

اثر زمان فرآیند بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کینوا با آلکالاز و پانکراتین

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

- ۱- دانشجوی دکتری 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@gu.ac.ir
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۴- دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی گلستان، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۱/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۱۵

چکیده

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

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوا 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 کینوا و تولید هیدرولیز شده‌ها 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، کینوا، ویژگی‌های عملکردی، هیدرولیز آنزیمی

• مقدمه

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

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 شرائین، دیابت، آرتروز

B است (۱۱). مقدار خاکستر کل دانه کینوا بالا می‌باشد و در حدود ۳/۴ درصد است (۱۲). دانه کینوا 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 شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئین کینوا بود.

• مواد و روش‌ها

مواد مورد استفاده: دانه کینوا، آلکالاز، پانکراتین، تری-کلرواستیک اسید TCA (Trichloroacetic acid)، کوماسی بلو (G250)، DPPH (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)، ABTS (3-ethylbenzothiazoline-6-azino-bis diammonium salt)، پتاسیم پرسولفات، ترلوکس، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول و یولت، 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 دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک (مرک، آلمان) نیز در این تحقیق مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج پروتئین: به‌منظور چربی‌زدایی، دانه‌های خشک کینوا پس 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 کیف 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 کینوا به نسبت ۱:۱۰ با محلول M- NaCl ۰/۳۳، pH=۹/۲۵ مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت همزده شد، سپس محلول حاصل در $4500 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در $\text{pH} = 4/5$ (ایزوالکتریک پروتئین) تنظیم شد. سپس در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در $4500 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در $4500 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید و با تنظیم pH=۷/۲ با افزودن سود ۱ M،

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 آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی (BHA، BHT و پروپیل گالات‌ها) استفاده می‌شود، 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 به‌طور کلی 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 تغذیه‌ای و عملکردی (Functional) آن‌ها اشاره کرد (۵). از ویژگی‌های این پپتیدها می‌توان به فعالیت‌های تسکین دهنده (Opiate-like)، قابلیت اتصال به مواد معدنی (Mineral binding)، تعدیل کننده ایمنی (Immunomodulatory)، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد لخته‌شدن خون، کاهش کلسترول خون و ضد فشار 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، کینوا (*Chenopodium quinoa*) است که منبع غنی از ترکیبات مغذی و پروتئین محسوب می‌شود. دانه کینوا دارای ۱۶/۵-۱۲/۹ درصد پروتئین است (۹). پروتئین دانه کینوا عمدتاً شامل گلوبولین و آلبومین و مقدار جزئی پرولامین است (۱۰). دانه کینوا منبع غنی از پیش‌ساز ویتامین A و ویتامین E و ویتامین‌های گروه

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (۱۸) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا ۵ml روغن هسته انگور و ۱۵ml محلول ۱ درصد 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 ۲۰۰۰ rpm برای ۱ دقیقه هموژن گردید. سپس، ۵۰ μl نمونه امولسیون در زمان ۰ و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از ته ظرف برداشته و با ۵ml محلول ۰/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در ۵۰۰ nm 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 امولسیون‌کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از معادلات زیر به کار گرفته شد:

(۱)

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = (\pi \times 2/3 \times A_0) / (0.25 \times \text{وزن پروتئین (گرم)})$$

(۲)

$$\text{ESI (\%)} = (A_0 - A_{10}/A_0) \times 100$$

ویژگی‌های کف‌کنندگی: ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بر طبق روش Klompong و همکاران (۱۸) با اندکی اصلاحات تعیین گردید. حجم ۱۵ml محلول ۰/۵ درصد نمونه با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ N، pH آن به ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ تنظیم و هموژنیزاسیون در سرعت ۱۶۰۰ rpm 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 کف‌کنندگی (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه شد:

(۳)

$$\text{FC (\%)} = (A/B) \times 100$$

در اینجا، A حجم کف پس از زدن (ml) و B حجم 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:

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 pH های به ترتیب ۷/۴ و ۸ در مقدار بهینه فعالیت هر آنزیم ثابت نگه‌داشته شدند. زمان واکنش در شرایط هم‌زدن مداوم با دور ۲۰۰ rpm در مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ دقیقه متغیر در نظر گرفته شد. برای غیرفعال کردن فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب ۹۰ °C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور ۵۰۰ rpm 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 ۱۰ درصد در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴۰ °C انکوبه شد. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ 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 روش Jamdar و همکاران (۱۷) با مقدار جزئی اصلاحات استفاده شد. به این شکل که، برای ارزیابی اثر هر pH بر حلالیت پروتئین‌ها، ۲۰۰ mg پروتئین هیدرولیز شده در ۲۰ ml آب مقطر پراکنده و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ N در مقادیر ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم - شد. محلول در ۱۰۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ 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.

(۴)

$$FS (\%) = (A / B) \times 100$$

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

ویژگی‌های ضد اکسایشی

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

(۵)

$$I (\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

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 کینوا 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 ۷ mM و ۲/۴۵ mM 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 (۰/۲ M, pH 7.4) تا جذب 0.2 ± 0.7 در ۷۳۴ nm رقیق شد. سپس ۴۰ μl از هر نمونه (با غلظت ۱۰ mg / mL) به ۴ ml 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 ۷۳۴ nm اندازه‌گیری شد. منحنی استاندارد با واکنش ۴۰ μl ترولوکس (۱۰۰۰، ۷۵۰، ۵۰۰، ۲۵۰، ۵۰) با ۴ ml 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 ضد اکسایشی معادل ترولوکس (TEAC, mM) بیان گردید.

(۶)

$$AA (\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کینوا هیدرولیز شده) هستند. **قدرت احیاء کنندگی:** برای تعیین قدرت احیاء کنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۵ ml بافر فسفات ۰/۲ M (pH 6.6) و ۰/۵ ml پتاسیم فری سیانید ۱ درصد وزنی - حجمی مخلوط - شد. مخلوط در دمای ۵۰ °C برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ ml محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. در نهایت، ۱ ml سوپرناتانت با ۱ ml آب مقطر و ۰/۲ ml فریک کلراید ۰/۱ درصد وزنی - حجمی مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ nm 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 احیاء کنندگی 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، ۰/۲ ml از مخلوط ۱۰ mM (FeSO₄-EDTA)، ۰/۵ ml (۱۰ mM) آلفاداکسی ریبوز، ۰/۲ ml نمونه هیدرولیز شده، ۰/۹ ml سدیم فسفات بافر ۰/۲ M (pH 7.4) و ۰/۲ ml پراکسید هیدروژن (۱۰ mM) با هم مخلوط - شدند. مخلوط در ۳۷ °C برای ۱ ساعت انکوبه شد. سپس، ۱ ml تری کلرو استیک اسید (TCA) ۲/۸ درصد و ۱ ml 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 ۵۳۲ nm 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:

(۷)

$$= (1 - A_s/A_b) \times 100 \text{ بازدارندگی} \%$$

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

(۸)

$$= [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}})] \times 100 \text{ شلاته‌کنندگی یون آهن} (\%)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و

A_{sample} (جذب نمونه کینوآ هیدرولیز شده) هستند.

شلاته‌کنندگی یون مس: فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش Kong و Xiong (۲۳) اندازه‌گیری شد. در ابتدا، ۱ ml محلول ۰/۲ mM سولفات مس با ۱ ml کینوآ هیدرولیز شده در فالتکون ۱۵ ml مخلوط و برای ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، ۱ ml محلول تری کلرواستیک اسید ۱۱/۳ درصد افزوده و نمونه‌ها در ۲۵۰۰ rpm برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن، ۲ ml از سوپرناتانت به ۱ ml محلول ۱۰٪ پیریدین و ۲۰ μl 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)

$$= [1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{blank}})] \times 100 \text{ شلاته‌کنندگی یون مس} (\%)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و

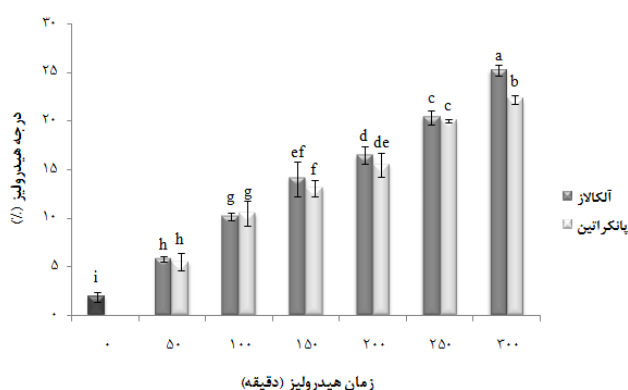
A_{sample} (جذب نمونه کینوآ هیدرولیز شده) هستند.

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 ضد اکسایشی 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 ($p < 0.05$) 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 هیدرولیز شده با آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد ($P < 0.05$).

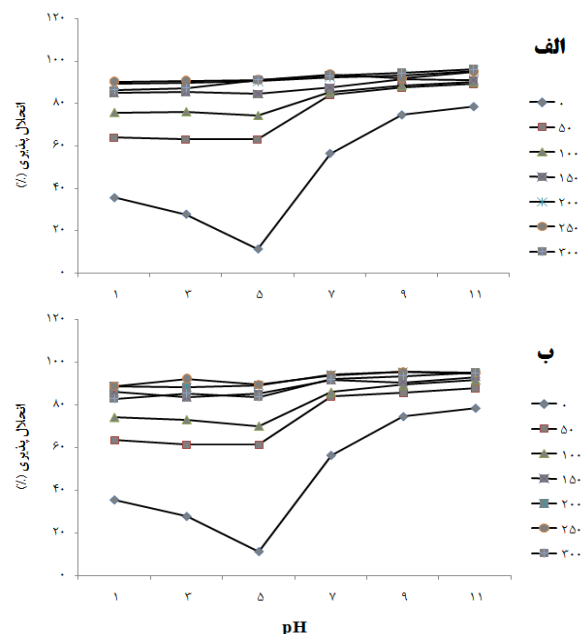


شکل ۱. اثر زمان هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین بر درجه هیدرولیز پروتئین کینوآ

انحلال پذیری: در این آزمون، انحلال پذیری 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 (۴-۵) 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 آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد ($P < 0.05$).

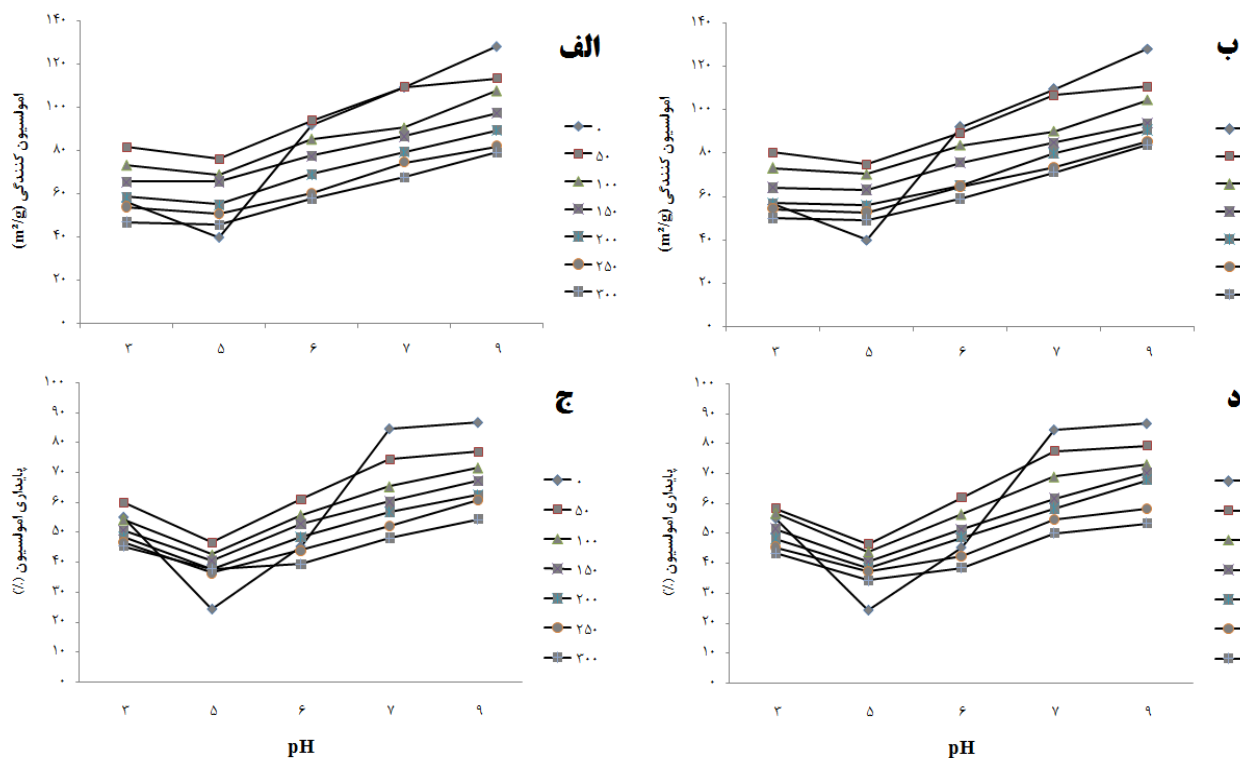
¹3-(2-pyridyl)-5,6-Diphenyl-1,2,4-triazine-4',4''-disulphonic acid

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 آنزیم‌های 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 ۲. اثر هیدرولیز آنزیمی با، الف) آلکالاز و ب) پانکراتین بر حلالیت پروتئین کینوآ در pH های مختلف

ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی: در این مطالعه، امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون در پروتئین دانه کینوآ مورد



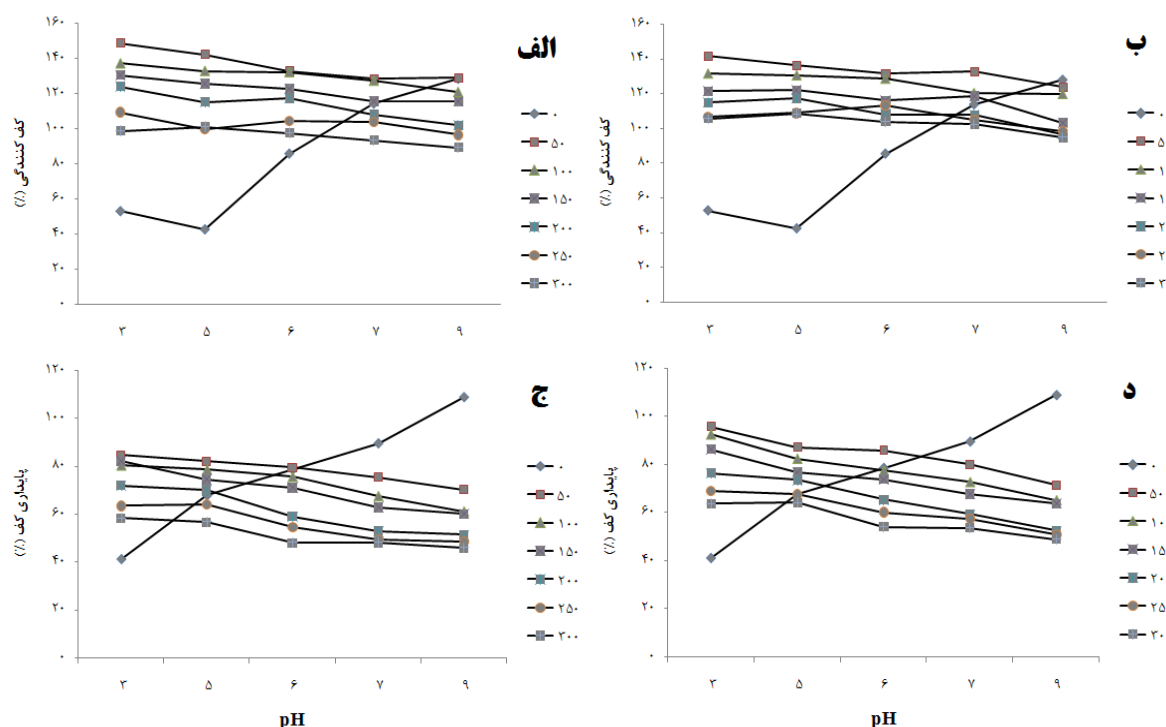
شکل ۳. اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی با الف و ج) آلکالاز، ب و د) پانکراتین بر فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون پروتئین کینوآ

افزایش و کاهش یافت. در بین نمونه‌های هیدرولیز شده نیز، پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز پس از ۳۰۰ دقیقه، بالاترین درصد مهار رادیکال DPPH (۵۶ درصد) را نشان داد ($p < 0.05$).

مهار رادیکال آزاد ABTS: 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 هیدرولیز شده به حداکثر ۶۵ و ۶۸ درصد، به ترتیب 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 mM معادل ترولوکس در شرایط فوق، رسید. این یافته‌ها حاکی از اثر متفاوت هر یک از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در تولید پپتیدهایی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوت است.

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 هیدرولیز شده‌های آن مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۴، الف-د). نتایج نشان‌دهنده کم‌ترین مقدار کف‌کنندگی در پروتئین هیدرولیز نشده کینوآ و در pH اسیدی بود. اما فرآیند هیدرولیز آنزیمی به مدت ۵۰ دقیقه موجب تولید هیدرولیز شده‌هایی با بالاترین ظرفیت کف‌کنندگی شد. همچنین، هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت آلکالاز و پانکراتین از روند مشابهی تحت تأثیر زمان و شرایط pH برخوردار بودند. مشابه نتایج حاصل از امولسیون‌کنندگی، نمونه‌های هیدرولیز شده در زمان‌های بالاتر، پایداری کف کم‌تری از خود نشان دادند.

مهار رادیکال آزاد DPPH: اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین در زمان‌های مختلف بر فعالیت مهار رادیکال DPPH در پروتئین کینوآ بررسی شد (شکل ۵، الف). به‌طور کلی، ۵۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی (صرف‌نظر از نوع آنزیم) موجب افزایش مهار این رادیکال از حدود ۱۶ درصد به بیش از ۳۰ درصد شد. همچنین، مهار رادیکال DPPH پس از هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به مدت ۳۰۰ دقیقه، به ترتیب



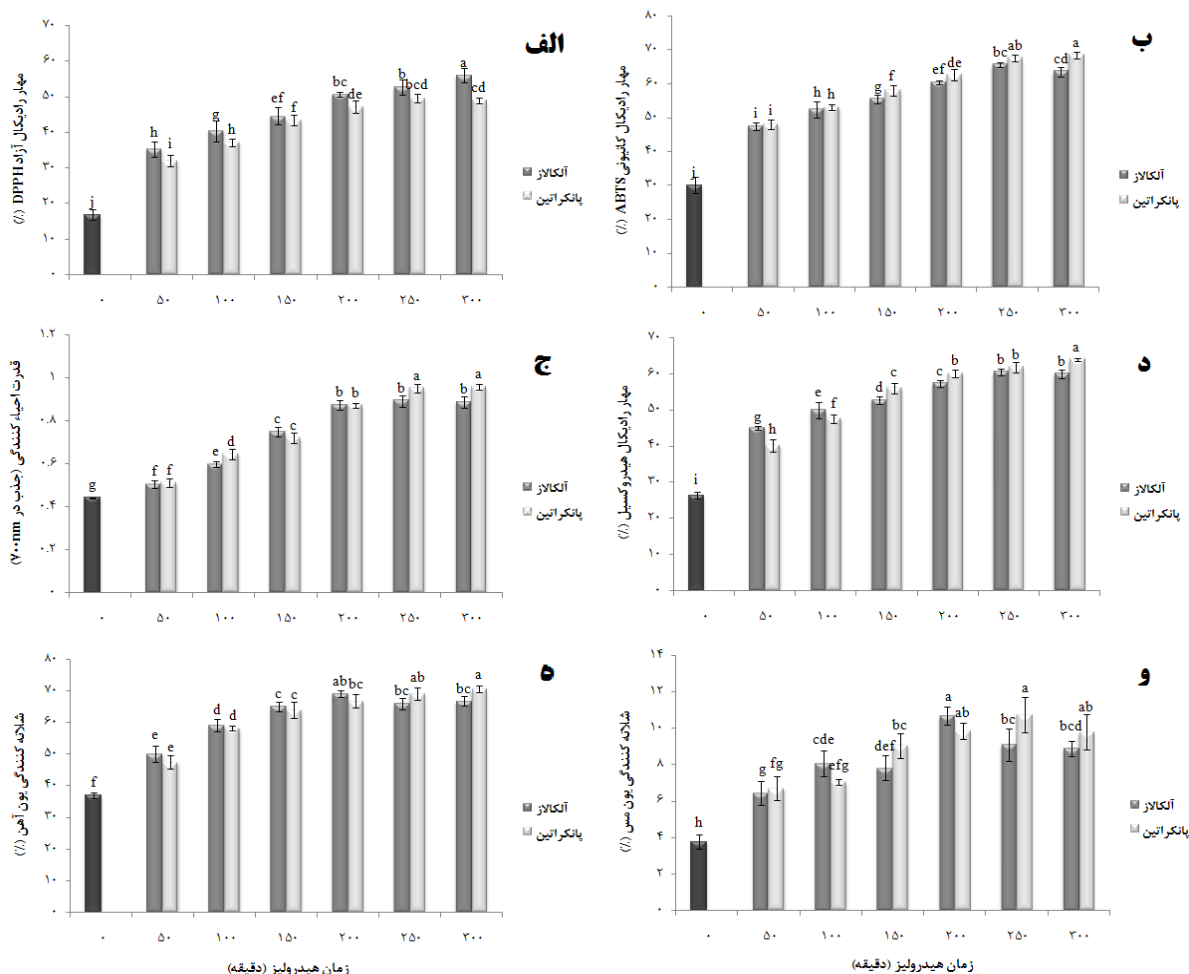
شکل ۴. اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی با الف و ج) آلکالاز، ب و د) پانکراتین بر فعالیت کف‌کنندگی و پایداری کف پروتئین کینوآ

به ترتیب به حدود ۴۴ و ۴۰ درصد شد ($p < 0.05$). در بین نمونه‌های مختلف نیز، بالاترین درصد مهار رادیکال هیدروکسیل مربوط به نمونه هیدرولیز شده 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 هیدرولیز شده‌های 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 هیدرولیز شده با آلکالاز و پانکراتین، مقدار این شاخص به ترتیب 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.

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 به ترتیب 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



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 (و) شلاته‌کنندگی یون مس

مولکولی و افزایش گروه‌های باردار نسبت داد. همچنین، هیدرولیز آنزیمی موجب شکسته شدن توده‌های نامحلول و رهايش 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 کینوا 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 امولسیون‌کنندگی 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 امولسیون‌کنندگی و پایداری آن می‌شود. یافته‌ها حاکی از عدم قابلیت استفاده از پروتئین کینوا 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 کینوا از قابلیت امولسیون‌کنندگی پایین برخوردار است (۲۶).

به‌عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیند هیدرولیز، امولسیون‌کنندگی پروتئین‌ها تحت تأثیر درجه هیدرولیز قرار گرفت. به‌طور 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 می‌کنند (۱۷).

ویژگی‌های کف‌کنندگی: کف مخلوط کلوتیدی با فاز پیوسته مایع و فاز پراکنده گاز است و از نظر ترمودینامیکی

شلاته‌کنندگی یون مس: فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس در پروتئین کینوا 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 پائین 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 به ترتیب از ۱۸ درصد به ۲۳ و ۲۸ درصد افزایش یافت. در پژوهش دیگری نیز، پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیان با پاپائین به مدت 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 حالی که 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 کینوا 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 نمی‌دهد.

افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pH های مختلف را می‌توان به تأثیر مثبت هیدرولیز آنزیمی کنترل شده بر کاهش وزن

انواع هیدروفیل (که به مقدار بیشتری در اثر فعالیت پانکراتین رهایش می‌یابند) برخوردارند (۲۰). علت این فعالیت را می‌توان 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 درصد افزایش 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 هیدرولیز شده با پانکراتین به دلیل 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، هیدرولیز شده‌های با درجه هیدرولیز ۲۰ درصد از بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد ABTS برخوردار بودند. همچنین، هضم ثانویه با پانکراتین نیز موجب بهبود فعالیت هیدرولیز شده‌ها 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 عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و احیاءکنندگی خوبی برخوردارند (۲۸). در نتیجه رهایش بیشتر این آمینواسیدها در

ناپایدار می‌باشد. Jayasena و همکاران (۲۰۱۰) نشان دادند که ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف وابسته به PH می‌باشد و PH قلیایی هر دو اینها را برای پروتئین بهبود می‌بخشد (۲۷). Mahajan و Dua (۲۰۰۳) بهبود کف‌کنندگی پروتئین در PH قلیایی را به دلیل افزایش بارالکتریکی و انعطاف‌پذیری مولکول نسبت دادند (۲۸). تحقیقات مختلفی، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و زمان هیدرولیز بر ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی هیدرولیز شده‌های 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 پایداری سازی کف مؤثر است. نتایج این تحقیق مشابه با یافته‌های Jamdar و همکاران (۱۷) است که اثر pHهای مختلف بر ظرفیت کف‌کنندگی 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 کف‌های 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 هیدرولیز شده‌های 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

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

باتوجه به این که هر آنزیم عملکرد متفاوتی بر رهایش اسیدهای آمینه خاص دارد و فعالیت آنتی اکسیدانی 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 هیدرولیزشده‌های حاصل از آنزیم‌های دیگر ممکن است در خصوص همه انواع رادیکال‌ها و شاخص‌های آنتی اکسیدانی صدق نکند. به-طورمثال، Ambigaipalan و همکاران (۲۹) هیدرولیز پروتئین‌های موجود در آرد هسته خرما را با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلوورزایم (Flavourzyme) و ترمولیزین (Thermolysin) به صورت 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؛ درحالی که بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسن 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 به دست آمد. به‌طورمثال، نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های You و همکاران (۲۴) بود که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ درصد 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 شلاته کردن فلزات انتقالی مانند آهن و مس با استفاده از آنتی اکسیدان‌ها یا پپتیدهای آنتی اکسیدانی 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 (۱۵mM معادل 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 شلاته کردن یون آهن را می‌توان به گروه-های کربوکسیلیک و آمینو به ترتیب 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 به مدت ۱۰ دقیقه تا ۲۴ ساعت بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی هیدرولیزشده نهایی است. همچنین، پژوهشگران بیان کردند که عمدتاً 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، نوترز، پاپائین و آلکالاز) بر شلاته‌کنندگی یون مس در هیدرولیزشده‌های 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 آنتی اکسیدانی و بالاترین درجه هیدرولیز برخوردار بودند در حالی که هیدرولیزشده‌های حاصل از عمل فلورزایم، شلاته‌کنندگی یون مس بالاتری نشان دادند (۳۵).

نتیجه گیری کلی

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

کم‌تری از خود نشان دادند. نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر اثر هیدرولیز آنزیمی بر بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین کینوا و تولید هیدرولیزشده‌ها با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا بود. از اینرو با هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کینوا می‌توان به هیدرولیز شده‌هایی با خواص عملکردی و سلامتی بخش مناسب جهت کاربرد در فرمولاسیون‌های غذایی دست یافت.

امولسیون‌کنندگی پروتئین کینوا 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 به مدت ۵۰ دقیقه موجب تولید هیدرولیزشده‌هایی با بالاترین ظرفیت کف‌کنندگی شد اما نمونه‌های هیدرولیزشده در زمان‌های بالاتر، پایداری کف

• References

- Halliwell B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? *Cardiovasc Res.* 2000;47(3):410–8.
- Collins AR. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *Eur J Cancer.* 2005;41(13):1923–30.
- 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.
- Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des.* c1995-; 2003;9(16):1289–96.
- 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.
- Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides.* 2010;31(10):1949–56.
- Moure A, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Res Int.* 2006;39(9):945–63.
- Rajakpase 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.
- James LEA. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): composition, chemistry, nutritional, and functional properties. *Adv Food Nutr Res.* 2009;58:1–31.
- 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.
- 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.
- Bhargava A, Shukla S, Ohri D. *Chenopodium quinoa*—an Indian perspective. *Ind Crops Prod. Elsevier;* 2006;23(1):73–87.
- Details S, Date M, Капт 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>
- Aluko RE, Monu E. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *J Food Sci.* 2003;68(4):1254–8.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- You L, Zhao M, Regensten 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.
- Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food Chem.* 2007;105(1):57–64.
- 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.
- 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.
- 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.

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.

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

Sadeghian Amin S¹, Sadeghi Mahoonak AR^{2*}, Ghorbani M², Alami M², Joshaghani H³

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