجود در آرد هسته خرما با استفاده از آنزیم‌های مختلف انجام گرفت. همچنین اثر ترکیب آنزیم‌ها بر این شاخص بررسی شد. نتایج نشان دادند که هیدرولیزشده‌های حاصل از فعالیت ترکیبی از آلکالاز، فلوورزایم و ترمولیزین از کم‌ترین قدرت شلاته‌کنندگی (۱۵mMمعادل EDTA بر گرم پروتئین) برخوردار بودند. اما استفاده از آلکالاز، فلوورزایم بالاترین اثر را (۷۲mM معادل EDTA بر گرم پروتئین) در مهار یون آهن داشتند (۲۹). علت کارایی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی در شلاته‌کردن یون آهن را می‌توان به گروه-های کربوکسیلیک و آمینو به‌ترتیب در شاخه‌های اسیدهای آمینه اسیدی و بازی و حذف یون‌های پرواکسیدان فلزی از محیط، نسبت داد (۳۲). در تحقیق دیگری نیز، Lou و همکاران (۳۳) نیز اثر هیدرولیز آنزیمی با ۳ نوع پروتئاز پاپائین، پانکراتین و تریپسین به‌مدت ۱۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کازئینات سدیم را بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های هیدرولیز شده با افزایش زمان و درجه هیدرولیز کاهش یافت. آن‌ها علت این یافته را کاهش طول زنجیره پپتید بیان کردند.

شلاته‌کنندگی یون مس: نتایج حاصل از این تحقیقات مختلفی حاکی از اثر نوع آنزیم، درجه هیدرولیز و نوع ترکیب ماده اولیه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده نهایی است. همچنین، پژوهشگران بیان کردند که عمدتا مکانیسم اثر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی در شلاته‌کنندگی یون مس را می‌توان به افزایش گروه‌های آزاد کربوکسیل، آمینواسیدهای مؤثر مانند هیستیدین با دارا بودن حلقه ایمیدازول و واکنش‌های یونی نسبت داد (۳۴). در تحقیق دیگری، اثر چند نوع پروتئاز (فلورزایم، تریپسین، نوتراز، پاپائین و آلکالاز) بر شلاته‌کنندگی یون مس در هیدرولیزشده-های حاصل از پروتئین دانه کاملیا الیفیرا (*Camellia oleifera*) بررسی شد. نتایج حاکی از اثر هیدرولیز آنزیمی بر بهبود شلاته‌کنندگی یون مس بود. همچنین در بین آنزیم‌های مورد استفاده، هیدرولیزشده‌های حاصل از فعالیت آلکالاز از بهترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بالاترین درجه هیدرولیز برخوردار بودند در حالی‌که هیدرولیزشده‌های حاصل از عمل فلورزایم، شلاته‌کنندگی یون مس بالاتری نشان دادند (۳۵).

نتیجه گیری کلی

هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوآ با آلکالاز و پانکراتین به مقدار قابل توجهی موجب بهبود حلالیت پروتئین کینوا شد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

امولسیون‌کنندگی پروتئین کینوآ در pH اسیدی و نزدیک به نقطه ایزوالکتریک در کم‌ترین مقدار خود بود اما تنها ۵۰ دقیقه هیدرولیز پروتئین با هر یک از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به مقدار مشخصی موجب بهبود این شاخص گردید. فرآیند هیدرولیز آنزیمی به‌مدت ۵۰ دقیقه موجب تولید هیدرولیزشده‌هایی با بالاترین ظرفیت کف‌کنندگی شد اما نمونه‌های هیدرولیزشده در زمان‌های بالاتر، پایداری کف کم‌تری از خود نشان دادند. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر اثر هیدرولیز آنزیمی بر بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین کینوآ و تولید هیدرولیزشده‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بود. از اینرو با هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کینوا می‌توان به هیدرولیز شده هایی با خواص عملکردی و سلامتی بخش مناسب جهت کاربرد در فرمولاسیون‌های غذایی دست یافت.

• References

1. Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? Cardiovasc Res. 2000;47(3):410–8.
2. Collins AR. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. Eur J Cancer. 2005;41(13):1923–30.
3. Palmieri VO, Grattagliano I, Portincasa P, Palasciano G. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. J Nutr. Oxford University Press; 2006;136(12):3022–6.
4. Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Curr Pharm Des. c1995-; 2003;9(16):1289–96.
5. Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chem. 2008;111(2):370–6.
6. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 2010;31(10):1949–56.
7. Moure A, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Functionality of oilseed protein products: a review. Food Res Int. 2006;39(9):945–63.
8. Rajapakse N, Mendis E, Jung W-K, Je J-Y, Kim S-K. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Res Int. 2005;38(2):175–82.
9. James LEA. Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. Adv Food Nutr Res. 2009;58:1–31.
10. Brinegar C, Goundan S. Isolation and characterization of chenopodin, the 11S seed storage protein of quinoa (Chenopodium quinoa). J Agric Food Chem. 1993;41(2):182–5.
11. Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Uribe E, Puente L, Martínez EA. Nutrition facts and functional potential of quinoa (Chenopodium quinoa willd.), an ancient Andean grain: a review. J Sci Food Agric. 2010;90(15):2541–7.
12. Bhargava A, Shukla S, Ohri D. Chenopodium quinoa—an Indian perspective. Ind Crops Prod. Elsevier; 2006;23(1):73–87.
13. Details S, Date M, Кант И, Williams P, Phillips G, Berg JL, et al. Zeta Potential Report. Measurement [Internet]. 2010;14(2):2–6. Available from: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2621.2002.tb11370.x
14. Aluko RE, Monu E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. J Food Sci. 2003;68(4):1254–8.
15. Chen L, Chen J, Ren J, Zhao M. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. Food Hydrocoll. 2011;25(5):887–97.
16. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976;72(1):248–54.
17. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chem. 2010;121(1):178–84.
18. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. 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. 2007;102(4):1317–27.
19. Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Res Int. 2003;36(9):949–57.
20. You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chem. 2010;120(3):810–6.
21. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food Chem. 2007;105(1):57–64.
22. Kim JW, Minamikawa T. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (Brassica nigra). Biosci Biotechnol Biochem. 1997;61(1):118–23.
23. Kong B, Xiong YL. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. J Agric Food Chem. 2006;54(16):6059–68.
24. You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. Innov food Sci Emerg Technol. 2009;10(2):235–40.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

25. Tsumura K, Saito T, Tsuge K, Ashida H, Kugimiya W, Inouye K. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT-Food Sci Technol. 2005;38(3):255–61.

26. Elsohaimy S.A, Refaay T, Zaytoun M.A.M, physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. Annals of Agr. Sci. 2015;60(2):297-305.

27. Jayasena V, Chih HJ, Nasar-Abbas S.M. Functional properties of sweet lupin protein isolated and tested at various pH levels. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences 2010; 6 (2), 130-137.

28. Mahajan A, Dua S. Salts and pH induced changes in functional properties of Amaranth (Amaranthus tricolor L.) seed meal. Cereal Chemistry, 2002; 79 (6), 834-837.

29. Ambigaipalan P, Al-Khalifa AS, Shahidi F. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. J Funct Foods. 2015;18:1125–37.

30. Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J Agric Food Chem. 1998;46(1):49–53.

31. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. Int Dairy J. 2006;16(11):1306–14.

32. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chem. 2010;118(2):403–10.

33. Luo Y, Pan K, Zhong Q. Physical, chemical and biochemical properties of casein hydrolyzed by three proteases: partial characterizations. Food Chem. 2014;155:146–54.

34. Zhu L, Chen J, Tang X, Xiong YL. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. J Agric Food Chem. 2008;56(8):2714–21.

35. Li X, Deng J, Shen S, Li T, Yuan M, Yang R, et al. Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted Camellia oleifera seed cake. J Food Sci Technol. 2015;52(9):5681–90.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

Processing Time Effects on Functional and Antioxidant Properties of the Quinoa Proteins Hydrolyzed with Alcalase and Pancreatin

Sadeghian Amin S[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Ghorbani M[2], Alami M[2], Joshaghani H[3]*

1-Ph.D. Student, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*2-*Corresponding author: Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: Sadeghiaz@gau.ac.ir*

3- Associate Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4-Associate Professor, School of Paramedicine Golestan University of Medical Science, Gorgan, Iran

Received 6 Dec, 2018 **Accepted 7 Apr, 2019**

Background and Objectives: Antioxidants are used to decrease oxidation of oils and increase shelf life of foods for centuries. Nowadays, researchers investigate for the replacement of synthetic antioxidants with antioxidants from natural sources. The purpose of this study was to investigate effects of quinoa enzyme-hydrolyzed proteins on functional and antioxidant properties of the produced peptides.

Materials & Methods: In this study, proteins of the quinoa seeds were extracted and hydrolyzed with alcalase and pancreatin enzymes. The hydrolyzed proteins were assessed for the degrees of hydrolysis, solubility, emulsifying capacity, foaming capacity and antioxidant properties. Furthermore, DPPH free radical scavenging activity, hydroxyl radical scavenging activity, reducing power, ABTS radical scavenging activity, Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) and iron and copper ion chelating activity were used to assess the antioxidant properties.

Results: Results showed that the enzymatic hydrolysis significantly increased solubility, foaming capacity and emulsifying capacity, especially at isoelectric point and acidic pH. Free radical scavenging of DPPH (from 16.85 to 56.04%), hydroxyl radical scavenging (from 26.31 to 63.91%), reducing power (from 0.44 to 0.95 absorbance at 765 nm), ABTS radical scavenging (from 30.01 to 68.42%), Trolox equivalent antioxidant capacity (from 0.73 to 1.83 mM), iron ion chelating activity (from 36.91 to 70.64%), and copper ion chelating activity (from 3.76 to 10.76%) increased to the highest levels after enzyme hydrolysis.

Conclusion: Results of this study have shown that enzymatic hydrolysis can improve functional properties of the quinoa seed proteins. Antioxidant capacity of the hydrolyzed proteins is significantly higher than non-hydrolyzed proteins. Improvement of the functional properties and antioxidant capacity of the hydrolyzed proteins depend on hydrolysis time and enzyme type.

Keywords: Alcalase, Pancreatin, Quinoa, Functional properties, Enzymatic hydrolysis

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]