تولید و بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا

مائده اعتمادی[a*]، علیرضا صادقی ماهونک[b]، محمد قربانی[b]، یحیی مقصودلو[b]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[b] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۳/۱/۲۴ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۶/۳

چکیده

مقدمه: امروزه بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر BHA و BHT به‌عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به‌کار برده می‌شوند. اگرچه این آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نظیر اسیدآسکوربیک قدرت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند ولی در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه محققین می‌باشد. پپتیدهای به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌ها از جمله این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده که مورد بحث تحقیقات اخیر قرار گرفته‌اند.

مواد و روش‌ها: درمطالعه حاضر پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا، با به‌کارگیری آنزیم آلکالاز تولید گردید و اثر شرایط مختلف هیدرولیز یعنی متغیرهای دما، زمان و آنزیم بر میزان درجه هیدرولیز در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. سپس، فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو و قدرت احیاکنندگی یون فریک پروتئین هیدرولیز شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: بیشترین میزان درجه هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون /کیلوگرم /سوبسترا) حاصل شد، که این میزان به ۳۰/۴۹ درصد رسید. تحت این شرایط، فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو نیز به حداکثر مقدار خود رسید. در حالی‌که، فعالیت احیاکنندگی یون فرو عدد جذب ۰/۱۵ را نشان داد که در مقایسه با بالاترین قدرت احیاکنندگی به‌دست آمده مقدار کمتری را نشان داد.

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیز شده سویا می‌تواند به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی به‌همراه ارزش تغذیه‌ای بالا و دیگر خواص زیستی، در غلظت‌های مناسب قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باشد.

واژه‌های کلیدی: *ایزوله پروتئین سویا، پروتئین هیدرولیز شده، قدرت احیاءکنندگی، فعالیت شلاته‌کنندگی، هیدرولیز آنزیمی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: maedehetemadi@gmail.com

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها به‌منظور حفظ محصولات‌غذایی یا به تاخیراندازی تغییر رنگ و کاهش کیفیت ناشی از اکسیداسیون به‌کار می‌روند. یک آنتی‌اکسیدان به‌عنوان ماده‌ای که در غلظت‌های اندک نسبت به ماده اکسیدشونده به‌کار رفته و به‌گونه‌ای قابل توجه اکسیداسیون ماده را به تعویق می‌اندازد، تعریف می‌گردد. پپتیدهای متعددی از مواد غذایی پروتئینی به‌دست آمده است که دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوده و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است. این پپتیدها برای اولین بار توسط Marcuse مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Marcuse, 1960). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاوی ۱۶-۵ اسید آمینه هستند (Chen *et al*., 1996)، این پپتیدهای به‌دست آمده از غذاها حاوی ترکیبات سلامتی‌بخش و ایمنی‌بخش با وزن مولکولی پایین، هزینه تولید کم، فعالیت بالا و جذب آسان می‌باشند. این پپتیدها دارای ویژگی‌های طبیعی و عملکردی زیادی در کنار فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود می‌باشند (Xie *et al*., 2008; Hattori *et al*., 1998). مطالعاتی که اثرات سلامتی‌بخش پپتیدهای زیست‌فعال را مورد بررسی قرار می‌دهد آنها را به دو صورت ارزیابی می‌نماید: یا به‌عنوان پروتئین‌های هیدرولیز شده و یا به‌عنوان پپتیدهای زیست‌فعال.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر پپتیدها در مقایسه با آمینواسیدهای آزاد به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی خاص آن‌ها که در نتیجه توالی آمینواسیدی آن‌ها، به‌خصوص پایداری رادیکال‌های پپتیدی حاصل که سبب جلوگیری از واکنش‌های اکسیداتیو بیشتر می‌شود، بستگی دارد (Elias *et al*., 2008). چندین مکانیسم جهت تشخیص ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدها وجود دارد که شامل: خاصیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی، به دام انداختن رادیکال آزاد و ایجاد آلدئید می‌باشد (Zhou & Decker, 1999; Chen *et al*., 1996).

ماده حاصل از هیدرولیز مخلوطی است که اساسا از پپتیدها و اسیدهای آمینه حاصل از هیدرولیز آنزیمی، اسیدی، قلیایی و یا تخمیر به‌دست می‌آید. منابع غذایی پروتئینی مختلف از قبیل ماهی، شیر، تخم مرغ، سویا ، گندم و غیره، جهت تولید اجزاء پروتئینی با خواص آنتی‌اکسیدانی و پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Sakanaka & Tachibana, 2006). هیدرولیز پروتئین‌های غذایی بوسیله افزودن آنزیم‌ها، یک فرایند مهم مورد استفاده برای بهبود یا اصلاح خواص حسی، عملکردی و فیزیکوشیمیایی پروتئین اصلی، بدون کاهش ارزش تغذیه‌ای آن می‌باشد و در اغلب موارد قابلیت جذب پروتئین را بهبود می‌بخشد. این فرایندهای آنزیمی تحت شرایط ملایمی انجام می‌شود و ترکیباتی که از طریق واکنش‌های راسمیزاسیون در هر دو هیدرولیز اسیدی و قلیایی تشکیل می‌شوند ، به‌وجود نمی‌آیند. از فرایند آنزیمی برای هیدرولیز منابع مختلف پروتئینی از جمله گوشت ماکیان و چهارپایان، شیر و منابع گیاهی استفاده می‌شود. اکثر منابع دریایی جزء گونه‌های کم ارزش یا در ارتباط با ضایعات فراوری می‌باشند.

آنزیم آلکالاز توسط بسیاری از محققین بارها مورد استفاده قرار گرفته و اثر مفید آن ثابت شده است به‌گونه‌ای که یکی از مهمترین آنزیم‌ها جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده سویا می‌باشد. این آنزیم به صورت‌های Alcalase 2.4 L و Alcalase 2.4 AF، Alcalase 2.4 LFG وجود دارد که از این سه نوع آنزیم Alcalase 2.4 LFG دارای بالاترین درجه هیدرولیز در مقایسه با آنزیم‌های Neutrase® 1.5MG، Flavourzyme®500MG و Protamex® می‌باشد (Huda *et al*., 2012).

سویا یکی از بیشترین گیاهان زراعی در جهان است که از نظر پروتئین (۴۰-۵۰٪)، چربی (۲۰-۳۰ ٪) و کربوهیدرات (۲۶-۳۰٪) غنی می‌باشد و در نتیجه مورد بحث تحقیقات علمی زیادی قرار گرفته است. مشابه با اغلب دانه‌های حبوبات، این دانه حاوی چندین پروتئین می‌باشد که اکثر آنها در سلامتی‌بخشی و افزایش ارزش تغذیه‌ای غذاها موثر می‌باشند. اخیرا، علاقه به ترکیبات سویا و فراورده‌های تخمیری آن افزایش یافته است که این امر به‌دلیل خواص ضدسرطانی و فواید سودمندی است که گزارش شده است (Messina *et el*., 1994). پروتئین‌های اصلی سویا (بیش از ۸۵٪) شامل گلایسینین و بتا کانگلایسینین می‌باشند. دیگر پروتئین‌های کوچک و گلیکو پروتئین‌ها شامل: لیپوکسیژنازها، لکتین، بازدارنده‌های تریپسین و آلفا آمیلازها می‌باشند (Liu, 1997). در اجزاء هیدرولیز شده سویا و غذاهای تخمیری سویا، پروتئین‌ها تنها بخشی هستند که هیدرولیز می‌شوند زیرا اغلب

پروتئازها قابلیت شکافتن گلیکوپروتئین‌ها، فسفوپروتئین‌ها و دیگر گونه‌های تغییریافته را دارند.

هدف از این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین سویا با استفاده از آنزیم آلکالاز تحت شرایط مختلف دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا و بررسی فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++}) و نیز قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده حاصل از بهترین شرایط هیدرولیز بود.

مواد و روش‌ها

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آلکالاز (با فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون بر گرم[1] و دانسیته ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر) که یک اندوپروتئیناز[2] گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* می‌باشد، استفاده شد. این آنزیم از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه شد و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ایزوله پروتئین سویا با میزان پروتئین ۸۳/۱۲ درصد که به‌صورت تجاری در بازار موجود است، تهیه گردید. فروزین[3]، فری سیانید پتاسیم، تری‌کلرواستیک اسید، کلریدآهن، تریس[4]، اسید هیدروکلریدریک، اسید آسکوربیک، اسید سولفوریک، کاتالیزور و سود پرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

- تهیه پروتئین هیدرولیز شده سویا

ابتدا نمونه ایزوله پروتئین سویا به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده و نمونه رقیق شده با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲ مخلوط گشته و به حالت سوسپانسیون یکنواخت و pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز در آمده (pH = ۸) و سپس در دمای آزمایش، آنزیم براساس فعالیت تعریف شده (۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) به سوسپانسیون اضافه گردید. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[5] مدل VS-8480) و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای تعریف شده برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور حصول اطمینان از غیر فعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با قرار دادن سوسپانسون در حمام آب گرم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به‌سرعت سرد گردیده و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۶۷۰۰×g در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009b). به‌منظور یافتن دامنه مناسب شرایط هیدرولیز جهت بهینه‌سازی، ابتدا پیش‌تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه‌سانتی گراد و زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه و فعالیت‌های آنزیمی ۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین صورت پذیرفت.

- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئینی سویا

به‌منظور تعیین رطوبت، ۵ گرم از نمونه ایزوله پروتئینی سویا روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده، قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتیگراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا اینکه وزن ظرف حاوی نمونه، ثابت گردید (پروانه، ۱۳۸۵). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال ضریب نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3)، و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی در دمای ۶۰۰ درجه سانتیگراد، تعیین گردید (AOAC, 2000).

- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از فاکتورهای مهم در تعیین خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد و در واقع میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را در محصول هیدرولیز شده بیان می‌کند. درجه هیدرولیز براساس روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) برآورد گردید. به حجم برابری از

[1] یک واحدآنسون (Anson unit) عبارت است ازمیزان آنزیم مورد نیاز برای آزادشدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH ۷/۵ (Aspmo et al., 2005).

[2] Endoproteinase
[3] Ferrozine
[4] Tris
[5] Vision Scientific Co., Ltd.

سوپرناتانت، تری کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد اضافه گردید و سپس در دور g × ۶۷۰۰ و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به‌منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد سانتریفیوژ (سانتریفوژ ساخت انگلستان، شرکت سنتریون[1]، مدل K2042) گردید. درجه هیدرولیز براساس فرمول ۱ محاسبه گردید.

$$\text{درجه هیدرولیز (درصد)} = \frac{\text{میزان نیتروژن در TCA ۱۰ درصد}}{\text{کل نیتروژن در نمونه}} \times ۱۰۰ \quad [1]$$

- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++})

۴/۷ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار مخلوط گردیده و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. در انتها جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به‌جای نمونه از آب مقطر استفاده گشت. فعالیت مهارکنندگی از طریق رابطه ۲ به‌دست آمد (Nalinanon *et al*., 2011).

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی (درصد)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰ \quad [2]$$

- آزمون قدرت احیاءکنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای آهن III از روش Bougatef و همکاران صورت پذیرفت (Bougatef *et al*., 2009). برای این منظور ۱ میلی‌لیتر از نمونه محلول هر کدام از نمونه‌ها با ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر از فری سیانیدپتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید. مخلوط در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه گذاری شده و سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی- حجمی) به آن اضافه گردید. مخلوط در g × ۱۶۵۰ برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱ درصد (وزنی- حجمی) کلرید آهن مخلوط گشت. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، بیانگر افزایش قدرت احیاکنندگی آن می‌باشد. جهت مقایسه قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون به‌عنوان یک عامل احیاکننده استفاده شد.

- تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه با استفاده از طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شد و بررسی اثر متغیرهای دما (در سطوح ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (در سطوح ۳۰،۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) و میزان آنزیم (در سطوح ۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون) و در سه تکرار صورت پذیرفت. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار اکسل[2] انجام گردید.

یافته‌ها

- ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئینی سویا

ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئین سویا در جدول ۱ آورده شده است. میزان پروتئین در ایزوله پروتئین سویا ۸۳/۱۲ درصد، میزان رطوبت ۱۳/۱۲ درصد، میزان خاکستر نیز ۱/۷ درصد و مقدار باقیمانده (۲/۰۶ درصد) کربوهیدرات می‌باشد.

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئین سویا

	پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد) کربوهیدرات
ایزوله پروتئین سویا	۸۳/۱۲ ± ۰/۲۵	۱۳/۱۲ ± ۰/۱۸	۱/۷ ± ۰/۲۲ ۲/۰۶ ± ۰/۱۲

* پروتئین، رطوبت و خاکستر، براساس وزن مرطوب[3] نمونه گزارش گردیده‌اند.

** تمامی آزمایشات در ۲ تکرار صورت پذیرفته‌اند.

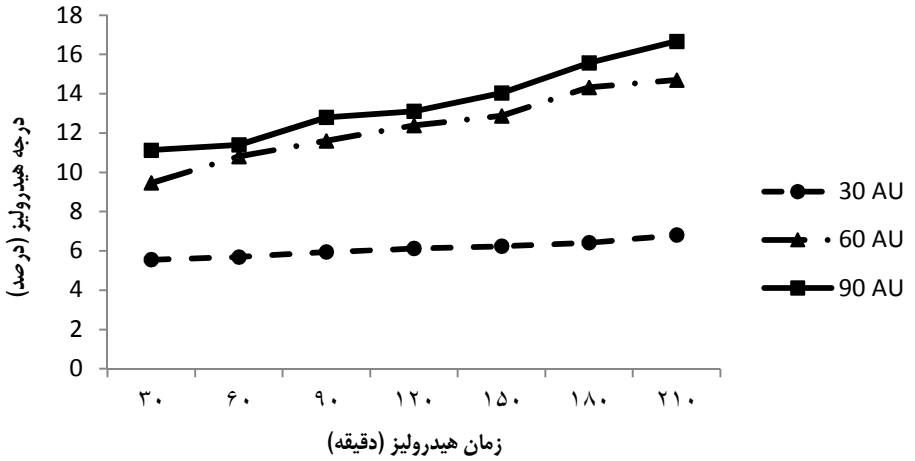
[1] Centurion Scientific LTd. [2] Microsoft Excel 2010 [3] Wet Basis

- ارزیابی میزان پیشرفت هیدرولیز

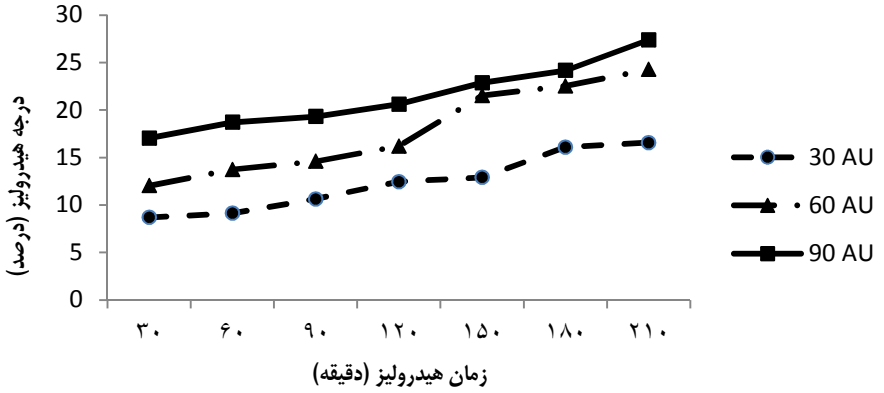
کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز طی فرآیند هیدرولیز مهم می‌باشد، چرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال‌پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص ضداکسایشی پروتئین تولید شده وابسته به شدت و میزان درجه هیدرولیز می‌باشد.

اثر زمان و فعالیت آنزیم بر میزان درجه هیدرولیز در نمودارهای ۱، ۲، ۳ و ۴ نشان داده شده است. عامل زمان اثر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز داشت ($p<۰/۰۵$). به‌صورت کلی با افزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه هیدرولیز افزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در تمامی سطوح دما و میزان فعالیت آنزیم، در زمان ۲۱۰ دقیقه حاصل شد، که در مقایسه بین تیمارها مشخص شد، درجه هیدرولیز در تمامی تیمارهای ۳۰ تا۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری دارد. کمترین میزان درجه هیدرولیز نیز در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به‌دست آمد. افزایش میزان هیدرولیز در اکثر تیمارها از زمان ۹۰ تا ۱۸۰ دقیقه شدت بیشتری یافت. فاکتور دما نیز اثر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز نشان داد ($p< ۰/۰۵$) و با افزایش دما، میزان درجه هیدرولیز نیز افزایش یافت.

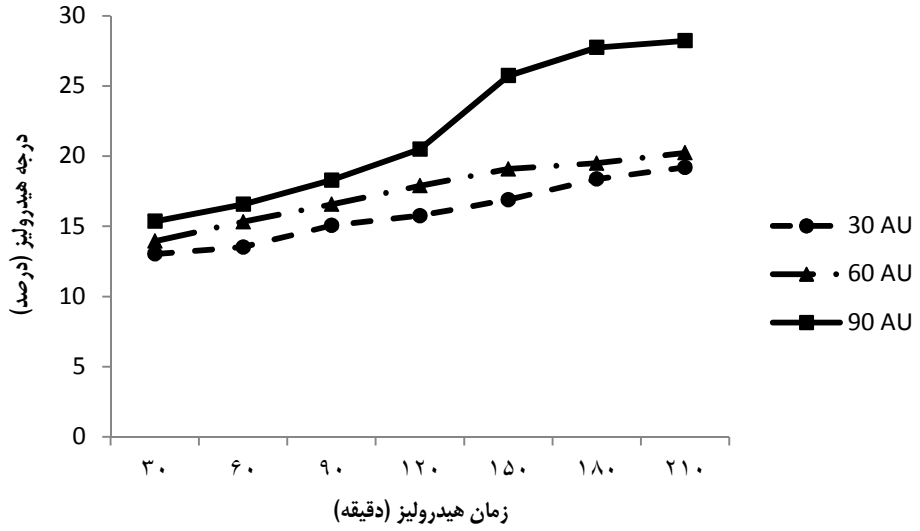
فعالیت آنزیم نیز اثر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز داشت ($p<۰/۰۵$). نتایج، نشان دهنده افزایش درجه هیدرولیز با بالابردن فعالیت آنزیمی از ۳۰ به ۹۰ واحد آنسون می‌باشند. بین فعالیت‌های آنزیمی مورد استفاده، اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<۰/۰۵$). بیشترین اختلاف درجه‌های هیدرولیز در دمای ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، بین فعالیت‌های آنزیمی ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون نشان داده شد.



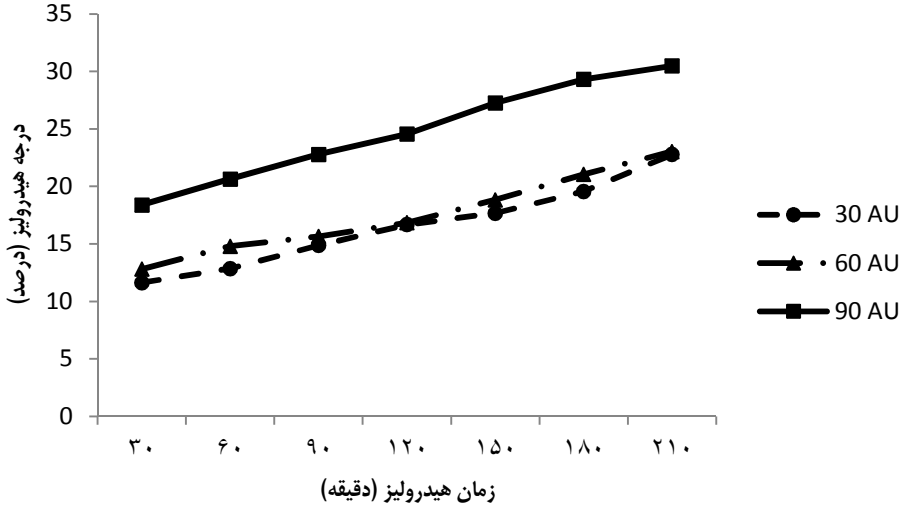
نمودار ۱- درجه هیدرولیز ایزوله پروتئینی سویا در دمای ٤٠ درجه سانتی‌گراد بسته به فعالیت‌های آنزیمی در زمان‌های مختلف



نمودار ۲- درجه هیدرولیز ایزوله پروتئینی سویا در دمای ٤٥ درجه سانتی‌گراد بسته به فعالیت‌های آنزیمی در زمان‌های مختلف



نمودار ۳- درجه هیدرولیز ایزوله پروتئینی سویا در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بسته به فعالیت‌های آنزیمی در زمان‌های مختلف



نمودار ٤- درجه هیدرولیز ایزوله پروتئینی سویا در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بسته به فعالیت‌های آنزیمی در زمان‌های مختلف

از نتایج بالا مشخص است که بیشترین میزان درجه هیدرولیز، در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ گیلوگرم سوبسترا) به‌دست آمد، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به ۳۰/۴۹ درصد رسید.

- **فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن** (Fe^{++})

در بهترین شرایط هیدرولیز، تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی به صورت جدول ۲ می‌باشد. تحت شرایطی که بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده سویا به‌دست آمد، زمان هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه، نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون / کیلوگرم سوبسترا) و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن ۸۵/۵۵ درصد نشان داده شد که در مقایسه با سایر زمان‌های هیدرولیز اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد ($p<0/05$).

- **قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده**

روند تغییرات مربوط به قدرت احیاکنندگی پروتئین

هیدرولیزشده سویا در نمودار ۵ نشان داده شده است. بر طبق آزمایش‌های صورت پذیرفته مقدار قدرت احیاکنندگی تحت شرایطی که در آن درجه هیدرولیز به‌حداکثر مقدار خود رسید (دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا))، عدد جذب ۰/۱۵را نشان داد. همان‌گونه که مشخص است در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد روند افزایشی قدرت احیاکنندگی تا زمان ۹۰ دقیقه هیدرولیز ادامه یافته ودر زمان ۱۲۰ دقیقه دستخوش کاهش شده و دوباره در زمان ۲۱۰ دقیقه افزایش را از خود نشان داده است.

نتایج فعالیت احیاکنندگی یون آهن (Fe^{+++}) نیز برخلاف فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++}) که به صورت صعودی بود از روند مشخصی پیروی نکرده است و در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه ابتدا به ماکزیمم نسبی رسیده، سپس کاهش یافته و در زمان ۲۱۰دقیقه دوباره افزایش یافت.

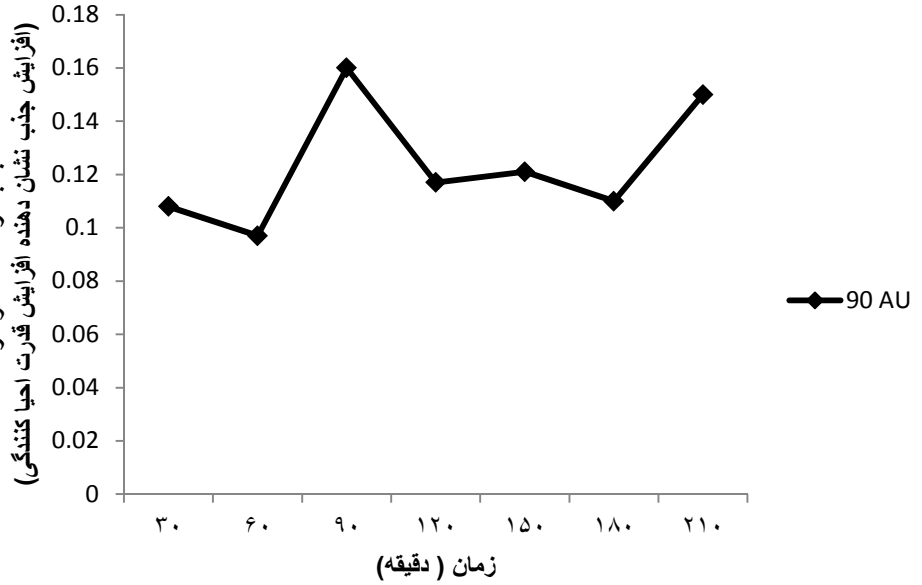
جهت مقایسه قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت ۱۰۰ قسمت در میلیون

جدول ۲- میزان فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده سویا در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و فعالیت آنزیمی ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم

زمان هیدرولیز (دقیقه)	فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (درصد)
۳۰	۷۶/۳۱ ± ۰/۲۲[e*]
۶۰	۷۵/۴۱ ± ۰/۳۶ [f]
۹۰	۷۰/۴۲ ± ۰/۴۴ [g]
۱۲۰	۷۷/۶۳ ± ۰/۲۸ [d]
۱۵۰	۷۸/۴۴ ± ۰/۳۹ [c]
۱۸۰	۸۳/۵۸ ± ۰/۳۲ [b]
۲۱۰	۸۵/۵۵ ± ۰/۲۴ [a]

* انحراف معیار ± میانگین (۳ تکرار)

بین حروف غیر مشابه اختلاف معنی داری از لحاظ آماری وجود دارد ($p < ۰/۰۵$)



نمودار ۵ -قدرت احیاکنندگی ایزوله پروتئینی سویا در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم

(Jayaprakasha *et al*., 2001). به‌عنوان یک عامل احیاکننده استفاده شد که جذب نمونه مربوط به‌آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر، ۰/۷۶۲ بدست آمد، بین میانگین جذب تمامی نمونه‌ها و جذب نمونه‌ها با تیمار اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p<0/05$) و بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه، با میزان جذب ۰/۱۶۰ به‌دست آمد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک ۱۰۰ قسمت در میلیون ۲۰/۹۹ درصد قدرت احیاکنندگی از خود نشان داد.

بحث

Ovissipour و همکاران از بین ۳ دمای ۳۵، ۴۵ و ۵۵، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد را برای دستیابی به بالاترین درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی از امعاء و احشاء ماهی ازون برون، با استفاده از آنزیم آلکالاز، تشخیص دادند (Ovissipour *et al*., 2009b). Taheri و همکاران میزان درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین را با استفاده از آنزیم آلکالاز، در شرایط بهینه در دمای ۴۵/۶۲ درجه سانتی‌گراد، ۳۵/۱۴٪ گزارش کردند (Taheri *et al*., 2011). You و همکاران اثر درجه هیدرولیز روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده ماهی لُچ[1] (*Misgurnus anguillicaudatus*) را مورد بررسی قرار دادند، در این تحقیق از پاپائین و پروتامکس به‌منظور هیدرولیز پروتئین ماهی لُچ استفاده گردید. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در درجه‌ی هیدرولیز ۲۳ درصد توسط آنزیم پاپائین مشاهده گردید (You *et al*., 2009). Motamedzadegan و همکاران به نقل از کریستنسون و راسکو گزارش نموده‌اند که در برخی از موارد آنزیم‌های پروتئولیتیک با شرایط بهینه ارائه شده از طرف شرکت سازنده، توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرند بدون توجه به این موضوع که شرایط بهینه وابسته به سوبسترای مورد استفاده نیز می‌باشد (Motamedzadegan *et al*., 2010).

Thiansilakul و همکاران فعالیت شلاته‌کنندگی ۶۰ درصد را از پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی اسکاد حلقوی (*Decapterus maruadsi*) حاصل نمودند (Thiansilakulr *et al*., 2007). Moure و همکاران پروتئین محلول در حین فراوری پروتئین تغلیظ‌شده‌ی سویا را با اولترافیلتراسیون بازیافت نموده و در معرض هیدرولیز آنزیمی با یک پروتئاز تجاری قرار دادند. هیدرولیزشده‌ها اجزایی با جرم مولکولی نسبتاً بالایی بودند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد بررسی قرارگرفت. اجزاء با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلودالتون بالاترین قدرت احیاکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در تمام روش‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی، از خود نشان‌دادند (Moure *et al*., 2006).

با توجه به نتایج به‌دست آمده و وجود اختلاف معنی‌دار بین دماهای ۴۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد ($p<0/05$) و با توجه به بالاتر بودن میانگین درجات هیدرولیز در ۵۵ درجه سانتی‌گراد نسبت به ۴۰ درجه سانتی‌گراد و از طریق آزمایش‌هایی که در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت، بیشترین میزان درجه‌ی هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد به‌دست آمد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که درجه‌ی هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم از ۳۰ واحد آنسون بر کیلوگرم به ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم، روند افزایشی را به خود پیدا نمود. همچنین میزان درجه‌ی هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه نسبت به دماهای ۴۰، ۴۵ و ۵۰ درجه افزایش بیشتری یافت و در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، نسبت آنزیم ۹۰ آنسون بر کیلوگرم و زمان ۲۱۰ دقیقه بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۴۹/ ۳۰درصد) به‌دست آمد. تحت این شرایط میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده، ۸۵/۵۵ درصد به‌دست آمد. به‌دلیل ایجاد پپتیدها با اندازه‌های مولکولی مختلف در هر تیمار زمانی، فعالیت شلاته‌کنندگی متفاوت خواهد بود (Je *et al*., 2009).

میزان فعالیت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده تحت شرایطی که در آن بالاترین درجه هیدرولیز به‌دست آمد، عدد جذب ۰/۱۵ را نشان داد در حالیکه بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده در دمای ۵۵ درجه سانتیگراد، آنزیم ۹۰ آنسون بر کیلوگرم و زمان ۹۰ دقیقه نشان داده شد که این عدد جذب ۰/۱۶ به‌دست آمد.

[1] Loach

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که میزان و نوع پروتئین هیدرولیز شده تولیدی به‌طور موثری تحت تأثیر فاکتورهای مختلف از جمله دما، زمان و نسبت آنزیم مورد استفاده به سوبسترا قراردارد و هر یک از این فاکتورها دارای اثر معنی‌دار بر کیفیت محصول است. نتایج به‌دست آمده نشان داد که میزان فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی با میزان درجه هیدرلیز ارتباط مستقیمی ندارد و تحت شرایطی که بالاترین درجه هیدرولیز ایجاد می‌شود، ممکن است فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی بالاترین مقدار را نشان ندهد و روند کاهشی داشته باشد.

همچنین، انتخاب آنزیم نیز یکی از فاکتورهای مؤثر بر کیفیت محصول است و به نظر می رسد که آنزیم Alcalase 2.4 L دارای قابلیت خوبی در هضم منابع پروتئینی می‌باشد و دارای هزینه نسبتا پایین است. به همین دلیل در پژوهش حاضر، علاوه بر تولید محصول هیدرولیز شده پروتئینی، به بررسی و شناسایی رفتار ضداکسایشی محصول و بررسی اثر شرایط مختلف تولید بر ویژگی آن‌ها پرداخته شد و می‌توان گفت که این محصول به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی به‌همراه ارزش تغذیه‌ای بالا و دیگر خواص زیستی، در غلظت‌های مناسب قابل رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر EDTA و BHT می‌باشد. این محصول می‌تواند در نوشیدنی چای مورد استفاده قرار گیرد (Lee, 2011).

منابع

پروانه، و. (۱۳۸۵). کنترل کیفی و آزمایش‌های شیمیایی موادغذایی. چاپ سوم. موسسه‌ی چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. ۳۳۲ ص.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound *(Mustelus mustelus)* muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry. 114, 1198–1205.

Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. & Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. J Agric Food Chem. 44, 2619–2623.

Elias, R. J., Kellerby, S. S. & Decker, E. A. (2008). Antioxidant activity of proteins and peptides. Critical Reviews of Food Science and Nutrition. 48, 430–441.

Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. & Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International. 42, 1266-1272.

Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K. A., Kumagai, H., Feng, Y. & Takahashi, K. (1998). Antioxidative activity of soluble elastin peptides. J Agric Food Chem. 46, 2167-2170.

Hoyle, N. T. & Merritt, J. H. (1994). Quality of fish protein hydrolysate from Herring *(Clupea harengus)*. Journal of Food Science. 59, 76-79.

Huda, N., Rosma, A. & Wan Nadiah, W. A. (2012). Degree of hydrolysis and free tryptophan content of Skipjack tuna (Katsuwonus pelamis) protein hydrolysates produced with different type of industrial proteases. International Food Research Journal. 19, 863-867.

Lee, J. (2011). Soy Protein Hydrolysate; Solubility, Thermal Stability, Bioactivity, and Sensory Acceptability in a Tea Beverage. Doctoral dissertation, University of Minnesota.

Liu, K. (1997). Soybeans, technology, and utilization. New York: Chapman & Hall.

Marcuse, R. (1960). Antioxidative effect of amino-acids. Nature,186, 886–887.

Messina, M. J., Persky, V., Setchell, D. R. & Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data Nutrition and Cancer. 21, 113–131.

Moure, A., Domınguez, H. & Parajo, J. C. (2006). Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry. 41, 447-456

Motamedzadegan, A., Davarniam, B., Asadi, G., Abedian, A. M. & Ovissipour, M. R. (2010). Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) viscera using Neutrase. International Aquatic Research. 2, 173-181.

Nalinanon, S. T., Benjakul, S., Kishimura, H. & Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chemistry.124, 1354-1362.

Ovissipour, M. R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry. 115, 238-242.

Sakanaka, S. & Tachibana, Y. (2006). Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chem. 95, 243-249.

Taheri, A., AbedianKenari, A., Motamedzadegan, A. & HabibiRezaie, M. (2011). Optimization of goldstripe sardine (*Sardinellagibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase 2.4L by response surface methodology.CyTA - Journal of Food. 9, 114–120.

Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. Journal of Food Biochemistry. 31, 266-287.

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 10, 235-240.

Xie, Z, Huang, J., Xu, X. & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chem. 111, 370-376.

Zhou, S. & Decker, E. A. (1999). Ability of amino acids, dipeptides, polyamines, and sulfhydryls to quench hexanal, a saturated aldehydic lipid oxidation product. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 47, 1932–1936.