بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصولات هیدرولیز پروتئین بادام زمینی توسط آنزیم‌های پپسین و آلکالاز

هاله حاجی کاظمی[a]، مهتا میرزایی[b*]، سعید میردامادی[c]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۷/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۷/۱۰/۱۲

چکیده

مقدمه: پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین به صورت غیرفعال وجود داشته اما پس از پروتئولیز توانایی کاهش فشارخون، اثرات ضدانعقادی، آنتی‌اکسیدانی، آرام بخشی، تاثیر بر سیستم ایمنی بدن و تاثیرات ضدمیکروبی از خود نشان می‌دهند. بادام زمینی یکی از مغزهای رایج مصرفی می‌باشد که میزان پروتئین بالایی داشته که می‌تواند به عنوان منبع استخراج پپتیدهای زیست فعال با توالی جدید و عملکرد خاص مورد بررسی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها: فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصولات حاصل از هیدرولیز پروتئین بادام زمینی خام بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز در زمان‌های مختلف هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین استخراج شده از بادام زمینی با روش استخراج با آب، به مدت ۵ ساعت در معرض هیدرولیز بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز(با نسبت آنزیم به سوبسترا ۱:۱۰) به ترتیب در دمای ۳۷ و ۶۰ درجه سانتی گراد و pH برابر ۲ و ۸/ ۵ قرار گرفت سپس در طی زمان، پیشرفت هیدرولیز آنزیمی با روش OPA و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفتند.

یافته‌ها: مقادیر گروه‌های آمین آزاد تولید شده توسط آنزیم‌های پپسین و آلکالاز به ترتیب از مقادیر۰/۴۱۵ µM leu/mg protein و ۰/۱۶۷در زمان صفر به ۰/۵۱۷µM leu/mg protein و ۰/۲۶۳ بعد از ۵ ساعت هیدرولیز رسیدند. حداکثر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در محصول هیدرولیز پپسین و آلکالاز به ترتیب ۰/۲۷۵۱ mM TE/mg protein و ۰/۳۶۴۴ و حداکثر فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS برای دو آنزیم ۰/۷۵۶ mM TE/mg protein و ۱/۰۸۷ اندازه گیری شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که آنزیم‌های پپسین و آلکالاز دارای توانایی هیدرولیز پروتئین‌های بادام‌زمینی و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان هستند. نتایج حاصل از این تحقیق نشاندهنده پتانسیل استفاده از محصول هیدرولیز پروتئین بادام زمینی بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز، در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: *آلکالاز، بادام زمینی، پپسین، فعالیت آنتی اکسیدانی، هیدرولیز آنزیمی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: Mahtam86@gmail.com

مقدمه

بادام زمینی *Arachis hypogaea* گیاه یک ساله و شامل چهار واریته رانر، اسپانیش، ویرجینیا و والنسیا می‌باشد (Woodroof, 1983). بادام‌زمینی از نظر میزان تولید، چهارمین دانه روغنی مهم پس از سویا، پنبه دانه و کلزا می‌باشد و تقریبا ۷۵٪ بادام زمینی دنیا در هندوستان، چین و ایالات متحده آمریکا تولید می‌گردد (Salunkhe,1992). بادام زمینی منبع روغن، ویتامین‌ها، مواد معدنی و پروتئین می‌باشد که تحت اثر فرایندهای مختلف قرار گرفته و مورد استفاده قرار می‌گیرد. حدود ۵۰٪ بادام زمینی تولیدی در ایالات متحده آمریکا به شکل کره بادام‌زمینی و فراورده‌های گستردنی مورد استفاده قرار می‌گیرد. ایزوله پروتئین بادام زمینی در محصولات لبنی و محصولات گوشتی به عنوان عامل ایجاد کننده بافت مورد استفاده قرار گرفته است (Nwokolo and Smartt, 1996). بادام زمینی غنی از آمینواسیدهای اسیدی می‌باشد اما در برخی از اسیدآمینه‌های ضروری مثل لیزین، متیونین و ترئونین کمبود دارد (Salunkhe, 1992). تفاله‌ی روغن‌کشی شده‌ی بادام زمینی به دلیل پروفایل اسید آمینه‌های موجود، می‌تواند به عنوان غنی کننده‌ی پروتئینی در غذاها مورد استفاده قرار گیرد. استفاده از فرایندهای مختلف مانند فرایند هیدرولیز پروتئین‌ها، می‌تواند باعث بهبود خواص کاربردی پروتئین شود. هیدرولیز شیمیایی به دلیل احتمال تخریب ال- آمینواسیدها و احتمال تولید ترکیبات سمی مثل لیزینو-آلانین، کمتر مورد توجه قرار گرفته است ولی هیدرولیز آنزیمی فرایندی اختصاصی است که باعث بهبود ویژگی‌هایی مانند کف‌کردن، امولسیون‌کنندگی، حلالیت، ارزش تغذیه‌ای در پروتئین‌ها می‌شود (Ludescher, 1996). علاوه بر آن هیدرولیز پروتئین با آنزیم‌های گوارشی، هیدرولیز آنزیمی در شرایط آزمایشگاهی و تخمیر میکروبی می‌توانند منجر به تولید پپتیدهای زیست فعال شوند. پتیدهای زیست فعال قطعه‌هایی ویژه از پروتئین هستند که در اثر هیدرولیز آنزیمی پروتئین تولید شده و فعالیت آنها وابسته به نوع و توالی اسید های آمینه می‌باشد و دارای فعالیت فیزیولوژیک در سلول‌های زنده شامل اثرات ضدفشارخونی، ضدمیکروبی، ضد ترومبا و تقویت کنندگی سیستم ایمنی بدن می‌باشند (Makinen, 2014). فعالیت زیستی پپتیدهای زیست فعال بسته به نوع اسید آمینه‌های موجود در توالی پروتئین اولیه، نوع آنزیم‌های هیدرولیز کننده، شرایط هیدرولیز آنزیمی و میزان پیشرفت هیدرولیز وابسته است. در تحقیق حاضر، اثر آنزیم‌های پپسین و آلکالاز و همچنین اثر میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی بر فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین بادام زمینی مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

- مواد

بادام زمینی خام از مغازه آجیل فروشی تواضع در تهران تهیه گردید. آلکالاز با فعالیت آنزیمی ۲/۴u/g و پپسین با فعالیت آنزیمی ۲۵۰۰u/mg، ۱،۱-دی فنیل-۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲و۲ آزینو بیس-۳ اتیل بنزو تیازولین -۶- سولفونیک اسید (ABTS)، ارتوفتال آلدئید (OPA) و ترولوکس از شرکت سیگما- آمریکا خریداری شدند. سرم آلبومین گاوی (BSA)، سدیم پتاسیم تارتارات، سولفات مس، کربنات سدیم و سودسوزآور نیز از شرکت مرک- آلمان خریداری شدند.

- آماده سازی محلول پروتئینی

آماده‌سازی محلول پروتئینی طبق روش He و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت. به طور خلاصه بادام زمینی آسیاب شده چربی‌زدایی شده با نسبت ۱۰: ۱ حجمی/وزنی با آب مقطر مخلوط شده و pH به کمک سدیم هیدروکسید یک مولار به ۸ رسانده شد و سپس به مدت ۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با دور g× ۷۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت از کیک زیرین جدا شد و pH به کمک اسید هیدروکلریدریک یک مولار به pH ایزوالکتریک برابر ۴/۵ رسانده شد تا پروتئین رسوب نماید. پروتئین رسوب نموده جدا گردیده، در آب مقطر حل شد و مجددا pH آن به کمک سدیم هیدروکسید یک مولار خنثی گردید. نمونه‌ها جهت مطالعات بعدی لیوفیلیزه شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (He *et al*., 2013).

- آماده‌سازی محصولات هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام زمینی

در ابتدا نمونه پروتئینی در بافر هیدروکلریک اسید- پتاسیم کلراید (۵۰ میلی مولار،۲ =pH) آماده سازی شد. به محلول پروتئین بادام زمینی با غلظت ۵٪، آنزیم پپسین به نسبت ۱ به ۱۰ (آنزیم به سوبسترا) اضافه شد. ۵ سی سی نیز به عنوان نمونه کنترل و بدون آنزیم زنی مورد بررسی قرار

گرفت. سپس نمونه‌ها در بن‌ماری شیکردار با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. هیدرولیز به مدت ۵ ساعت ادامه پیدا کرد و هر ۳۰ دقیقه یکبار نمونه برداشته شد. در رابطه با هیدرولیز پروتئین بادام زمینی با آلکالاز نیز محلول پروتئینی با غلظت ۵ درصد به کمک سدیم هیدروکسید یکدهم مولار با pH برابر ۸/۲ تهیه شد. سپس آنزیم آلکالاز محلول در فسفات بافر، با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱ به ۱۰ به نمونه اضافه شد نمونه داخل بن‌ماری شیکردار با دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۵ ساعت قرار گرفت. در ابتدا، هر ۱۵ دقیقه یکبار از محلول نمونه برداشته شد. این روند تا ۲ ساعت ادامه داشت و سپس هر سی دقیقه نمونه‌برداری انجام شد. فعالیت آنزیمی در کلیه نمونه‌ها در بن ماری با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه متوقف گردید و در دور g× ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه به منظور جدا کردن رسوب احتمالی، سانتریفوژ شد و محلول رویی جهت انجام آزمون‌های بعدی در فریزر نگهداری شد (He *et al*., 2013).

- اندازه گیری میزان پروتئین

محتوای پروتئین نمونه‌ها با استفاده از روش کلدال (Morr *et al*., 1985) و میزان پروتئین محلول در نمونه‌های تهیه شده برای هیدرولیز آنزیمی، با روش لوری اندازه گیری شد.

در روش لوری، محلول A از ترکیب ۱ سی‌سی سولفات مس (۱٪)، ۱ سی‌سی سدیم پتاسیم تارتارات (۲٪)، ۴۹ سی‌سی سود ۰/۱ نرمال و ۴۹ سی‌سی کربنات سدیم ۲٪ تهیه شدند. در زمان آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۲/۵ سی سی از محلول A مخلوط و بلافاصله ورتکس و ۱۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول فولین رقیق شده (به نسبت ۱:۱ با آب) به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. از محلول استاندارد آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های mg/ml ۵۰-۱۵۰ برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (Lowry *et al*., 1951).

- اندازه‌گیری میزان هیدرولیز به روش ارتوفتالالدئید (OPA)

محلول ارتو فتال‌آلدئید از مخلوط ۲۵ سی‌سی سدیم تترا هیدرابورات (۱۰۰ میلی مولار)، ۲/۵ سی‌سی سدیم دسیل سولفات (۲۰٪) ،۴۰ میلی‌گرم ماده ارتوفتال آلدئید در متانول و ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول به حجم ۵۰ سی‌سی به صورت تازه تهیه شدند. در زمان آزمایش، ۲۰ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با یک سی‌سی از محلول تهیه شده مخلوط شده و بلافاصله ورتکس و ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲ سی‌سی آب مقطر اضافه شده و جذب نمونه‌ها در ۳۴۰ نانومتر قرائت گردید (Fitznar *et al*., 1999).

- بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH

برای این منظور ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه (یا اتانول بعنوان کنترل) به ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول DPPH در اتانول (۱۰۰ میکرومولار) اضافه شد. برای ۱۰ ثانیه مخلوط شد و مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد. میزان جذب محلول حاصل در ۵۲۰ نانومتر اندازه گیری شد و فعالیت مهار کنندگی رادیکال (٪) با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Bondet *et al*., 1997). از محلول استاندارد ترولوکس در غلظت‌های ۱۰۰۰-۱۰ میکرومولار برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر اساس میکرومولار ترولوکس /میلی‌گرم پروتئین ارائه گردید

(رابطه ۱)

$$\text{فعالیت مهار کنندگی رادیکال (\%)} = \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

- بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS

محلول‌های ۷ میلی‌مولار از ABTS و ۲/۴۵ میلی مولار از پتاسیم پرسولفات و به حجم یک لیتر تهیه شدند و به مدت ۱۶ ساعت در تاریکی قرار داده شد. محلول با فسفات بافر ۵ میلی‌مولار (pH=۷/۴) تا حد جذب ۰/۷رقیق شده و سپس جذب آن در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. جهت بررسی نمونه‌ها یک سی‌سی از محلول تهیه شده با ۲۵ میکرولیتر از نمونه به خوبی ورتکس شده و مدت ۶ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب محلول حاصل در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد و فعالیت مهار کنندگی رادیکال (٪) با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید. از محلول استاندارد ترولوکس در غلظت‌های ۱۰-۱۰۰۰ میکرومولار برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و نتایج بر اساس میکرومولار ترولوکس /میلی‌گرم پروتئین ارائه گردید (Re *et al*., 1999).

(رابطه ۲)

$$\text{فعالیت مهار کنندگی رادیکال (\%)} = \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون ها در سه تکرار، انجام شدند. منحنی‌ها به کمک نرم‌افزار Excel 2016 رسم شدند و سطح معناداری اختلاف نمونه‌ها به کمک آزمون‌های T-test و one-way ANOVA به کمک نرم‌افزار SPSS version 16 و میزان P-value<0.05 به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شد.

یافته ها

- پیشرفت هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام‌زمینی بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز

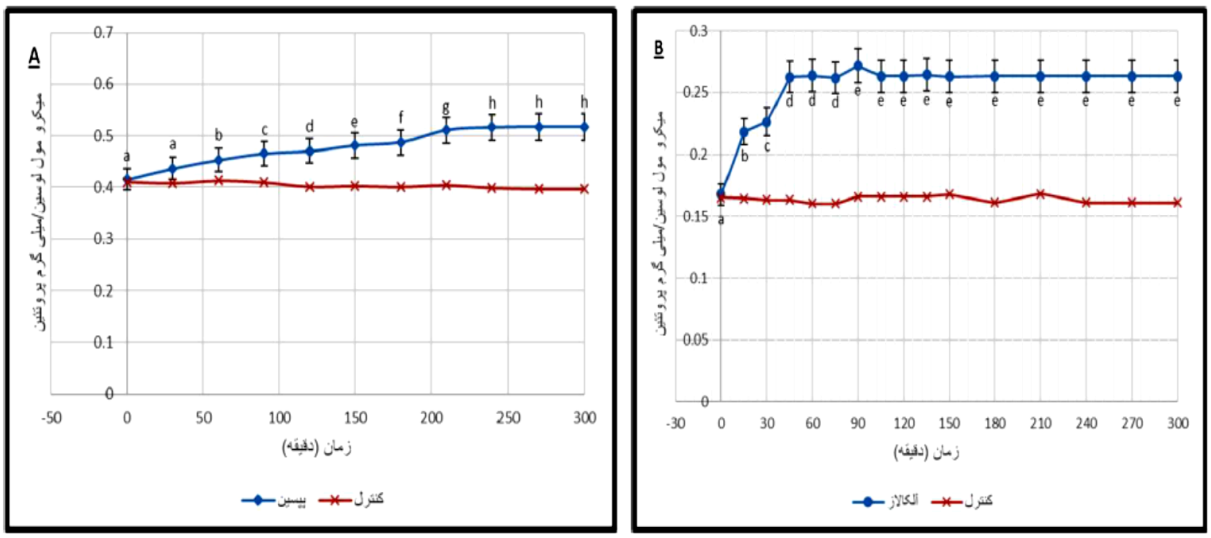
شکل‌های A ۱ و ۱B به ترتیب میزان هیدرولیز پروتئین بادام زمینی بوسیله پروتئازهای پپسین و آلکالاز را در مدت گرمخانه‌گذاری در زمان‌های مختلف نشان می‌دهند. هیدرولیز به مدت ۵ ساعت مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دادند که میزان هیدرولیز نمونه بادام زمینی بوسیله آنزیم آلکالاز از زمان شروع هیدرولیز روند افزایشی داشته است به نحوی که در ۳۰ دقیقه ابتدایی از ۰/۱۶۷۷ به ۰/۲۱۸۵ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسیده است. این روند تا دقیقه ۱۳۵ ادامه یافته به نحوی که به حدود ۰/۲۶۴۶ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسیده است و سپس با توقف هیدرولیز همراه بوده است. در ۳۰ دقیقه ابتدایی از هیدرولیز با آنزیم پپسین، میزان هیدرولیز پیشرفت زیادی نداشته است ولی با گذشت زمان، میزان هیدرولیز روند افزایشی داشته است و به میزان ۰/۵۱۷۵ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین رسیده است.

– آلکالاز

میزان فعالیت آنتی اکسیدانی محصولات پپتیدی حاصل از هیدرولیز پروتئین بادام زمینی با آنزیم‌های آلکالاز و پپسین هر ۳۰ دقیقه یکبار برای آنزیم پپسین و هر ۱۵ دقیقه برای آنزیم آلکالاز تا مدت زمان ۱۵۰ دقیقه و پس از آن هر ۳۰ دقیقه یکبار طی مدت زمان ۵ ساعت، با استفاده از روش‌های بررسی میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفت و نتایج بصورت mM TE/mg protein گزارش شدند.

– بررسی میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

همانگونه که در شکل ۲ نشان داده شده است، میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH توسط پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین بادام زمینی بوسیله پپسین تا دقیقه ۱۵۰ افزایش یافت بطوریکه ۱۵۰دقیقه به مقدار۰/۲۷۵رسیده است و پس از آن با افزایش درجه



شکل ۱- بررسی میزان پیشرفت آنزیمی بوسیله آنزیم‌های پپسین (A) و آلکالاز (B) در طی ۵ ساعت و مقایسه آن با نمونه کنترل فاقد آنزیم اندازه گیری شده با روش OPA

تمامی داده ها میانگین ۳ تکرار هستند. حروف غیر مشابه نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین داده هست.

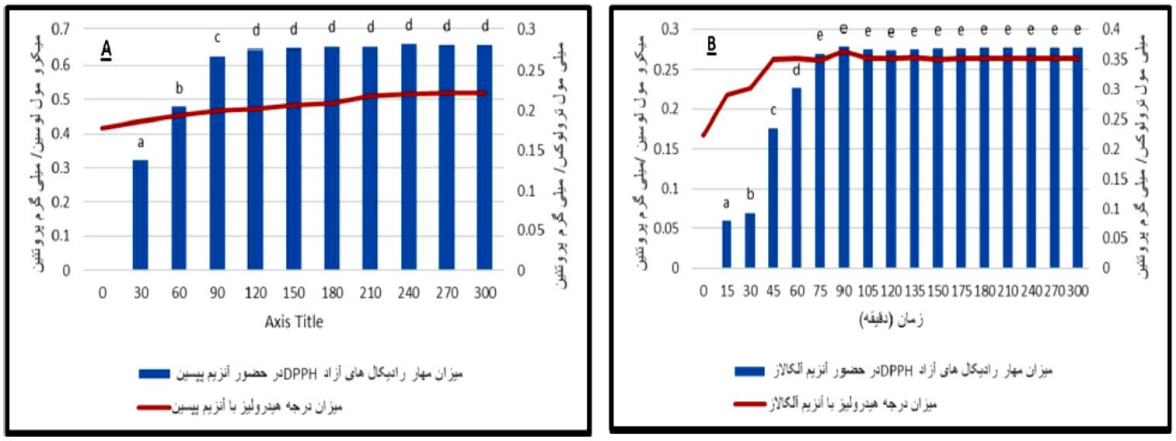
هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی تغییر نکرده است در حالیکه هیدرولیز آنزیمی تا دقیقه ۲۴۰ روال افزایشی داشته است.

در نمونه‌های هیدرولیز شده بوسیله آلکالاز نیز میزان مهار کنندگی رادیکال‌های DPPH، در دقیقه ۶۰ به بیشترین مقدار خود (۰/۳۷۰۰ میکرومول ترولوکس/ میلی گرم پروتئین) رسید. نتایج بررسی پیشرفت هیدرولیز آنزیمی نیز نشان داده بود که بعد از ۶۰ دقیقه، میزان هیدرولیز آنزیمی به بالاترین مقدار خود می‌رسد.

- **بررسی میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS**

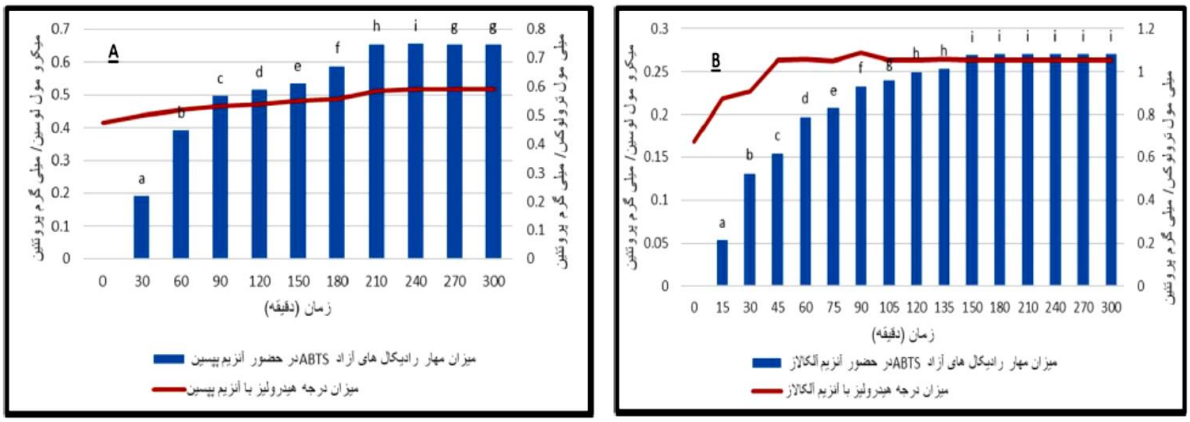
میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS، در نمونه‌های هیدرولیز شده بوسیه پپسین و آلکالاز به ترتیب در شکل‌های ۳A و ۳B نشان داده شده است. همانطورکه در نتایج مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، مشاهده شد با افزایش میزان هیدرولیز فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS نیز افزایش یافته است و بعد از آن ثابت مانده است.

علاوه بر آن نتایج نشان می‌دهند که آنزیم آلکالاز آنزیم موثرتری در تولید پپتیدهای مهارکننده رادیکال‌های آزاد ABTS در تمامی مراحل هیدرولیز نسبت به آنزیم پپسین بوده است. به‌طور کلی آنزیم آلکالاز توانایی بیشتری در تولید پپتیدهای با مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در مقایسه با آنزیم پپسین از خود نشان داد.



شکل ۲- بررسی رابطه‌ی بین پیشرفت هیدرولیز پروتئین بادام زمینی بوسیله آنزیم‌های پپسین (A) و آلکالاز (B) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

تمامی داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند. حروف انگلیسی غیر مشابه نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین نمونه هاست.



شکل ۳- بررسی رابطه ی بین پیشرفت هیدرولیز پروتئین بادام زمینی بوسیله آنزیم‌های پپسین (A) و آلکالاز (B) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

تمامی داده‌ها میانگین ۳ تکرار هستند. حروف انگلیسی غیر مشابه نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار (P<۰/۰۵) بین نمونه هاست.

- مقایسه میزان فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در نمونه‌های هیدرولیز شده بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز

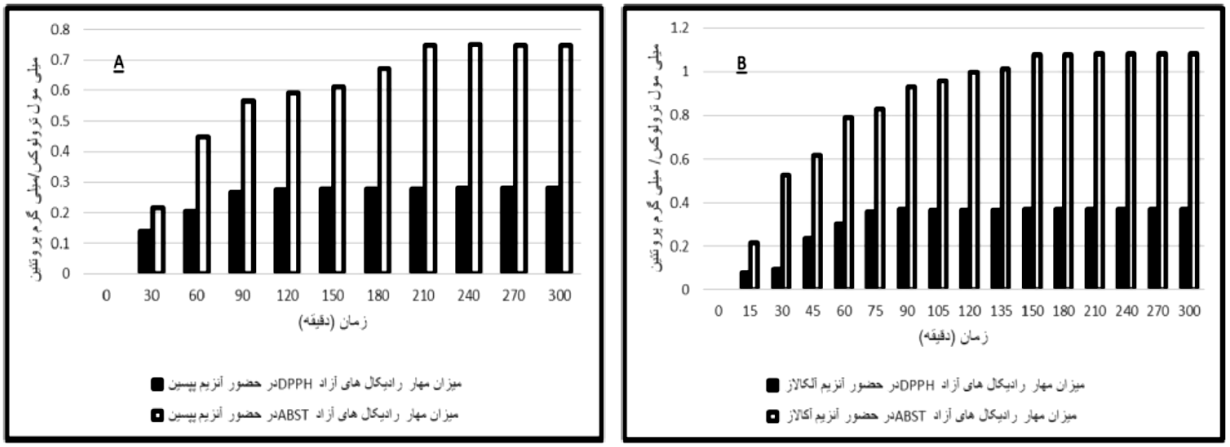
همانطورکه در شکل‌های ۴A و ۴B نشان داده شده است، در نمونه‌های پروتئین بادام زمینی تیمار شده با هر دو آنزیم پپسین و آلکالاز، میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS بیشتر از فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH بوده است. در واقع نتایج نشان می‌دهند در اثر عمل هر دو آنزیم پپسین و آلکالاز، پپتیدهایی تولید شده‌اند که قابلیت مهار کنندگی رادیکال ABTS بیشتری نسبت به مهار کنندگی رادیکال DPPH دارند.

بحث

محتوای پروتئین بادام زمینی اندازه‌گیری شده به روش کلدال ۲۵/۴۱٪ وزن خشک دانه اندازه‌گیری شد. Quist و همکاران (۲۰۰۵) محتوای پروتئین دانه‌های بادام زمینی را ۲۱/۴٪ وزن خشک گزارش نمودند. مطابق گزارش USDA میزان پروتئین دانه بادام زمینی به طور میانگین ۲۶٪ وزن خشک آن می‌باشد. که این میزان، بسته به نوع واریته، روش و میزان آبیاری، شرایط آب و هوایی و زمان برداشت، متفاوت است (Turner and Backman, 1991).

میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام زمینی توسط آنزیم‌های پپسین و آلکالاز در شکل‌های ۱Aو ۱B نشان داده شده و با نمونه‌های کنترل فاقد آنزیم مقایسه شده است. نتایج ارائه شده بیانگر تاثیر دو آنزیم در شکستن اتصالات پپتیدی بین آمینواسیدهای موجود در پروتئین بادام زمینی هستند. همانگونه که نتایج نشان می‌دهند در تحقیق حاضر آنزیم آلکالاز توانایی بیشتری در هیدرولیز پروتئین بادام زمینی در مقایسه با آنزیم پپسین از خود نشان داده است که می‌تواند سبب تولید پپتیدهای بیشتر و با اندازه قطعات کوچک‌تر گردد. آلکالاز یک اندوپروتئاز بوده و میزان هیدرولیز بالا ممکن است به‌دلیل فعالیت پروتئولیتیک بالای این آنزیم و وجود باندهای پپتیدی در دسترس بیشتر باشد. پپسین یک آسپارتیک اسید پروتئاز است که در معده بسیاری از موجودات وجود دارد. دارای گستره عملکردی محدودی است. ترجیحا پیوندهای پپتیدی بین آمینواسیدهای آبگریز مثل لوسین و فنیل‌آلانین را می‌شکند. علاوه برآن، آمینواسیدهایی که عمدتا بعد از باندهای پپتیدی شکسته شده وجود دارند شامل تریپتوفان و تیروزین می‌باشند و به ندرت باندهای پرولین و هیستدین شکسته می‌شوند. توالی اسیدهای آمینه در اطراف باندی که شکسته می‌شود اثرات مهمی بر سرعت هیدرولیز دارد (Hou *et al*., 2006).

نتایج تحقیق Bamdad و همکاران (۲۰۱۱) بر روی دانه جو و مقایسه سه آنزیم پپسین، آلکالاز و فلاوورزیم، نشاندهنده تاثیر بیشتر آنزیم فلاورزیم در هیدرولیز پروتئین جو بود (Bamdad *et al*., 2011). محققین دیگر نیز گزارش نمودند که در تیمار ایزوله آب پنیر با آنزیم‌های فلاوورزیم، آلکالاز و نوتراز، بالاترین میزان هیدرولیز در حضور آنزیم آلکالاز بدست آمد (Dryakova *et al*., 2010). مطالعات محققین دیگر نیز در میزان هیدرولیز ضایعات میگوی سفید



شکل ٤- مقایسه فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS و DPPH در نمونه‌های تیمار شده بوسیله پپسین (A) و آلکالاز (B)

تمامی داده‌ها حاصل ۳ تکرار هستند. حروف انگلیسی غیر مشابه نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار ($P<۰/۰۵$) بین نمونه هاست.

هندی تیمار شده با آنزیم‌های پپسین، آلکالاز، آلفاکیموتریپسین، نوتراز و فلاوورزیم، نشاندهنده پیشرفت هیدرولیز با گذشت زمان بود و آنزیم آلکالاز آنزیم موثرتری در هیدرولیز نسبت به سایر آنزیم‌های مورد بررسی بود (Taheri *et al.*, 2012).

نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که تغییر سوبسترای پروتئینی نمونه و تغییر در نوع آنزیم بر شرایط هیدرولیز تاثیرگذار می‌باشند. در مورد بادام زمینی، مطالعات قبلی نشان می‌دهند که آراچین ۶۳٪ و کوناراچین ۳۳٪ از کل پروتئین مغز بادام زمینی را شامل می‌شوند و ۸/۷۴ ٪ از پروتئین بادام زمینی را ترکیبات آلبومینی تشکیل می‌دهند. کوناراچین ۳ برابر آراچین ترکیبات سولفوره دارد ولی محتوای فنیل آلانینی و تیروزینی آن کم می‌باشد. آراچین در ترکیبات سولفوره، متیونین و لیزین فقیر بوده و در ترئونین و پرولین غنی می‌باشد (Woodroof, 1983). گزارشات دیگر نیز نشان می‌دهند که پروتئین‌های بادام زمینی نسبتا غنی از اسیدآمینه‌های اسیدی مثل آسپارتیک می‌باشد (Salunkhe, 1992). این نوع ترکیب پروتئینی احتمالا بر فرایند هیدرولیز آنزیمی و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تاثیر گذار بوده است. علاوه بر آن، وجود پیوندهای داخلی دی سولفیدی ممکن است باعث مقاومت پروتئین بادام زمینی در برابر هیدرولیز آنزیمی شده باشد (Wieser, 2007)

فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئینی بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز در طی زمان هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت آنتی اکسیدانی وابسته به تمایل بین رادیکال ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدان است (Moure *et al.*, 2006) و تکنیک‌های متفاوتی برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. روش‌های مبتنی بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در گروه روش‌های مبتنی بر انتقال الکترون طبقه‌بندی می‌شوند (Martysiak-Zurowska and Wenta, 2012). نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی محصولات هیدرولیز پروتئین بادام زمینی نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین بادام‌زمینی همزمان با افزایش درجه هیدرولیز توسط هر دو آنزیم، افزایش می‌یابد. بنابراین هیدرولیز بوسیله آنزیم‌های پپسین و آلکالاز باعث آزادسازی پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS از ساختار اولیه پروتئین شده است و آنزیم آلکالاز آنزیم موثرتری نسبت به آنزیم پپسین در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان از پروتئین بادام زمینی بوده است. تحقیقات قبلی نیز به نقش آلکالاز در تولید پپتیدهای کوتاه زنجیر آنتی‌اکسیدان اشاره کرده‌اند (Saito, *et al.*,1994). گزارشات قبلی نشان می‌دهند که پپسین پیوندهای کناری اسیدآمینه‌های آروماتیک مثل فنیل آلانین و تیروزین را می‌شکند و توانایی شکست پیوندهای کناری والین، آلانین و گلیسین را ندارد، در حالی که آلکالاز پیوندهای هیدروفوب انتهایی را می‌شکند. بنابراین، احتمال تولید پپتیدهای هیدروفوب که خاصیت آنتی اکسیدانی نیز بیشتر به آنها نسبت داده شده است، بوسیله آنزیم آلکالاز بیشتر می‌باشد.

همانطورکه نتایج ارائه شده در شکل‌های ۲و ۳ نشان می‌دهند، مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی اندازه گیری شده با روش ABTS به طور معنی‌داری ($P<0/05$) بالاتر از مقادیر اندازه‌گیری شده با روش DPPH است. این تفاوت می‌تواند با واکنش پذیری بیشتر رادیکال‌های ABTS با ترکیبات آنتی اکسیدان در مقایسه با رادیکال‌های DPPH توضیح داده شود. نتایج این تحقیق، نتیجه گزارش قبلی (Martysiak-Zurowska and Wenta, 2012) در مورد شیر انسان را تایید می‌کند. آن ها همچنین حساسیت بیشتر روش ABTS را نسبت به روش DPPH گزارش کردند.

نتیجه‌گیری

در مجموع نتایج این تحقیق نشان دادند که که هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام زمینی خام، می‌تواند منجر به تولید محصولات با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS گردد. به‌طور کلی با افزایش میزان هیدرولیز میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS افزایش یافته و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS در محصولات هیدرولیز بوسیله هر دو آنزیم بیشتر از فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH بوده است. نتایج نشان می‌دهند که تغییر نوع آنزیم مصرفی می‌تواند سبب تغییر در سایز پپتیدهای تولید شده گردد که خود سبب تغییر در میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد می‌گردد. طبق نتایج حاصله محصول هیدرولیز پروتئین بادام زمینی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارای پتانسیل استفاده به عنوان ترکیب فراسودمند در فرمولاسیون مواد غذایی است.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب سپاس و قدردانی خود را از حمایت‌های دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس اعلام می‌دارند.

منابع

Bamdad, F., Wu, J. & Chen, L. (2011). Effects of Enzymatic Hydrolysis on Molecular Structure and Antioxidant Activity of Barley Hordein. Journal of Cereal Science, 54, 20-28.

Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and Mechanisms of Antioxidant Activity Using the DPPH. Free Radical Method. LWT-Food Science and Technology, 30(6), 609-615.

Chiang, W. D., Shih, C. J. & Chu, Y. H. (1999). Functional Properties of Soy Protein Hydrolysate Produced from a Continuous Membrane Reactor System. Food Chemistry, 65(2), 189-194.

Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L. & Korhonen, H. J. (2010). Antioxidant Properties of Whey Protein Hydrolysates as Measured by Three Methods. European Food Research and Technology, 23 (6), 865- 874.

Fitznar, H. P., Lobbes, J. M. & Kattner, G. (1999). Determination of Enantiomeric Amino acids with High-Performance Liquid Chromatography and Pre-column Derivatisation with O-phthaldialdehyde and N-Isobutyrylcysteine in Seawater and Fossil Samples (mollusks). Journal of Chromatography, A832(1), 123-132.

He, R., Alashi, A., Malomo, S. A., Girgih, A. T., Cha D., Ju, X. & Aluko, R. E. (2013). Antihypertensive and Free Radical Scavenging Properties of Enzymatic Rapeseed Protein Hydrolysates. Food Chemistry, 141(1), 153-159.

Hou, R. Z. Y., Yang, G. Li, Y. B., Huang, H., Wang, Y. J., Liu, L. & Zhang, X. Z. (2006). Synthesis of a Precursor Dipeptide of RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) Catalysed by the Industrial Protease Alcalase. Biotechnology and Applied Biochemistry, 44(2), 73-80.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Protein Estimation by Lowry's Method. The Journal of Biological Chemistry, 193(1), 265-275.

Ludescher, R. D. (1996). Physical and Chemical Properties of Amino Acids and Proteins. Food Proteins: Properties and Characterization: Wiley-VCH, PP. 23-70.

Makinen, S. (2014). Production, Isolation and Characterization of Bioactive Peptides with Antihypertensive Properties from Rapeseed and Potato Protein, phD thesis, University of turku.

Martysiak-Zurowska, D. & Wenta, W. (2012). A Comparison of ABTS and DPPH Methods for Assessing the Total Antioxidant Capacity of Human Milk. Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria, 11(1), 83-89.

Moure, A., Domínguez, H. & Parajó, J. C. (2006). Antioxidant Properties of Ultrafiltration-Recovered Soy Protein Fractions from Industrial Effluents and Their Hydrolysates. Process Biochemistry, 41(2), 447-456.

Morr, C. V., German, B., Kinsella J. E., Regenstein, J., Van Buren, J. P., Kilara, A., Lewis, B. A. & Mangino, M. E. (1985). A Collaborative Study to Develop a Standardized Food Protein Solubility Procedure. Journal of Food Science 50(6): 1715-1718.

Nwokolo, E. & Smartt, J. (1996). Food and Feed from Legumes and Oilseeds, Chapman & Hall London, UK.

Panyam, D. & Kilara, A. (1996). Enhancing the Functionality of Food Proteins by Enzymatic Modification. Trends in Food Science & Technology, 7(4), 120-125.

Quist, E. E. (2005). Peanut (Arachis hypogaea L.) as a Sourse of Antihypertensive and Antimicrobial Peptides. MSc thesis, University of Ghan.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & .Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.

Saito, Y., Wanezaki, K., Kawato, A. & Imayasu, S. (1994). Structure and Activity of Angiotensin I Converting Enzyme Inhibitory Peptides from Sake and Sake Lees. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(10), 1767-1771.

Salunkhe,, D. K. (1992). World Oilseeds, Springer Science & Business Media.

Siow, H. L. & Gan, C. Y. (2013). Extraction of Antioxidative and Antihypertensive Bioactive Peptides from Parkia speciosa Seeds. Food Biochemistry, 141, 3435–3442.

Taheri, A., Jalalinezhad, S. & Anvar, S. A. A. (2012). Antihypertensive and Antioxidant Properties of Five Different Protein Hydrolysates Produced from Indian White Shrimp (Penaeus indicus) By-products**.** Journal of Comparative Pathobiology, 9 (1), 599-608 [In Persian].

Tang, C. H., Wang, X. S. & Yang, X. Q. (2009). Enzymatic Hydrolysis of Hemp (Cannabis sativa L.) Protein Isolate by Various Proteases and Antioxidant Properties of the Resulting Hydrolysates. Food Chemistry, 141, 1484–1490.

Turner, J. & Backman, P. (1991). Factors Relating to Peanut Yield Increases after Seed Treatment with Bacillus Subtilis. Plant Disease, **75**(4): 347-353.

Wieser, H. (2007). Chemistry of Gluten Proteins. Food Microbiology, 24(2), 115-119.

Woodroof, J. (1983). Peanut Butter. Peanuts: Production, Processing and Products, AVI Publishing co, Inc, 3rd edn, West port, Connecticut 127.

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 & Emerging Technologies, 10(2), 235-240.

An Investigation on the Effects of Hydrolysis Conditions on the Extraction of Antioxidant Peptides from Peanuts

H. Hajikazemi [a], M. Mirzaei [b*], S. Mirdamadi [c]

[a] M. Sc. Student of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant professor of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Professor of the Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

Received: 20 August 2018 Accepted: 2 January 2019

Abstract

Introduction: The use of protein hydrolysate containing antioxidant peptides in the formulation of functional food has been increasing recently. The types and sequences of amino acids, the type of hydrolyzing enzymes and hydrolysis progress have some important impacts on the properties of protein hydrolysate.

Materials and Methods: In this research, the effects of pepsin and alcalase enzymes (E/S:1/10) under optimal conditions of each ones, were investigated on the extraction of antioxidant peptides from peanuts protein. Peanut's oil was extracted using solvent extraction method and protein was precipitated at isoelectric point. The extracted protein was subjected to the pepsin and alcalase enzymes for maximum period of five hours. The progress of hydrolysis was considered every thirty-minutes using Ortho-Phthalaldehyde (OPA) method.

Results: The results indicated that the most hydrolysis occurs after 250 and 90 min of hydrolysis for pepsin and alcalase, respectively and the values of free amino acid groups increased from 167.0 to 263.0 μM leucin/mg protein (for alcalase) and from 415.0 to 517.0 μM leucin/mg protein (for pepsin). Moreover, the antioxidant activity of protein hydrolysate was investigated based on DPPH and ABTS radical scavenging activity. By increasing the degree of hydrolysis, the DPPH and ABTS radical scavenging activity increased simultaneously. The maximum values of DPPH and ABTS free radicals scavenging activity were measured respectively, 5175.0 and 756.0 mMTE/mg proteins (for pepsin) and 3644.0 and 1087.0 mMTE/mg proteins (for alcalase).

Conclusion: The results indicated that the progress of enzymatic hydrolysis of peanut protein by alcalase and pepsin enzymes leads to producing more antioxidant peptides and the final products obtained can be considered as a candidate for producing functional foods.

Keywords: *Alcalase, Antioxidant Activity, Enzymatic Hydrolysis, Peanut, Pepsin.*

* Corresponding Author: Mahtam86@gmail.com