ارزیابی خواص عملکردی پروتئین هیدرولیزشده دانه هندوانه(Citrullus lanatus) به وسیله آنزیم پپسین

احمد پدرام نیا[1] [*]، علی مرتضوی[1]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، امیرحسین الهامی راد[1]، محمد آرمین[3]

1- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار، ایران

2- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه گرگان.، گرگان، ایران

۳- گروه کشاورزی ، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی ، سبزوار، ایران

تاریخ دریافت: 1396/02/02 تاریخ پذیرش: 1396/07/18

چکیده

هدف ازانجام این پژوهش بررسی خواص عملکردی مربوط به تیمار بهینه هیدرولیزشده دانه هندوانه (Citrullus lanatus) با استفاده از آنزیم پپسین بود. دانه هندوانه محصولی سرشاراز چربی و پروتئین می‌باشد. هیدرولیز آنزیمی پروتئین های دانه هندوانه می‌تواند به بهبود خواص فیزیکوشیمایی، فراسودمندی و نیز بهبود خواص عملکردی آن منجرشود. در این تحقیق پس از بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی با کمک روش سطح پاسخ، خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده بهینه دانه هندوانه به وسیله آنزیم پپسین با غلظت 60 آنسون (بر کیلوگرم پروتئین) و زمان 60 دقیقه، در قالب طرح آماری کاملاً تصادفی و با استفاده از نرم افزارSAS مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، قدرت تولید کف و پایداری کف در pH=10 مشاهده شد. بیشترین پایداری در برابر حرارت در دمای 100درجه سانتی‌گراد و زمان 180 دقیقه و هم چنین بیشترین پایداری در برابر تغییرات pH در pH=3 مشاهده گردید.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده بهینه، دانه هندوانه، خواص عملکردی، آنزیم پپسین

[*] مسوول مکاتبات : ahmadpedram@yahoo.com

1-مقدمه

دانه هندوانه منبع بسیار غنی از چربی و پروتئین می‌باشد و به لحاظ غنی بودن از پروتئین می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئینی در فرمولاسیون انواع مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. پژوهش‌ها نشان داده است که پروتئین‌های دانه هندوانه قابلیت هضم آزمایشگاهی خوبی را به همراه کمترین فاکتورهای ضد تغذیه ای به نمایش گذاشته‌اند (9). هیدرولیز آنزیمی واجد ویژگی‌هایی می‌باشد که در آن شرایط واکنش به آسانی کنترل شده و کاهش عناصر مغذی در حین واکنش‌ها ناچیز است (3). هیدرولیز آنزیمی به صورت وسیع و به منظور بهبود خواص عملکردی پروتئین‌های غذایی مورد استفاده قرار گرفته است.برخی از پروتئین‌های هیدرولیز شده برخلاف پروتئین‌های خامی که دامنه حلالیت شان در نقطه pH ایزوالکتریک یا دمای بالاست، حلالیت بالایی در دامنه وسیعی از pH های مختلف را دارا می‌باشند. به علاوه پپتیدهای کوچک تولید شده ناشی از هیدرولیز آنزیمی قابلیت جذب بهتری در مقایسه با پروتئین‌های اولیه دارند (12). پپتیدهای زیست فعال قطعات پروتئینی ویژه‌ای هستند که در توالی اولیه پروتئین‌ها بصورت غیر فعال بیان شده‌اند اما بعد از آزاد شدن ممکن است عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی از خود بروز دهند. نوع پپتیدهای زیست فعال تولید شده از پروتئین‌های خاص به دو عامل توالی اولیه منبع پروتئین وآنزیم‌های ویژه به کار برده شده برای تولید پپتید بستگی دارد. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های گیاهی در راستای تولید انواع پپتیدهای فعال بیولوژیکی از قبیل کنترل فشار خون، اثرآنتی اکسیدانی، تقویت سیستم ایمنی بدن و یا اثر ضد میکروبی می‌باشد (16 و17). چندین عامل در تولید پپتیدهای زیست فعال نقش دارند که شامل زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز پروتئین‌ها، نسبت آنزیم به سوبسترا و پیش تیمار پروتئین قبل ازهیدرولیز می‌باشند (6). ویژگی‌های عملکردی یک ماده غذایی را می‌توان به عنوان نتیجه رفتارهای فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها در آن ماده در طول فرآیند، نگهداری و مصرف تعریف کرد (5). پروتئین‌ها علاوه بر خواص تغذیه‌ای نقش مهمی در فرآیند کردن و توسعه مواد غذایی دارند. این ترکیبات مسئول بروز بسیاری از ویژگی‌های عملکردی بوده و بنابراین تأثیر به سزایی بر نظر مصرف کننده در مورد ماده غذایی خواهند داشت (14). اهمیت ویژگی‌های عملکردی بسته به نوع محصولی که پروتئین در آن استفاده می‌شود متفاوت است. به منظور استفاده بهتر از پروتئین‌ها به عنوان اجزاء غذایی و به این علت که بیشتر پروتئین‌ها به صورت دست نخورده قادر به تأمین خواص مطلوب و مورد نظر صنعت نمی‌باشند بنابراین بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها ضروری به نظر می‌رسد(7). در سال‌های اخیر هیدرولیز آنزیمی به شکل گسترده‌ای برای بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها مانند امولسیون کنندگی و کف‌کنندگی، جذب آب و جذب روغن، ژل کنندگی و ... مورد استفاده قرار گرفته است (11). هیدرولیز آنزیمی با شکستن پیوندهای پپتیدی منجر به کاهش وزن مولکولی و تشدید ویژگی‌های عملکردی پپتیدهای تولیدی می‌گردد. هم چنین هیدرولیز آنزیمی به علت شکستن اتصال میان پروتئین‌ها با سایر اجزاء، منجر به آزادسازی پروتئین‌ها از ماتریکس گیاهی خواهد گردید (18). ویژگی‌های پروتئین‌های هیدرولیز شده به طور مستقیم بر خواص عملکردی پروتئین مؤثر است و با استفاده از هیدرولیز آنزیمی تحت شرایط کنترل شده بهبود می‌یابد. حلالیت بالای پروتئین‌های هیدرولیز شده نقش بسیار مهمی در بسیاری از کاربردهای این ترکیبات در مواد غذایی داشته و بر ویژگی‌های عملکردی مانند امولسیون کنندگی و کف کنندگی مؤثر است (9). در تحقیقی که توسط جامدار و همکاران (2010) در مورد تأثیر آنزیم آلکالاز بر خواص عملکردی هیدرولیز شده های ایزوله پروتئین نخود انجام گرفت، نشان داده شد که هیدرولیز در درجه هیدرولیز بیشتر از 10 درصد منجر به افزایش حلالیت ایزوله پروتئین به بیشتر از 80 درصد گردید. اگرچه ایزوله پروتئین نخود خواص عملکردی (امولسیون کنندگی و کف کنندگی)

بهتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده نشان داد (7). در مطالعه دیگری ضایعات (پوست و امعاء و احشاء) ده پا Sepia officinalis به منظور رسیدن به درجه هیدرولیز 5 ، 10 و 13/5درصد توسط پروتئاز بدست آمده از *باسیلوس لا یشنیفورمیس*، هیدرولیز شد. نتایج حاکی از افزایش قدرت امولسیون کنندگی در هیدرولیز شده‌های حاصل با پیشرفت هیدرولیز بود (2). خواص عملکردی هیدرولیز شده های ماهی گیش خط زرد (Selaroides leptolepis) تولید شده با آلکالاز و فلیورزایم توسط کلمپنگ و همکاران (2007) بررسی شد. طبق گزارشات، هیدرولیز با هر دو آنزیم منجر به افزایش حلالیت پروتئین به بیش از 85 درصد گردید. در حالی‌که با افزایش هیدرولیز ویژگی‌های بین سطحی هیدرولیز شده‌های حاصل (امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون، کف‌کنندگی و پایداری کف) کاهش یافت که احتمالا به دلیل کاهش در اندازه زنجیره پپتیدی بوده است(9). هیدرولیز محدود پروتئین‌ها به دلیل ایجاد تغییر در اندازه مولکولی و قدرت پیوندهای بین مولکولی و داخل مولکولی در پروتئین ممکن است در نهایت منجر به بهبود ویژگی های عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده گردد(12). با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون پژوهشی در زمینه هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه هندوانه و بررسی خواص عملکردی هیدرلیز بهینه شده آن صورت نگرفته است. هدف از این تحقیق بررسی خواص عملکردی مربوط به اثر آنزیم پپسین بر ایزوله پروتئین دانه هندوانه به‌عنوان هیدرولیز بهینه مورد بوده است.

2- مواد و روش‌ها

مغز دانه هندوانه گروه کلاله از " کارخانه مغز تخمه اخوان" تهیه گردید.آنزیم پپسین[1] (با فعالیت 250 آنسون بر میلی‌گرم) تهیه شده از نمایندگی شرکت سیگما آلدریچ در ایران تهیه گردید. اتانول، هگزان، سود و اسید کلریدریک از شرکت مرک و معرف 2و2 دی فنیل -1- پیکریل هیدرازیل[2] (DPPH)از شرکت سیگما تهیه گردید.

2-1- تهیه پروتئین هیدرولیز شده از مغز دانه هندوانه

مغز دانه هندوانه در بسته های پلاستیکی خریداری و در محیط خشک و خنک نگهداری گردید. سپس توسط آسیاب کنوود (مدل CG100، ساخت کشور انگلستان) کاملاً خرد شده و بصورت پودر درآمد و با افزودن هگزان به نسبت 10 به 1 (حجمی–وزنی) عمل استخراج روغن انجام شد. عمل روغن‌گیری تا کاهش روغن باقیمانده به زیر 1 درصد ادامه یافت. در ادامه حلال باقی مانده کنجاله به وسیله آون خلاء (مدل DIN EN6052IP20، ساخت کشور آلمان) و در دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت از آن جدا شد. کنجاله فاقد روغن سپس به نسبت 1 به 10(وزنی –حجمی) در آب مقطر پراکنده شد. به منظور باز شدن ساختمان پروتئین‌ها، pH محلول یاد شده با استفاده از pH متر HANA (مدل HI8520، ساخت کشور ژاپن) ابتدا با کمک سود 0/1 نرمال به 10 رسانده شد. در pH یاد شده و دمای آزمایشگاه محلول به مدت یک ساعت هم زده شد. محلول برای مدت 20 دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدلSIGMA4-16KC، ساخت کشور آلمان) با5000 دوردر دقیقه و دمای 4 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با حذف فاز رسوب و رساندن pH فاز محلول[3] با استفاده از اسید کلریدریک 0/1 نرمال به 5، مجدداً عمل سانتریفیوژ با دور 5000 و زمان 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تکرار شد.فاز رسوب حاصل جمع آوری و با استفاده از آون تحت خلاء (مدل DIN EN6052IP20، ساخت کشور آلمان) و در دمای 45 درجه سانتی‌گراد در زمان 4 تا 5 ساعت خشک گردید. ایزوله پروتئین خشک شده در ظرف درب دار جمع آوری و در محیط خشک و خنک

1-Pepsin

2-2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

3- Supernatant

نگهداری گردید. سپس با تهیه محلول از پروتئین ایزوله شده با نسبت 50 گرم ایزوله پروتئینی در 1000 میلی لیتر از بافرفسفات با pH=2 به منظور تثبیت pH، شرایط بهینه فعالیت آنزیم پپسین در غلظت 60 آنسون بر کیلوگرم ، آنزیم زنی انجام و زمان 60 دقیقه لحاظ گردید. در پایان مرحله آنزیم زنی و به منظور غیر فعال کردن آنزیم، نمونه تلقیح شده با آنزیم در دمای 85 درجه سانتی‌گراد و برای مدت زمان 15 دقیقه قرار داده شد. در ادامه نمونه در سانتریفیوژ یخچال دار با دور 5000 و در دمای 4 درجه سانتی‌گراد و برای مدت زمان 20 دقیقه قرار داده شد و محلول رویی که حاوی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود جهت انجام آزمایشات جمع‌آوری گردید (17). سپس خصوصیات عملکردی تیمار هیدرولیز شده بهینه (آنزیم پپسن با غلظت 60 آنسون و زمان 60 دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت.

2-2- اندازه‌گیری خصوصیات عملکردی هیدرولیزات بهینه

2-2-1- اندازه گیری قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون

قدرت امولسیون کنندگی تیمار بهینه با استفاده از روش پیرس و کینسلا (1987) اندازه گیری شد (15). برای این منظور 10 سی سی روغن گیاهی با 30 سی سی محلول1 درصد از پروتئین هیدرولیز شده بهینه مخلوط شده و با کمک محلول سود 0/1 نرمال و در ظروف جداگانه به pH 4، 6، 8 و 10 رسانده شد. سپس مخلوط به مدت 1 دقیقه بوسیله هموژنایزر با سرعت 14000 دور بر دقیقه هموژن شد. 50 میکرولیتر از امولسیون تولید شده از ته ظرف با 6 سی سی محلول سدیم دودسیل سولفات 0/1 درصد مخلوط شده و جذب بلافاصله و 10 دقیقه پس از تشکیل امولسیون در طول موج 500 نانومتر اندازه‌گیری شد. قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون با استفاده از روابط 1 و 2 محاسبه شد:

رابطه (1)

$$\text{قدرت امولسیون کنندگی} = \frac{A \times 2.303 \times 2}{F \times Wp}$$

A: جذب در دقیقه صفر (بلافاصله پس از افزودن SDS)

F: حجم جزء روغن

Wp: وزن پروتئین

رابطه(2)

$$\text{پایداری امولسیون کنندگی} = \frac{A \times 100}{A - At}$$

At: جذب در دقیقه10

2-2-2-اندازه‌گیری ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف

کف کنندگی تیمار بهینه با استفاده از روش پیرس و کینسلا (1987) اندازه گیری شد (14). برای این منظور 20 میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز بهینه 0/5 درصد به pH های 4، 6، 8 و 10 رسانده شده و به مدت 1 دقیقه بوسیله هموژنایزر با سرعت 14000 دور بر دقیقه هموژن گردید. نمونه زده شده بلافاصله به استوانه مدرج 100 سی سی منتقل شده و حجم کل پس از 30 ثانیه و 60 دقیقه و در دمای اتاق اندازه گیری و ظرفیت کف کنندگی از رابطه 3 محاسبه شد:

رابطه (3)

$$\text{ظرفیت کف کنندگی} = \frac{A_0 - B}{B} \times 100$$

A_0: حجم نمونه بلافاصله پس از زده شدن

B: حجم نمونه قبل از زده شدن

پایداری کف از رابطه4 محاسبه شد:

رابطه(4)

$$\text{پایداری کف (درصد)} = \frac{A}{B} \times 100$$

A: حجم نهایی کف پس از 60 دقیقه

A_0: حجم کف بلافاصله پس از زده شدن

2-2-3- پایداری در برابر دما

برای بررسی مقاومت دمایی پپتیدها، 5 میلی‌لیتر از نمونه هیدرولیزشده بهینه که pH آن به 7 رسانده شده بود به لوله‌های شیشه‌ای منتقل و پس از بستن درب، به مدت 0، 15، 30، 60، 90، 120 و 180 دقیقه در حمام آب 100 درجه قرار گرفتند. نمونه‌های تیمار شده به صورت ناگهانی در آب یخ سرد فرو برده شدند و در نهایت فعالیت ضد اکسایش با استفاده از روش ظرفیت ضد اکسایش کل بررسی شد. از نمونه‌ای که در بن ماری قرار داده نشد (دمای 25 درجه سانتی‌گراد) به عنوان کنترل استفاده شد (13).

2-2-4- پایداری در برابر تغییرات pH

به منظور بررسی پایداری در برابر تغییرات pH پپتیدها، 6 میلی‌لیتر از نمونه هیدرولیز بهینه با استفاده از سود و اسید کلریدریک 1 مولار در معرض pHهای مختلف 1 تا11 قرار گرفته و به مدت 2 ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. سپس pH نمونه به 2 رسانده شد و فعالیت ضداکسایش با استفاده از روش ظرفیت ضداکسایش کل بررسی شد (13).

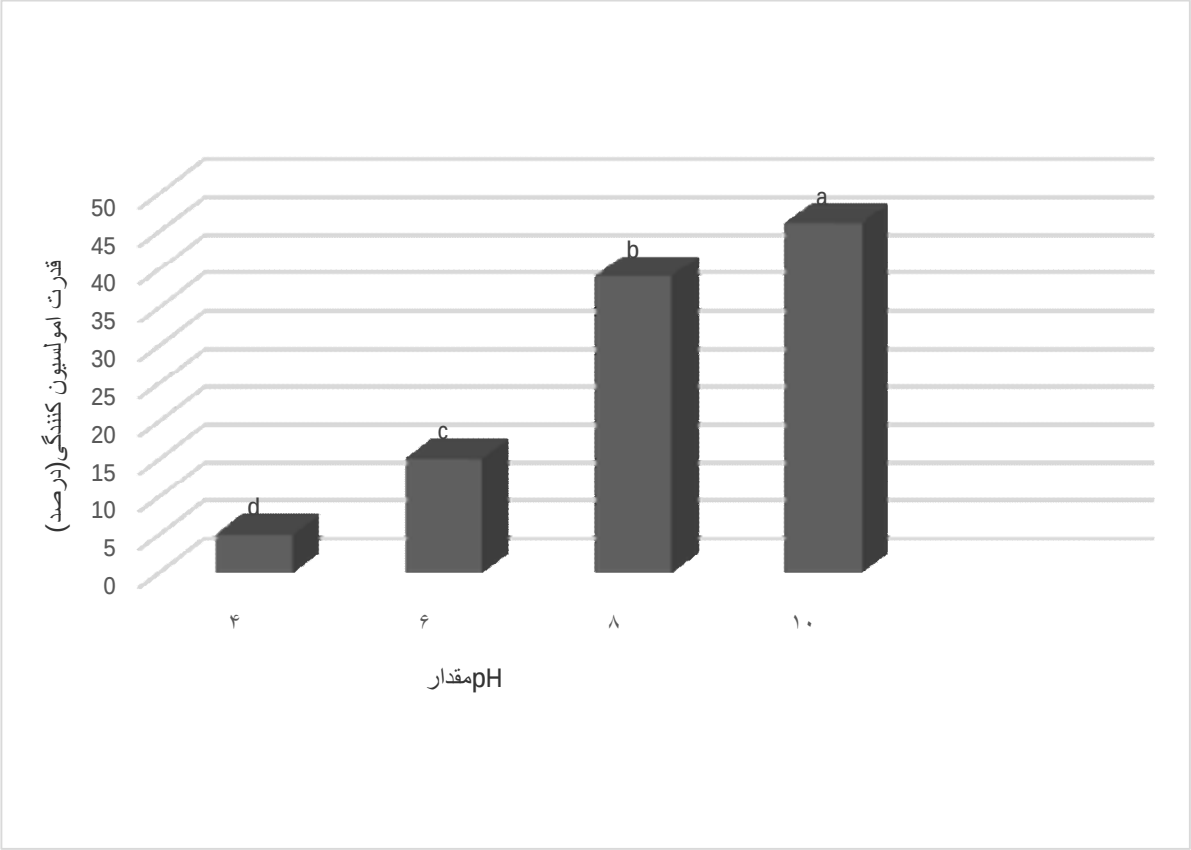
2-3- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بررسی اثر pH بر قدرت امولسیون کنندگی و نیز پایداری امولسیون، قدرت تولید کف و پایداری کف (تیمارهای pHهای 4، 6، 8 و 10) پایداری در مقابل حرارت (دمای جوش و زمان‌های 10 تا 120 دقیقه با فواصل 15 دقیقه) و هم چنین پایداری در برابر تغییرات pH (pH بین 1 تا 11) هیدرولیزات بهینه دانه هندوانه تولید شده توسط آنزیم پپسین، در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تجزیه داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SAS و مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از روش دانکن و در سطح آماری 5 درصد انجام شد.

3- نتایج و بحث

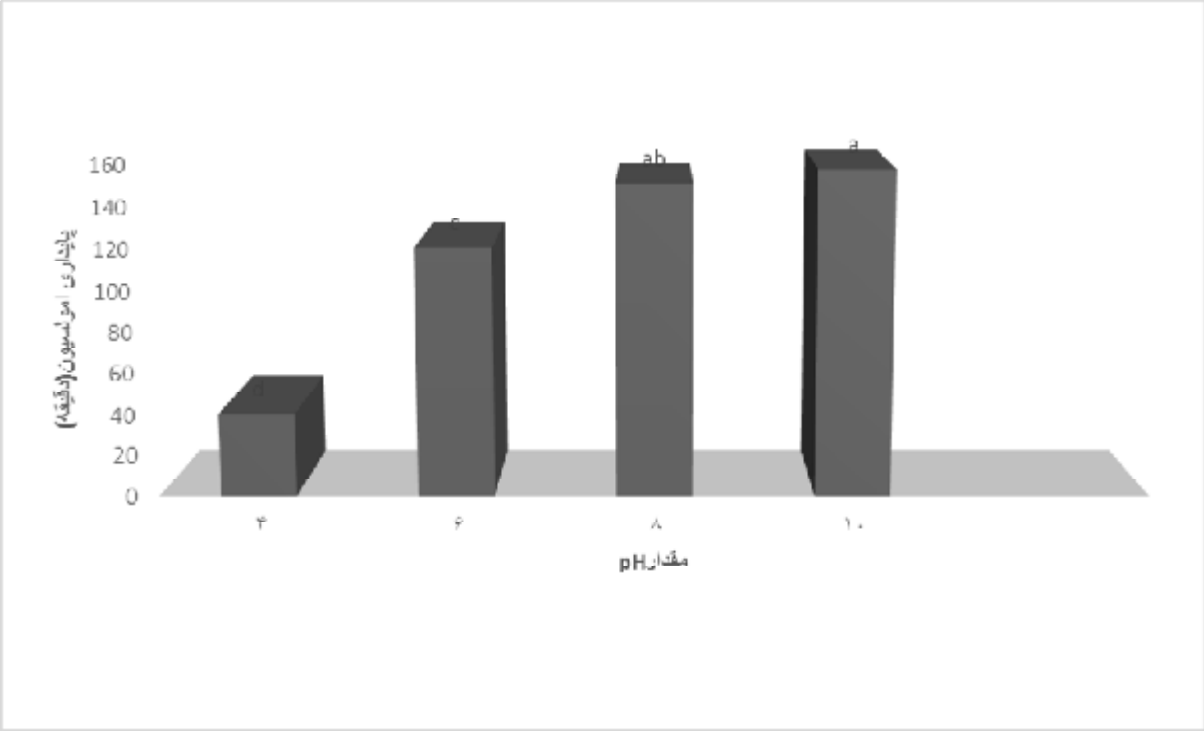
3-1- بررسی فعالیت امولسیون کنندگی

تغییر در pH اثر معنی‌داری برفعالیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون داشت ($p<0/05$). همان‌گونه که در شکل‌های 1 و 2 نشان داده شده است، عمل هیدرولیز اثر مثبتی بر امولسیون کنندگی داشت. در مقایسه pH های مختلف pH=10 بیشترین فعالیت امولسیون کنندگی را دارا بود. کمترین میزان امولسیون کنندگی در دامنه pH 4 تا 6 مشاهده شد که در واقع دامنه pH ایزوالکتریک هیدرولیزات بهینه می‌باشد. مکانیزم امولسیون کنندگی ترکیبات پپتیدی بر اساس جذب پپتیدها بر سطح قطرات روغن، پوشش دادن قطرات روغن و ممانعت از اتصال مجدد این ذرات پس از هموژنیزاسیون تعریف می‌شود (9). قدرت امولسیون کنندگی در ارتباط با حلالیت، درجه آب گریز بودن و وزن مولکولی پپتیدها می‌باشد. پپتیدهای حاوی اسیدهای آمینه آب گریز با زنجیره طویل‌تر و حلالیت بیشتر، قدرت امولسیون کنندگی بالاتری دارند (9). زمانی که هیدرولیز رخ دهد، افزایش در حلالیت پپتیدها و مهاجرت آن‌ها به فضای میان آب و روغن اتفاق خواهد افتاد (12 و19). به علاوه هیدرولیز شده‌های پروتئینی می‌توانند به عنوان ترکیبات فعال سطحی در نظر گرفته شوند. زیرا این ترکیبات حاوی اسیدهای آمینه آب دوست و آب گریز می‌باشند که برای اعمال خواص سطحی ضروری هستند می‌باشند (9). برقراری یک تعادل میان قسمت‌های آب گریز و آب دوست در پپتیدها نهایتاً منجر به افزایش درقدرت امولسیون کنندگی آن‌ها خواهد شد (12).



شکل1- فعالیت امولسیون کنندگی هیدرولیزات بهینه

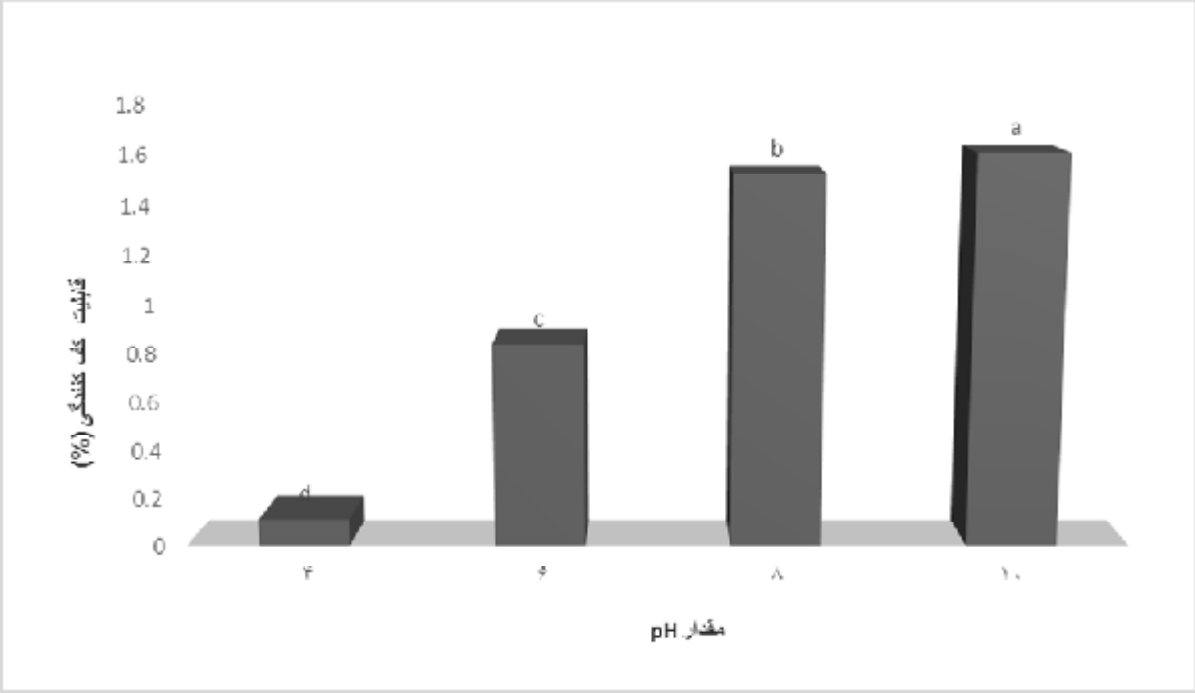
پایداری امولسیون با افزایش pH پایداری امولسیون افزایش یافت. بیشترین میزان پایداری امولسیون در pH=10 و کمترین آن در pH=4 مشاهده شد. گزارش شده است که هیدرولیز گسترده منجر به کاهش در پایداری امولسیون‌های تولیدی توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده خواهد شد (1و9). پروتئین‌های هیدرولیز شده ممکن است قادر به ایجاد امولسیون باشند، اما به دلیل اندازه کوچک، نمی‌توان این ترکیبات را به عنوان پایدارکننده‌های امولسیون مناسبی در نظر گرفت (9). از طریق هیدرولیز دو مرحله‌ای پروتئین زنجفیل توسط پپسین و تریپسین در زمان‌های هیدرولیز متفاوت (180-5 دقیقه)، آمزا و همکاران (2013) دریافتند که امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون با افزایش زمان هیدرولیز کاهش یافت (1). این محققین گزارش کردند که پپتیدهای با وزن مولکولی پائین به قدر کافی برای بروز خواص سطحی آمفی فیل نیستند. در مطالعه‌ای توسط لی وهمکاران (2007) بر پروتئین سبوس برنج هیدرولیز شده توسط تریپسین افزایش قدرت امولسیون کنندگی در پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با نمونه دست نخورده مشاهده شد که مشابه با یافته‌های این تحقیق بود (11).



شکل2- پایداری امولسیون هیدرولیزات بهینه

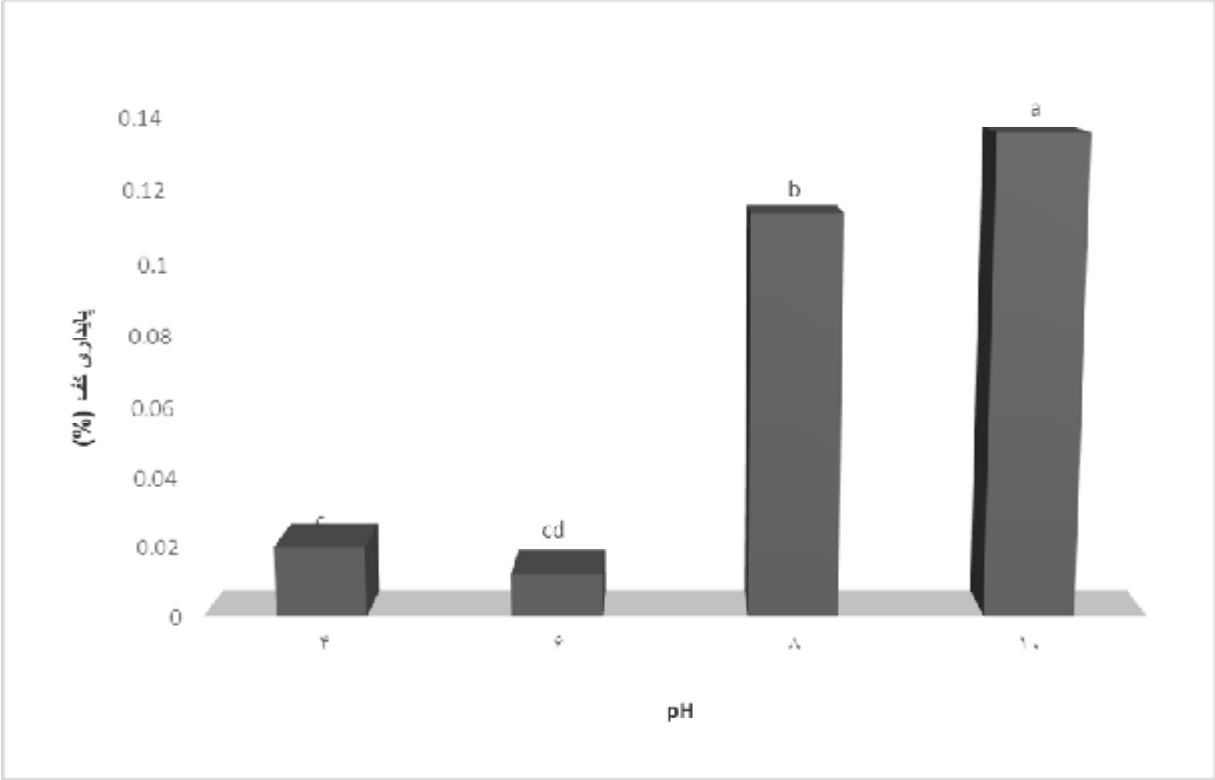
3-2- بررسی فعالیت کف کنندگی

تغییرات در pH اثر معنی داری بر توانایی تولید و هم چنین پایداری کف داشت ($p<0/05$). همانگونه که در شکل‌های 4و5 نشان داده شده است، بیشترین مقدار ظرفیت کف کنندگی مربوط به pH=10 بود و کمترین میزان در pH=4 مشاهده شد. در زمان تولید کف، پروتئین‌ها بایستی به راحتی در آب پخش شده و به سرعت به مرز میان آب و هوا مهاجرت نموده و ساختمان آن‌ها برای ایجاد یک لایه اطراف حباب‌های گاز/هوا به سهولت باز شود (19). انعطاف پذیری پروتئین، وجود اسیدهای آمینه آبگریز و کاهش کشش سطحی از عوامل دخیل در بروز ویژگی‌های کف کنندگی هستند (9).



شکل 3- قابلیت کف کنندگی هیدرولیزات بهینه

بالاترین میزان پایداری کف در pH=10 و کمترین آن در pH=4 مشاهده شد. هیدرولیزات بهینه دارای بیشترین پایداری کف در pH=10 بود. کمترین پایداری در pH=6 مشاهده شد. میان پایداری کف در pH=4 و pH=6 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. این موضوع می تواند به این صورت توجیه شود که پپتیدهای تولید شده در pH=6 که نقطه ایزوالکتریک بوده، دارای کمترین حلالیت بوده و در نتیجه امکان حرکت در داخل فاز مایع و قرار گرفتن در سطح مشترک مایع-گاز پایین بوده و در نتیجه امکان ایجاد کف و نیز پایداری آن کاهش یافت. کلمپنگ و همکاران (2007) تأثیر هیدرولیز آنزیمی ماهی گیش خط زرد را توسط آلکالاز و فلیورزایم در درجات هیدرولیز مختلف (5، 15 و 25 درصد) مطالعه کرده و گزارش دادند که کف کنندگی و پایداری کف با افزایش درجه هیدرولیز کاهش یافت. این محققین اعلام کردند که ویژگی های عملکردی پروتئین های هیدرولیز شده تحت تأثیر آنزیم مورد استفاده و درجه هیدرولیز قرار می‌گیرد(9). نتایج مشابه توسط میدت و همکاران (2011) در مورد تأثیر آلکالاز قلیائی Bacillus mojavensis بر قدرت کف کنندگی پروتئین ده پا (Sepia officinalis) در درجات هیدرولیز مختلف (7/3%، 11/2% ، 14% ، 16% و 18/8%) گزارش شد. کمترین قدرت کف کنندگی در pH=6 با حلالیت اندک در نزدیکی pH ایزوالکتریک مربوط بود (5). نصری و همکاران (2007) طی آزمون‌های انجام شده در مورد کنسانتره پروتئینی شنبلیله به این نتایج دست یافتند که کمترین میزان کف کنندگی در pH ایزوالکتریک مشاهده شد و دلیل این امر را فشرده تر بودن پروتئین در این pH نسبت به سایر pH ها دانستند(13).

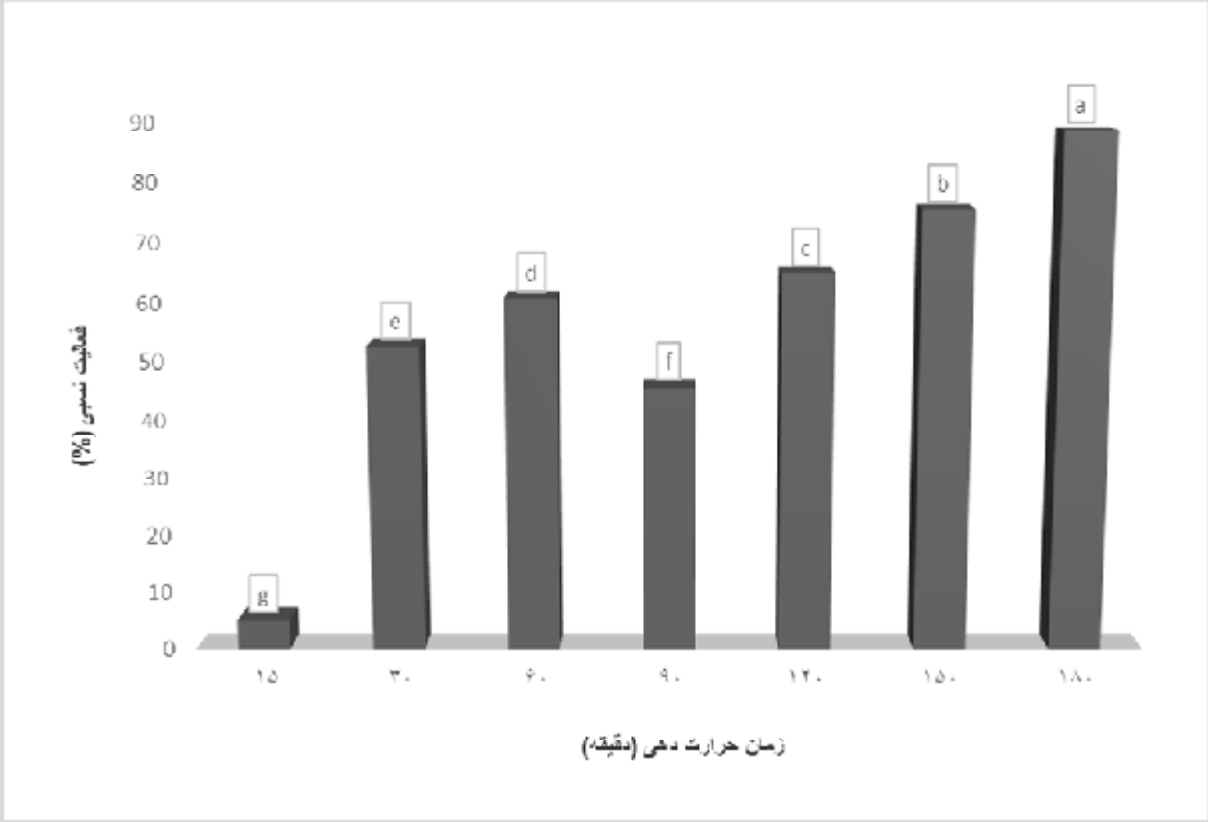


شکل4- پایداری کف هیدرولیزات بهینه

3-3- بررسی پایداری در برابر دما

تغییرات قدرت ضداکسایش نمونه هیدرولیزات بهینه که به مدت 15، 30، 60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه در دمای 100 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود در شکل 6 نشان داده شده است. تغییرات قدرت ضداکسایشی در برابر دمای 100 درجه سانتی‌گراد و زمان های 15 تا 180 دقیقه نشان داد که اثر دمای100 درجه سانتی گراد بر پایداری حرارتی هیدرولیزات معنی دار بود ($p<0/05$). این موضوع نشان دهنده این است که قدرت ضداکسایش پپتیدها با افزایش زمان روند افزایشی داشت. افزایش قدرت ضداکسایش برخی از تیمارها می تواند به دلیل تجزیه یا تجمع پپتیدهای ضداکسایش در اثر اعمال حرارت باشد.

به طور کلی پروتئین‌ها نسبت به حرارت حساس هستند و این امر منجر به تجمع پروتئین ها خواهد گردید. با این وجود گزارش شده است که پپتیدهای با اندازه کوچکتر نسبت به تجمع در دمای بالا مقاوم هستند .با توجه به اینکه این مقاومت در نمونه مورد بررسی نیز مشاهده شد، می‌توان از این پپتیدها در سیستم های غذایی که تحت فرآیند حرارتی قرار می گیرند بدون تغییر محسوس در قدرت ضداکسایش آنها استفاده کرد. نتایج بدست آمده در مورد مقاومت پپتیدها در برابر دمای بالا با نتایج گزارش شده توسط نالینانون و همکاران (2011) در مورد هیدرولیز ماهی (Nemipterus hexodon) توسط آنزیم پپسین مطابقت نداشت(12).

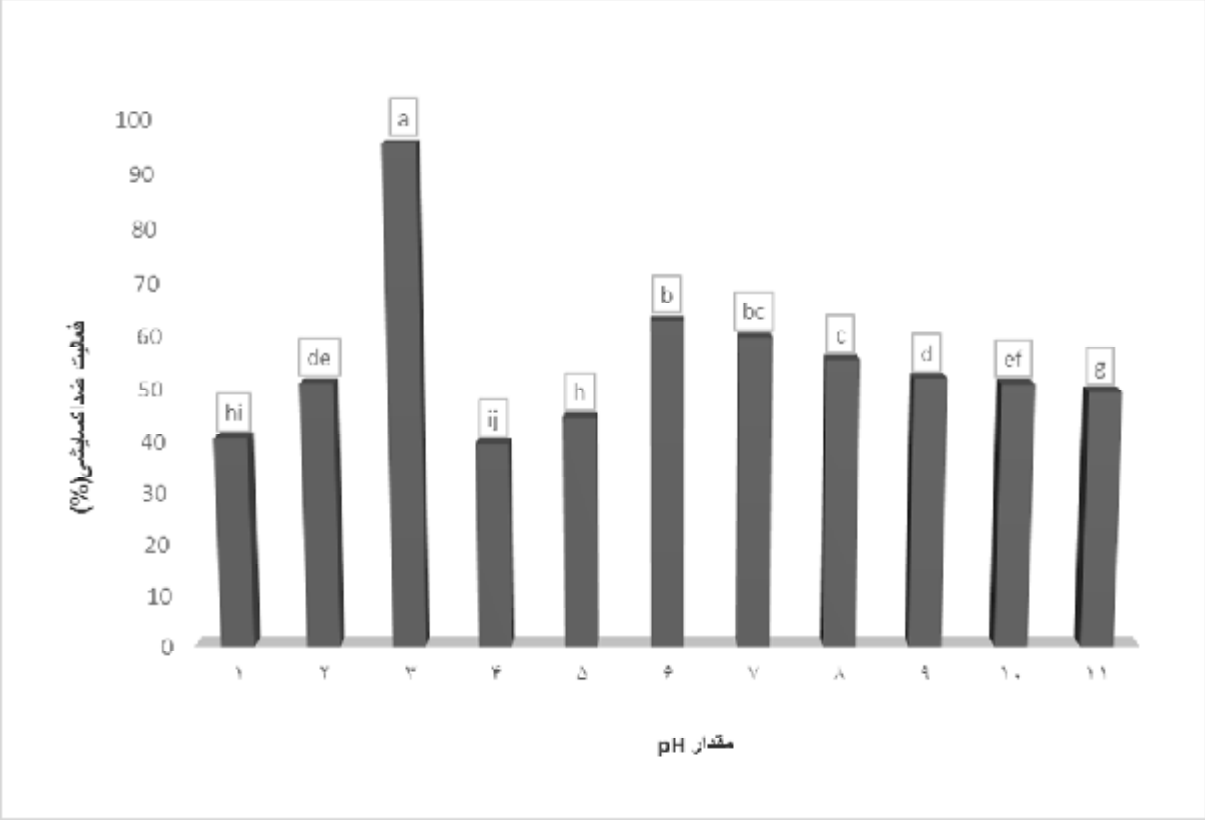


شکل5- پایداری هیدرولیزات بهینهدر برابر دمای100 درجه سانتی‌گراد و زمان‌های مختلف

3-4- بررسی پایداری در برابر تغییرات pH

تغییرات قدرت ضداکسایشی هیدرولیزات بهینه توسط پپسین در pH های مختلف در شکل6نشان داده شده است. برای بررسی مقاومت پروتئین هیدرولیز شده به pH، هیدرولیزات بهینه به pHهای مختلف در دامنه 1 تا 11 رسانده شد و سپس میزان فعالیت ضد اکسایش هیدرولیزات بهینه در این pHهااندازه گیری شد. تفاوت معنی داری میان فعالیت ضداکسایش هیدرولیزات بهینه در pH های مختلف مشاهده شد ($p<0/05$). بیشترین قدرت ضد اکسایش در pH=3 و کمترین مقدار آن در pH=4 مشاهده شد. اما تفاوت معنی داری بین فعالیت ضداکسایش هیدرولیزات بهینه در pH=4 و pH=1 مشاهده نشد. پروتئین‌ها از ترکیبات حساس به تغییر pHبوده و از میزان فعالیت این ترکیبات در pH های بسیار بالا یا پایین کاسته شده و ممکن است دچار تغییر حالت یا غیر فعال شدن دائمی شوند. با توجه به این موضوع که ماهیت پروتئینی پپتیدها می‌توان کاهش نسبی در پایداری پپتیدها با کاهش یا افزایش شدید در pH را با تجمع زیاد بارهای همنام در این محدوده از pH و تاثیر این تجمع بار بر ساختمان پپتید مرتبط دانست. با این وجود باید به این نکته اشاره کرد که حتی در pH بسیار پائین مانند 1 و 2 یا pH بالا مانند 11 نیز نمونه پپتیدی تقریبا 80-70% فعالیت خود را حفظ کرده و تنها بخشی از فعالیت ضد اکسایش خود را از دست داد. با توجه به نتایج بدست آمده، از نمونه هیدرولیز شده بهینه می‌توان به عنوان یک ترکیب ضد اکسایش در مواد غذایی با pH اسیدی تا خنثی استفاده کرد. در این محدوده pH (یعنی دامنه 3 تا 6) نمونه هیدرولیز شده بهینه قادر بود بیشترین قدرت ضد اکسایش خود را بروز دهد. کاهش معنی‌داری در قدرت ضد اکسایش نمونه بهینه هیدرولیز شده در pHهای اسیدی قوی

(pH=1 و pH=2) و قلیایی قوی (دامنه pH=9 تا pH=11) مشاهده شد. نالینون و همکاران (2011) با بررسی مقاومت به pH در پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی ماهیچه ماهی (Nemipterus hexodon) با استفاده از آنزیم پپسین گزارش دادند که قدرت مهار رادیکال در پپتیدهای ضد اکسایش در محدوده pH های1 تا 10 ثابت بود، در حالی که این ویژگی در pH=11 اندکی کاهش یافت. به عقیده این محققین پپتیدهای ضد اکسایش ممکن است بخشی از فعالیت خود را در pH بالا از دست بدهند(12).



شکل6- پایداری هیدرولیزات بهینه در برابر تغییرات pH

4- نتیجه‌گیری

با توجه به بررسی خصوصیات عملکردی هیدرولیز شده بهینه پروتئین دانه هندوانه به وسیله آنزیم پپسین مشاهده می‌ود که با افزایش pH قدرت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون و هم چنین قدرت کف کنندگی و پایداری کف افزایش می‌یابد. کمترین مقادیر هریک از پارامترهای یاد شده در pH=4 تا pH=6 که حدود pHایزوالکتریک پروتئین‌ها می باشد مشاهده گردید. بررسی پایداری در برابر حرارت نشان داد که قدرت ضد اکسایشی با افزایش زمان روند افزایشی داشت. پایداری در برابر تغییرات pH هم نشان داد که بیشترین قدرت ضداکسایشی در pH=3 و کمترین آن در pH=4 بود.

5-منابع

1. Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, and L. Zhou, H. M. 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidantproperties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. International Food Research Journal,20: 2081-2090.

2. Balti, R., Bougatef, A., El-Hadj, N., Dorra Zekri, A., Barkia, and A. Nasri, M. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme -inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (Sepia officinalis) by-products. Journal of the Science of Food and Agriculture 90: 2006-2014.
3. Feng, J. and Xiong, Y.L. 2003. Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzymehydrolyzed soy proteins. J. Food Sci., 68(3): 803-809.
4. Guang, C. and Phillips R.D. 2009. Plant food-derived angiotensin I converting enzyme peptides. J. agric. food chem. 57: 5113-5120.17.
5. Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A. and Nasri, M. 2011. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. Food Research International, 44: 2703-2711.
6. Inouye, K., Nakano, K., Asaoka, K. and Yasukawa, K. 2009. Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. J agric. food chem. 57:717–23.
7. Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry, 121:178-184.
8. King, R. D. and Onuora, O. J. 1983. Aspects of melon seed protein characteristics Food Chemistry, 14, 65e77.
9. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry,102:1317-1327.
10. Lee, J. E., Bae, I. Y., Lee, H. G. and Yang, C. B. 2006. Tyr-Pro-Lys, an inhibitory peptide derived from broccoli (Brassica oleracea Italica). Food Chemistry,99: 143-148.
11. Li, G. H., Qu, M. R., Wan, J. Z. and You, J. M. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition, 16: 275-280.
12. Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and 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.
13. Nasri, N. A. and Tinay, A. H. E. 2007. Functional properties of fenugreek (Trigonella foenum greacum) protein concentrate. Food chemistry, 103: 582-589.
14. Ogunwolu, S.O., Henshaw, O.F., Mock, H.P. and Santros, A. 2009. Functional properties of protein concentrates and isolates produced from cashew (Anacardium occidentale L.) nut. Food Chemistry,115: 852-658.
15. Pearce, K. N. and Kinsella, E. J. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 26: 716-723.
16. Pihlanto, A. and Korhonen H. 2003. Bioactive peptides and proteins. Adv. food res. 47: 175-276.
17. Pihlanto-Leppälä, A. 2001. Bioactive peptides from bovine whey proteins : Opoid and ACE inhibitory peptides. Trends Food Sci Technol. **11**, 347–356.
18. Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z. and Jiang, Y. 2011. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. Food Chemistry 124: 551-555.

19. Zhang, H.J., Zhang, H., Wang, L. and Guo, X.N. 2012. Preparation and functional properties of rice bran proteins from heat-stabilized defatted