(مقاله پژوهشی)

اثر نوع آنزیم و زمان فرآیند بر ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از کنجاله روغن‌گیری شده زیره سیاه (*BuniumpersicumBioss.*)

زهرا شاهی[۱]، سیده زهرا سید النگی[۲*]، لیلا نجفیان[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

۲-.دانشیار، گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران..

۳-. استادیار، گروه علوم وصنایع غذایی، واحد ساری،دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۶/۰۷ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۰۸

چکیده

امروزه با افزایش مشکلات جدی پیش روی بشر نظیر انواع بیماری‌های قلبی- عروقی محققین به ارتباط هر چه بیشتر و نزدیک‌تر بین غذا و سلامتی پی برده‌اند. از این‌رو، تحقیقات گسترده‌ای در خصوص غنی‌سازی محصولات غذایی و نوشیدنی‌ها با انواع ترکیبات سلامتی بخش (نظیر انواع مواد غذا-دارو) و تولید غذاهای فراسودمند صورت گرفته است. هدف از این پژوهش، بررسی اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پانکراتین بر ویژگی‌های عملکردی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله روغن‌گیری شده زیره سیاه بود.فرآیند هیدرولیز با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در نسبت آنزیم به سوبسترای (۲ درصد وزنی/وزنی) در زمان‌های مختلف (۲۴۰-۴۰دقیقه) انجام شد. حلالیت پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل ازکنجاله روغن‌گیری شده زیره سیاه در شرایط اسیدی (pH=۴-۵) تنها پس از ۴۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی از حدود ۲۰ درصد به بیش از ۶۰ درصد افزایش یافت.به طور کلی، با افزایش زمان و درجه هیدرولیز، حلالیت هیدرولیزشده‌ها در هر دو آنزیم در نقطه ایزوالکتریک پروتئین به شکل قابل توجهی افزایش یافت. به طوری‌که، با افزایش درجه هیدرولیز، حساسیت به pH کم و حلالیت در محدوده وسیعی از pH حفظ شد. شاخص امولسیون کنندگی و پایداری آن پس از ۴۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله روغن‌گیری‌شده زیره سیاه با پانکراتین و آلکالاز در pH اسیدی به حداکثر خود رسید. با در نظرگرفتن ویژگی‌های عملکردی ارزیابی شده مانند امولسیون کنندگی و کف کنندگی پروتئین‌ها، نتایج نشان دادند که پروتئین‌های هیدرولیزشده به مدت ۴۰ دقیقه با آلکالاز از ویژگیهای عملکردی بهتری نسبت به سایر تیمارها برخوردار بودند.

واژه‌های کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، ویژگی‌های عملکردی، زیره سیاه، پانکراتین، آلکالاز..

*مسئول مکاتبات: zalangi@gmail.com

۱-مقدمه

یکی از این منابع تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، پروتئین‌ها هستند. در گذشته، پروتئین‌ها، تنها به‌عنوان منبع تأمین انرژی واسیدهای‌آمینه ضروری مورد نیاز برای رشد و تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی بدن در نظر گرفته می‌شدند. افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در ارتباط بین سلامت و رژیم‌غذایی منجر به افزایش تقاضا برای غذاهای فراسودمند شده است. بنابراین در سال‌های اخیر مطالعات پژوهشگران در جهت شناسایی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع گیاهی و حیوانی سوق پیدا کرده است. این پپتیدها، بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می‌شوندکه دارای۲۰-۲ اسیدهای آمینه بوده و جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد. همچنین، بر حسب نوع و توالی‌اسیدهای‌آمینه، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند.از جمله این تأثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی، آرام بخشی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشار خون و ضد سرطان اشاره نمود (۱۸). پروتئین‌ها به‌عنوان منبع تامین انرژی و اسیدهای‌آمینه ضروری برای رشد و حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی انسان شناخته می‌شوند. اخیرا، پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع حیوانی وگیاهی مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند. این ترکیبات، بخش‌های پروتئینی ویژه‌ای هستند که درون توالی پروتئین اولیه، غیرفعال می‌باشند. فعالیت زیست پپتیدی آن‌ها نیز تحت تأثیر ترکیب و توالی آمینواسیدی آن‌ها قرار می‌گیرد (۷،۱۵). پپتیدهای آنتی‌اکسیدان[1] ترکیباتی سلامتی بخش، ایمن، با وزن مولکولی کم، هزینه اندک، فعالیت بالا و جذب آسان هستند. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده بسته به نوع و ترکیب پروتئین اولیه، آنزیم مورد استفاده، درجه هیدرولیز و شرایط فرآیند متفاوت است (۱۹). کارایی پپتیدها در ممانعت از واکنش‌های مخرب در طول اکسیداسیون لیپیدها به وجود اسید آمینه‌های مشخص در آن‌ها بستگی دارد. از جمله مهم‌ترین اسیدهای آمینه‌می‌توان به تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و متیونین اشاره کرد. این اسیدهای آمینه می‌توانند با شلاته-کردن یون‌های فلزی که موجب تشدید واکنش‌های اکسیداسیون می‌شوند، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در محصولات غذایی مختلف و امولسیون‌ها عمل کنند. روش‌های مختلفی برای ارزیابی ویژگی‌های‌آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده وجود دارند (۱۱) که از جمله این روش‌ها می‌توان به اثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستم‌های امولسیونی، لیپوزومی، سیستم‌های مدل محصولات گوشتی و غذاهای مختلف با اندازه‌گیری مقدار پراکسید، ترکیبات واکنش‌پذیر تیوباربیتوریک اسید، مهار رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل، DPPH، ABTS و شلاته‌کنندگی فلزات اشاره کرد (۹،۱۵،۱۸). امروزه استفاده از ضایعات فرآوری محصولات غذایی با دارا بودن انواع ترکیبات سلامتی بخش و فراسودمند افزایش چشمگیری پیدا کرده است. یکی از این منابع، محصولات و ضایعات حاصل از روغن‌کشی دانه‌های گیاهی می‌باشد. اغلب تفاله‌های حاصل از روغن‌کشی دور ریخته‌شده و یا به مصرف دام می‌رسند، در حالی که منبع بسیار مفیدی از پروتئین هستند. در این راستا آبیران و همکاران (۲۰۱۶)، بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی اوواموسین[2] بر ویژگی‌های عملکردی و ساختاری پپتیدهای حاصل را انجام دادند و بیان داشتند که تعداد و اندازه پپتیدها، ارتباط نزدیکی با ویژگی‌های عملکردی هیدرولیزشده‌ها دارند. همچنین، با در نظرگرفتن زمان، هزینه و فعالیت هیدرولیزشده‌ها، هیدرولیز اوواموسین در شرایط قلیایی بهترین تیمار برای تولید پپتیدهای با ویژگی‌های عملکردی محسوب می‌شود (۱). نالینانون و همکاران (۲۰۱۱) نیز ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های عضله نوعی ماهی[3] هیدرولیز شده با پپسین را بررسی کردند و به این نتیجه دست یافتند که در مقایسه با کازئین، فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH کازئین هیدرولیز شده بین ۷ تا ۹ برابر افزایش یافت.

1- Antioxidative Peptides

2- Ovomucin

3- Ornate Threadfin Bream

همچنین، قابلیت مهار رادیکال ABTS در نمونه‌های پلاستئین تا حدود دو برابر بهبود یافت (۱۳). جامدار و همکاران (۲۰۱۰)، ویژگی‌های عملکردی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی فشار خون را در ایزوله و پروتئین‌های هیدرولیزشده بادام زمینی با آنزیم آلکالاز، مطالعه نمودندو اظهار داشتند که با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال آزاد DPPH و آنزیم مبدل آنژیوتنسین افزایش یافت. در حالی‌که، قدرت احیاءکنندگی کاهش پیدا کرد (۱۱). زیره سیاه (*Buniumpersicum* Bioss.) از قدیم یکی از کاربردی‌ترین دانه‌های دارویی به شمار می‌رفته است .پروتئین‌های موجود در دانه زیره سیاه به همراه سایر ترکیبات نقش موثری در حفاظت پوست در برابر رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. از نظر ترکیبات شیمیایی در ترکیب زیره سیاه مقدار قابل ملاحظه‌ای مواد پروتئینی موجود است (۳). زیره سیاه ۵-۴ درصد اسانس روغنی فرار دارد که در آن ۶۵-۴۵ درصد کاروون[1] یافت می‌شود. به علاوه در اسانس زیره سیاه مخلوطی از کتون،کاروون، یک‌ترپن و مقدار کمی کارواکرول وجود دارد. در بررسی‌ها آمده است که درزیره سیاه که در لهستان کاشته شده در حدود ۱۰/۳-۵/۸ درصد اسانس وجود داشته است (اثر اقلیم خاص کاشت) و در ترکیب میوه گیاه به طور کلی در حدود ۷/۴۹-۶/۷۰درصد خاکستر و ۵/۸۵-۴/۱۰ درصد اسانس و ۲۲/۱۴-۹/۹۵ درصد روغن چرب و ۲۱/۳-۱۸/۹درصد مواد ازته پروتئینی مشخص شده و مقدار کاروون موجود در اسانس آن ۵۸/۹-۵۶ درصد است (۱۷).اسانس زیره سیاه از طریق تقطیر زیرهخرد شده با بخار آب گرفته می شودو تفاله زیره که پس از گرفتن اسانس آن باقی می‌ماند از نظر پروتئین بسیار غنی است (۳).با توجه به این که در صنایع روغن کشی به ویژه روغن‌کشی سرد با پرس، تفاله حاصل از روغن کشی علیرغم ترکیبات تغذیه‌ای بسیار و پروتئین غنی، به عنوان ضایعات دور ریخته می شود و یا به مصرف دام می‌رسد، لذا استخراج پروتئین و استفاده مجدد آن به عنوان یک منبع ترکیبات تغذیه‌ای، آنتی‌اکسیدان و زیست فعال از اهمیت بالایی برخوردار است (۵). از آنجایی که یکی از مهم‌ترین ویژگی آنزیم‌ها، اختصاصی عملکردن آن‌ها و فعالیت در شرایط واکنش ملایم است و با درنظر گرفتن مزایا و کاربردهای چشمگیر و روزافزون تولید و استفاده از پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی، هدف از این پژوهش، بررسی امکان استخراج پروتئین و استفاده تفاله حاصل از روغن‌کشی زیره سیاه، بررسی اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و ویژگی‌های عملکردی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز می باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد مواد اولیه

تفاله حاصل از روغن‌کشی زیره سیاه ایرانی (کرمانی، *Buniumpersicum* Bioss) از مراکز روغن کشی موجود در سطح شهرگرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از شرکت‌های مرک و سیگما (آلمان) خریداری گردید.

۲-۲- آماده سازی نمونه

به منظور چربی‌زدایی، تفاله خشک حاصل به نسبت۱:۴ (وزنی/ حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق همزده شد. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا شده و آرد حاصل در دمای اتاق خشک گردید و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد(۱۰). سپس، برای اطمینان از حذف کامل حلال، آردهای چربی زدایی شده بمدت ۲۴ ساعت در زیر هود آزمایشگاهی قرار داده شدند.

۲-۳- استخراج پروتئین

عملیات استخراج پروتئین از پودر چربی‌زدایی شده به این صورت بود که پودر زیره به نسبت ۱:۱۰ با محلول ۰/۳۳ مولار کلرید سدیم با pH=۹/۲۵، مخلوط و به مدت ۲ ساعت همزده شد. سپس، محلول حاصل در g×۴۵۰۰ به مدت ۳۰دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در pH =۴/۵ (pH ایزوالکتریک پروتئین) تنظیم شد. سپس در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل درg×۴۵۰۰ به مدت ۲۰دقیقه سانتریفوژگردید. در ادامه

1- Carvone

رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته و در g×۴۵۰۰، بهمدت ۵ دقیقه سانتریفوژ و با تنظیمpH =۷/۲ با افزودن هیدروکسید سدیم ۱ مولار، دوباره به حالت محلول تبدیل شد. سپس ایزوله پروتئین حاصل با فریزدرایر خشک و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی فرآیندها در دمای اتاق انجام گردید (۱۰).

۲-٤-تهیه پروتئین هیدرولیز شده

برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، پروتئین استخراج شده از تفاله زیره در غلظت ۵درصد (وزنی/حجمی) در بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۷/۴) حل گردید و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم زدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط مهیا شد. سپس محلول اولیه آنزیم پانکراتین در بافر فوق و در نسبت آنزیم به پروتئین سوبسترا ۲درصد (وزنی/وزنی) به محلول حاوی کازئین افزودن شد. دمای واکنش برای پانکراتین ۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان واکنش در شرایط هم‌زدن مداوم با دور ۲۰۰ دور در دقیقه بین ۴۰ الی ۲۴۰دقیقه متغیر در نظر گرفته شد. پس از اتمام فرآیند هیدرولیز، برای غیرفعال کردن واکنش و فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. پس از آن، محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا و لیوفیلیزه تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. تمام مراحل فوق برای هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز در بافر با pH=۸ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گرادنیز انجام شد (۷).

۲-۵-بازده استخراج پروتئین

برای ارزیابی بازده استخراج پروتئین از کنجاله روغن‌گیری شده زیره سیاه، مقدار پروتئین موجوددرماده استخراج شده پس از خشک کردن انجمادی محاسبه و نسبت وزنی آن به پروتئین موجود در کنجاله قبل از استخراج با استفاده از میکروکلدال تعیین گردید (۱۱).

۲-٦- تعیین حلالیت

برای تعیین حلالیت پروتئین‌های هیدرولیزشده از روش جامدار و همکاران (۲۰۱۰) با مقداری اصلاحات استفاده شد (۱۱). بدین ترتیب که، ۲۰۰ میلی‌گرم پروتئین هیدرولیز شده در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر پراکنده و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال روی ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱تنظیم شد. محلول در g۱۰۰۰۰ برای ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین موجود در محلول رویی با استفاده از روش بردفورد (۱۹۷۶) تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین محلول بر پروتئین کل نمونه تعیین گردید (۶).

۲-۷- امولسیفیه کنندگی

ویژگی‌های امولسیفیه‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده برطبق روش کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی اصلاحات تعیین گردید(۱۲). ابتدا ۵ میلی‌لیتر روغن هسته‌انگور و ۱۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد پروتئین با هم مخلوط و pH با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ رسانده شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر در سرعت ۲۰۰۰۰rpm به‌مدت ۱ دقیقه هموژن گردید. سپس، ۵۰ میکرولیتر نمونه امولسیون در زمان ۰ و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از انتهای ظرف برداشته و با ۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه (A_0) و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون (A_{10}) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی[1] (EAI) و شاخص پایداری امولسیون[2] (ESI) با استفاده از معادلات زیر محاسبه می‌شوند:

معادله(۱)

$$EAI\ (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_0)/\ 0.25 \times \text{protein weight (g)}$$

معادله(۲)

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

1- Enterprise Application Integration
2- Emulsion Stability Index

۲-۸-ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده

ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده برطبق روش کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی اصلاحات تعیین گردید(۱۲). ۱۵میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد نمونه با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال، pH آن به ۳، ۵، ۶، ۷ و ۹ تنظیم و هموژنیزاسیون در سرعت ۱۶۰۰۰rpm به‌مدت ۲دقیقه با هدف ورود هوا به درون محلول در دمای محیط انجام گرفت. نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج ۲۵ میلی‌لیتر منتقل و حجم کل پس از ۱ دقیقه خوانده شد. ظرفیت کف کنندگی[1] (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه گردید:

معادله(۳)

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

که A حجم کف پس از زدن (میلی‌لیتر) و B حجم اولیه قبل از زدن (میلی‌لیتر) می‌باشد.

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

معادله(۴)

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

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

۲-۹-آنالیز آماری

کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد. میانگین و انحراف معیار (SD[2]) داده‌ها محاسبه شدند. اثر هر یک از تیمارها و متغیرها با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بازده استخراج

فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین استخراج شده انجام شد و اثر هر یک از زمان‌های هیدرولیز با آنزیم‌های مورد استفاده بر درجه هیدرولیز بررسی شدند. درجه هیدرولیز شاخص بسیار مهمی در تعیین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده است. در این تحقیق، با درنظر گرفتن مقدار پروتئین اولیه در زیره سیاه و نمونه استخراج شده بازده استخراج حدود ۴۵ درصد به‌دست آمد.

۳-۲- اثر نوع آنزیم و زمان فرآیند بر حلالیت

حلالیت یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های پروتئین‌ها است که به‌طور مستقیم دیگر ویژگی‌های عملکردی آن‌ها را چه در شرایط ارزیابی آزمایشگاهی و چه در هنگام استفاده به‌عنوان جزء افزودنی در فرمولاسیون غذایی و امولسیون‌ها تحت تأثیر قرار می‌دهد (۷). جدول ۱ اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی با پانکراتین و آلکالاز را بر حلالیت پروتئین های هیدرولیزشده زیره سیاه در pH های مختلفنشان می‌دهد. همان‌گونه که در جدول مشاهده می‌شود، پروتئین هیدرولیز نشده بیشترین افت حلالیت را در pHهای اسیدی (به‌ویژه در حدود ۵-۴) با توجه به نقطه ایزوالکتریک آن (۴/۶) از خود نشان می‌دهد. نتایج حاکی از رسوب پروتئین‌ها و پپتیدهای اولیه با وزن مولکولی بالا در نقطه ایزوالکتریک است. اما با افزایشpH محیط به ۶، به‌طور قابل توجهی بر میزان حلالیت پروتئین های زیره سیاه افزوده شد ($P<۰/۰۵$). همچنین بین هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین در زمان مشابه تفاوتی مشاهده نشد اما ۲۰۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی پروتئین موجب تولید پپتیدهایی با بالاترین حلالیت در pH های مختلف به ویژه pH اسیدی شد. این یافته موافق با تحقیقات یو و همکاران (۲۰۰۹)که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۲۳ درصد، مهار رادیکال هیدروکسیل از ۴۵/۵ به ۶۵/۱ درصد افزایش یافت (۲۴)، جامدار و همکاران (۲۰۱۰) که بیان داشتند با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن، مهار رادیکال آزاد DPPH وآنزیم مبدل آنژیوتنسین افزایش یافت (۱۱) و

1- Foaming Capacity
2- Standard Deviation

وو و همکاران (۲۰۰۳) بر روی آمینواسیدها وپپتیدهای آزاد به عنوان خاصیت آنتی اکسیدانی موجود در هیدرولیزهای پروتئین نوعی ماهی (*Scomber Australasicus*)(۲۳) می‌باشد که نتایج مشابهی را گزارش کردند۴۰ دقیقه هیدرولیز پروتئین زیره سیاه با آلکالاز و پانکراتین منجر به افزایش حلالیت آن در pH=۵، از حدود ۲۰ به بیش از ۶۰ درصدگردید. به طور کلی، با افزایش زمان و درجه هیدرولیز، حلالیت هیدرولیزشده‌ها در نقطه ایزوالکتریک پروتئین به شکل قابل توجهی افزایش یافت. به طوری که، با افزایش درجه هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی پپتیدها و تولید آمینواسیدها، حساسیت به pH کم و حلالیت در محدوده وسیعی از pH حفظ شد. همچنین، هیدرولیز آنزیمی با شکست توده‌های پروتئینی نامحلول، تولید پپتیدهایی کوچک‌تر، افزایش دسترسی گروه‌های هیدروفیل و تسهیل واکنش اسیدآمینه های هیدروفیل با محیط آبی موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌گردد (۲۱).

۳-۳- اثر نوع آنزیم و زمان فرآیند بر ویژگی‌های امولسیفیه‌کنندگی

جدول ۲ اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی و نوع آنزیم مورد استفاده در PHهای مختلف برا بر قابلیت امولسیون‌کنندگی هیدرولیزشده‌های پروتئین کنجاله روغن‌گیری شده زیره سیاه نشان می‌دهد. اثر هر یک از متغیرهای مورد بررسی بر پایداری امولسیون‌های تولید شده درشکل ۱ ارائه شده است.

نتایج حاکی از این بود که شاخص امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون تولید شده با پروتئین زیره سیاه به شدت تحت تأثیر مقدار pH قرار می‌گیرد. علت این است که پروتئین زیره‌سیاه در pH اسیدی (نزدیک به نقطه ایزوالکتریک)، کمترین مقدار حلالیت را دارا است. در نتیجه، کاهش شدید حلالیت و رسوب پروتئین‌ها، موجب از دست رفتن ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی می‌شود (۴). این یافته حاکی از عدم قابلیت استفاده از پروتئین زیره سیاه هیدرولیز نشده با هدف غنی‌سازی و قابلیت امولسیون کنندگی در فرمولاسیون‌های مختلف در pH قلیایی است. شاخص امولسیون‌کنندگی پس از ۴۰دقیقه هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه با پانکراتین و آلکالاز در pH اسیدی به حداکثر خود رسید(جدول ۲). علت این نتیجه را می‌توان به حفظ حلالیت، بهبود فعالیت امولسیون‌کنندگی و در نتیجه تغییر در ترکیب پپتیدها و قابلیت تشکیل فیلم در اطراف قطرات روغن در pH اسیدی نسبت داد. هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز از فعالیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون بهتری نسبت به نمونه‌های حاصل از پانکراتین در زمان یکسان برخوردار بودند (جدول۲ و شکل۱). درمجموع نمونه های غیرهیدرولیزشده (زمان صفر) قابلیت امولسیون کنندگی و نیز پایداری امولسیون بیشتری را نشان می‌دهد. پس می‌توان نتیجه گرفت که جز در۵ =pH، درسایرpHها، عدم هیدرولیز، برای ایجاد و پایداری امولسیون مناسب‌تر است.

جدول۱- اثر زمان‌های متفاوت هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه با آلکالاز و پانکراتین بر انحلال‌پذیری هیدرولیزشده‌ها در pHهای مختلف

تیمار	زمان (دقیقه)	pH					
		۱	۳	۵	۷	۹	۱۱
پروتئین اولیه	۰	۴۵/۶±۱/۸ ^{Ec}	۲۵/۵±۳/۵ ^{Hd}	۲۰/۴±۲/۷ ^{Fe}	۷۹/۲±۳/۳ ^{Fb}	۸۴/۷±۲/۱ ^{ABa}	۸۶/۳±۱/۲ ^{Fa}
آلکالاز	۴۰	۶۶/۱±۱/۹ ^{Dc}	۶۲/۴±۳/۷ ^{Gc}	۶۲/۵±۱/۷ ^{Ec}	۸۳/۴±۱/۸ ^{DEb}	۸۸/۱±۰/۹ ^{ABa}	۸۷/۲±۱/۳ ^{EFa}
آلکالاز	۸۰	۷۴/۴±۰/۸ ^{Cb}	۷۳/۴±۳/۴ ^{Fbc}	۷۰/۳±۱/۹ ^{Dc}	۸۶/۹±۱/۵ ^{CDa}	۸۷/۸±۱/۷ ^{ABa}	۸۸/۸±۱/۵ ^{DEFa}
آلکالاز	۱۲۰	۸۳/۶±۱/۸ ^{Bb}	۸۱/۵±۲/۶ ^{Eb}	۷۹/۹±۱/۵ ^{Cb}	۸۸/۵±۴/۴ ^{Ca}	۹۱/۹±۰/۵ ^{Aa}	۹۲/۱±۰/۷ ^{ABCa}
آلکالاز	۱۶۰	۸۶/۳±۱/۱ ^{ABb}	۸۶/۷±۱/۷ ^{BCDb}	۸۶/۴±۱/۸ ^{Bb}	۹۳/۴±۱/۴ ^{ABa}	۹۲/۳±۲/۶ ^{Aa}	۹۴/۱±۰/۸ ^{ABa}
آلکالاز	۲۰۰	۸۹/۷±۱/۲ ^{Ac}	۹۰/۸±۱/۹ ^{ABbc}	۹۰/۶±۰/۹ ^{Abc}	۹۳/۱±۱/۴ ^{ABab}	۹۲/۱±۱/۸ ^{Aab}	۹۴/۸±۰/۶ ^{Aa}
آلکالاز	۲۴۰	۹۰/۱±۲/۱ ^{Ab}	۹۲/۹±۲/۵ ^{Aab}	۹۱/۸±۰/۶ ^{Aab}	۹۴/۸±۱/۹ ^{Aa}	۹۴/۶±۱/۱ ^{Aa}	۹۴/۷±۲/۱ ^{Aa}
پانکراتین	۴۰	۶۴/۶±۲/۸ ^{Dc}	۶۰/۱±۱/۲ ^{Gc}	۶۰/۷±۳/۹ ^{Ec}	۸۱/۶±۳/۱ ^{EFb}	۸۵/۲±۰/۹ ^{ABab}	۸۷/۳±۲/۸ ^{EFa}
پانکراتین	۸۰	۷۵/۹±۰/۹ ^{Cc}	۷۵/۱±۳/۱ ^{Fc}	۶۸/۴±۱/۹ ^{Dd}	۸۴/۳±۲/۴ ^{DEb}	۸۸/۴±۱/۸ ^{ABa}	۸۹/۳±۰/۹ ^{CDEa}
پانکراتین	۱۲۰	۸۴/۷±۱/۴ ^{Bc}	۸۲/۵±۱/۷ ^{DEbc}	۸۱/۲±۲/۶ ^{Cc}	۸۹/۷±۱/۶ ^{BCa}	۹۱/۱±۳/۳ ^{Ba}	۹۱/۵±۱/۱ ^{BCDa}
پانکراتین	۱۶۰	۸۵/۶±۲/۱ ^{Bb}	۸۵/۷±۱/۵ ^{CDEb}	۸۵/۹±۲/۵ ^{Bb}	۹۳/۶±۰/۷ ^{ABa}	۹۴/۴±۳/۰ ^{Aa}	۹۳/۹±۲/۳ ^{ABa}
پانکراتین	۲۰۰	۸۹/۵±۰/۶ ^{Ad}	۹۱/۴±۱/۲ ^{Ac}	۹۰/۲±۰/۴ ^{Acd}	۹۳/۴±۰/۹ ^{ABb}	۹۵/۳±۰/۶ ^{Aa}	۹۴/۶±۱/۳ ^{Aab}
پانکراتین	۲۴۰	۸۹/۵±۳/۵ ^{Abc}	۸۸/۴±۳/۱ ^{ABCc}	۹۱/۵±۰/۹ ^{Aabc}	۹۳/۷±۰/۸ ^{ABab}	۹۴/۵±۲/۶ ^{Aa}	۹۴/۱±۱/۸ ^{ABa}

میانگین ± انحراف معیار از میانگین، حروف بزرگ مشترک در هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف در یک pH مشخص است ($P>0.05$)، حروف کوچک مشترک در هر ردیف نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در یک تیمار در pHهای مختلف است ($P>0.05$).

امولسیون‌کنندگی یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها و محصولات هیدرولیز شده آن‌ها می‌باشد. ظرفیت امولسیون کنندگی به توانایی یک امولسیفایر در تشکیل و پایدارسازی قطرات کوچک فاز پراکنده در طول هموژنیزاسیون و در زمان نگهداری امولسیون تازه تهیه شده بستگی دارد. پایداری یک امولسیون نیز توانایی آن به امولسیون به مقاومت در برابر عوامل ناپایدارکننده مانند خامه‌ای شدن، توده‌ای شدن و ادغام اطلاق می‌شود(۷). با افزایش زمان و درجه هیدرولیز، به دلیل تولید پپتیدهای با طول زنجیره کوتاهتر و افت قابلیت آن‌ها در کاهش تنش سطحی از مقدار این شاخص کاسته شد (۲۰). همچنین، به‌علت اینکه پپتیدهای با وزن مولکولی بسیار پائین 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.در همین راستا نتایج مشابهی در تحقیق چن و همکاران (۲۰۱۱) گزارش گردید که اثر تیمارهای اکستروژن و هیدرولیز آنزیمی بر قابلیت امولسیون‌کنندگی ایزوله پروتئین سویا را بررسی کردند (۷). آن‌ها گزارش کردند که هیدرولیز جزئی ایزوله پروتئین سویا موجب بهبود ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی شد، اما با ادامه زمان و افزایش درجه هیدرولیز، از مقدار این شاخص کاسته شد. نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های جامدار و همکاران (۲۰۱۰) نیز بود که اثر درجات مختلف هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام زمینی بر قابلیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون در pHهای مختلف را بررسی و بیان کردند که پایداری امولسیون‌های تولید شده در همه نمونه‌ها در محدوده pH قلیایی به‌دلیل تغییر در بار سطحی پپتیدها و آمینواسیدها، بیشتر از شرایط اسیدی است (۱۱).

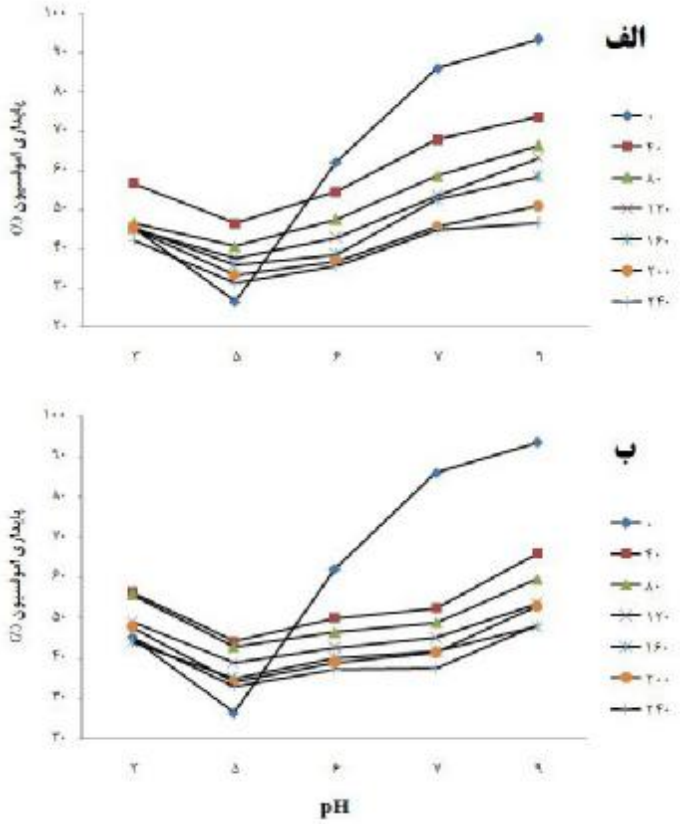
جدول۲- اثر زمان‌های متفاوت هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه باآلکالاز و پانکراتین بر امولسیون‌کنندگی هیدرولیزشده‌ها در pHهای مختلف

تیمار	زمان (دقیقه)	pH				
		۳	۵	۶	۷	۹
پروتئین اولیه	۰	۸۶/۵±۲/۱ FGd	۶۶/۷±۳/۲ Fe	۱۳۸/۶±۴/۷ Ac	۱۴۹/۳±۶/۱ Ab	۱۸۹/۷±۶/۲ Aa
آلکالاز	۴۰	۱۱۴/۱±۶/۴ Acd	۱۱۱/۵±۵/۱ Ad	۱۲۳/۸±۵/۶ Bc	۱۴۵/۹±۴/۵ Ab	۱۶۹/۲±۶/۱ Ba
آلکالاز	۸۰	۱۰۳/۳±۴/۴ BCc	۱۰۳/۲±۳/۴ Bc	۱۰۸/۶±۴/۱ CDbc	۱۱۳/۷±۵/۱ Cb	۱۲۷/۵±۴/۸ Da
آلکالاز	۱۲۰	۹۳/۶±۱/۴ DEFd	۹۲/۷±۱/۷Cd	۱۰۱/۵±۰/۸ CDEc	۱۰۸/۶±۰/۸ CDb	۱۱۳/۸±۴/۷ EFa
آلکالاز	۱۶۰	۹۱/۷±۷/۲ EFcd	۸۸/۴±۳/۴ Cd	۹۶/۷±۴/۹ EFbc	۱۰۱/۸±۲/۱ EFGab	۱۰۷/۴±۱/۳ FGa
آلکالاز	۲۰۰	۹۲/۵±۵/۴ EFb	۸۱/۹±۲/۱ Dc	۹۵/۲±۱/۷ EFab	۱۰۰/۳±۲/۱ FGHa	۹۵/۳±۱/۹ Gab
آلکالاز	۲۴۰	۸۰/۲±۷/۸ Gd	۷۳/۸±۲/۳ Ecd	۸۵/۷±۴/۶ Gbc	۹۶/۳±۲/۱ GHa	۹۲/۱±۱/۶ Gab
پانکراتین	۴۰	۱۰۸/۱±۱/۶ ABc	۱۰۳/۷±۲/۵ Bc	۱۰۹/۴±۵/۳ Cc	۱۲۱/۴±۳/۱ Bb	۱۵۰/۷±۴/۲ Ca
پانکراتین	۸۰	۱۰۱/۸±۵/۵ BCDbc	۹۸/۵±۴/۲ Bc	۱۰۳/۷±۴/۲ CDEbc	۱۰۸/۲±۲/۳ CDb	۱۱۶/۲±۳/۷ Ea
پانکراتین	۱۲۰	۹۷/۴±۴/۷ CDEc	۹۳/۱±۲/۲ Cc	۱۰۰/۶±۶/۳ DEFbc	۱۰۶/۱±۱/۴ DEb	۱۱۵/۱±۴/۶ Ea
پانکراتین	۱۶۰	۹۲/۶±۲/۹ EFcd	۸۹/۳±۳/۲ Cd	۹۸/۳±۶/۵ EFbc	۱۰۲/۹±۱/۳ DEFab	۱۰۵/۹±۲/۳ Ga
پانکراتین	۲۰۰	۸۶/۳±۴/۴ FGc	۸۲/۸±۱/۷ Dc	۹۵/۷±۱/۲ EFb	۹۷/۳±۲/۷ GHb	۱۱۳/۳±۲/۴ EFa
پانکراتین	۲۴۰	۸۰/۱±۱/۹ Gc	۷۶/۱±۳/۱ cE	۹۲/۴±۳/۲ FGb	۹۴/۶±۴/۲ Hb	۱۰۳/۹±۲/۷ Ga

میانگین ± انحراف معیار از میانگین، حروف بزرگ مشترک در هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف در یک pH مشخص است ($P>0.05$)، حروف کوچک مشترک در هر ردیف نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در یک تیمار در pHهای مختلف است ($P>0.05$).

۳-٤- اثر نوع آنزیم و زمان فرآیند بر ویژگی‌های کف‌کنندگی

همان‌گونه که در جدول۳مشخص است، پروتئین زیره سیاه هیدرولیز نشده در pHهای اسیدی ۳ و ۵ از ظرفیت کف‌کنندگی پائینی برخوردار می‌باشد که این امر تحت تأثیر حلالیت پائین آن قرار دارد. اگرچه با افزایش pH به ۶، ظرفیت کف‌کنندگی پروتئین زیره سیاه به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت. نتایج نشان دادند که هیدرولیز جزئی پروتئین زیره سیاه (در زمان ۴۰ دقیقه) به ویژه در pH های اسیدی، موجب بهبود قابلیت کف-کنندگی و پایداری کف‌های تولیدی می‌شود. علت آن را می-توان به افزایش انعطاف‌پذیری پپتیدها، تسهیل تشکیل غشای بین سطحی و فیلم در اطراف حباب‌های هوا و در نتیجه تولید کف نسبت داد (۲۱). اما با افزایش زمان و درجه هیدرولیز، از ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولید شده کاسته شد(جدول ۳ و شکل ۲). همچنین با وجود اینکه تفاوتی در ظرفیت کف‌کنندگی نمونه‌های حاصل از هیدرولیز آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد اما پایداری کف در هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین بیش از نمونه‌های آلکالاز بود (شکل ۲). ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف‌های تولید شده یکی دیگر از ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها و محصولات حاصل از هیدرولیز آن‌هاست که به طور قابل توجهی تحت تأثیر نوع پروتئین، pH و شرایط هیدرولیز، درجه هیدرولیز و نوع آنزیم مورد استفاده قرار می‌گیرد. حلالیت، بار سطحی، قابلیت واکنش زنجیره‌های پپتیدی و تشکیل فیلم در سطح مشترک حباب‌ها از جمله عوامل موثر بر کارایی کف کنندگی و پایداری آن به شمار می‌روند (۷). اگرچه پپتیدهای کوچک، قابلیت زیادی در حفظ هوا در محلول و در نتیجه ظرفیت کف کنندگی بالایی دارند، اما به‌علت کاهش جهت‌گیری پپتیدهای کوچک در سطح مشترک آب-هوا از قدرت کافی برای پایدار نمودن کف‌های تولید شده برخوردار نیستند(۲۲).



شکل ۱- اثر زمان‌های متفاوت هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه با (الف) آلکالاز و (ب) پانکراتین بر پایداری امولسیون هیدرولیزشده‌ها در pHهای مختلف

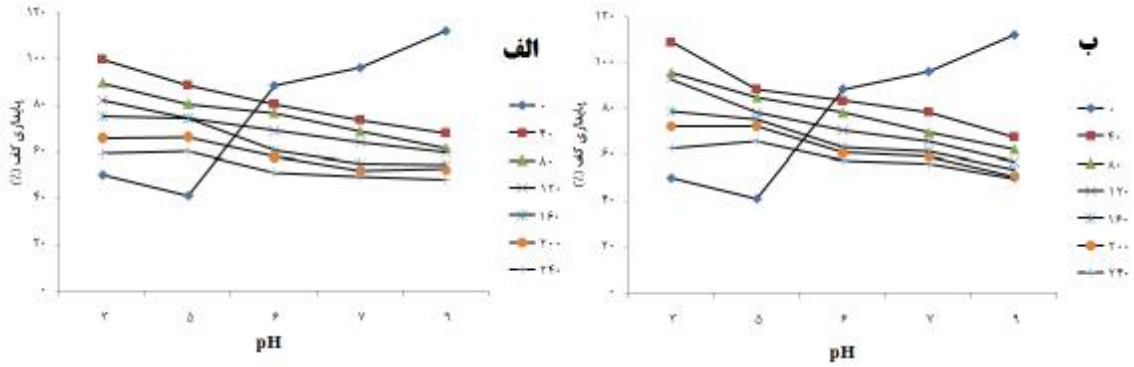
٤-نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان‌دهنده اثر قابل توجه هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه بر ویژگی‌های عملکردی کنجاله زیره سیاه بود. با افزایش زمان هیدرولیز آنزیم پانکراتین و آلکالاز، درجه هیدرولیز پروتئین زیره سیاه افزایش یافت. افزایش درجه هیدرولیز با تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر، رهایش و تغییر در ترکیب اسیدهای آمینه و در معرض قرار گرفتن گروه‌های فعال، کلیه ویژگی‌های محصول هیدرولیز شده را تحت تأثیر قرار داد. انحلال‌پذیری، امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی پائین پروتئین زیره سیاه در pHهای اسیدی (به ویژه در محدوده نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌ها) پس از هیدرولیز آنزیمی و با افزایش درجه هیدرولیز به طور چشمگیری افزایش یافت.ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری کف به‌ترتیب در هیدرولیزشده‌های حاصل از فعالیت آلکالاز و پانکراتین بیشتر بودند. با این حال تفاوت قابل ملاحظه‌ای بین دیگر ویژگی‌های عملکردی هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین مشاهده نشد اما زمان فرآیند و درجه هیدرولیز اثر قابل ملاحظه‌ای بر شاخص‌های مورد مطالعه نشان دادند. همچنین، در تصاویر ژل الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیزشده هیچ باندی قابل رویت نبود که حاکی از کاهش شدید وزن مولکولی و شکست زنجیره‌های پپتیدها به دی‌پپتید و اسیدهای آمینه است. در نهایت می‌توان بیان داشت که پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیزآنزیمی پروتئین زیره سیاه با دارا بودن ویژگی‌های عملکردی بسیار مناسب، از قابلیت بالایی در تولید، غنی‌سازی و فرمولاسیون محصولات غذایی مختلف با هدف افزایش سطح سلامتی عمومی برخوردارند.

جدول۳- اثر زمان‌های متفاوت هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه با آلکالاز و پانکراتین بر ظرفیت کف‌کنندگی هیدرولیزشده‌ها در pHهای مختلف

تیمار	زمان (دقیقه)	pH				
		۳	۵	۶	۷	۹
پروتئین اولیه	۰	۵۸/۴±۱/۷ Hd	۴۷/۷±۱/۲ He	۱۴۹/۱±۴/۱ Ac	۱۶۷/۷±۴/۱ Ab	۱۶۹/۹±۱/۷ Aa
آلکالاز	۴۰	۱۴۸/۸±۷/۵ Aa	۱۳۸/۷±۴/۹ ABab	۱۲۹/۵±۴/۵ Bbc	۱۲۲/۱±۶/۷ CDcd	۱۱۵/۶±۴/۶ Bd
آلکالاز	۸۰	۱۳۴/۸±۶/۹ BCa	۱۳۱/۱±۵/۱ BCDab	۱۲۸/۸±۵/۸ Bab	۱۲۳/۹±۳/۱ BCb	۱۱۳/۴±۴/۰ Bc
آلکالاز	۱۲۰	۱۲۷/۰±۴/۹ DEa	۱۲۶/۹±۴/۷ CDa	۱۱۹/۵±۶/۱ Ca	۱۱۹/۱±۵/۸ CDEa	۱۰۵/۶±۵/۸ Cb
آلکالاز	۱۶۰	۱۱۸/۹±۵/۵ EFa	۱۱۸/۵±۴/۳ Ea	۱۱۴/۰±۳/۸ CDab	۱۱۳/۳±۵/۲ FGab	۱۰۵/۴±۵/۱ Cb
آلکالاز	۲۰۰	۱۱۲/۶±۵/۸ FGa	۱۰۶/۵±۶/۲ FGab	۱۰۱/۹±۱/۲ Eb	۱۰۶/۵±۱/۹ Gab	۹۹/۷±۲/۵ CDEb
آلکالاز	۲۴۰	۱۰۹/۴±۴/۱ Ga	۱۰۰/۱±۶/۱ Gb	۹۴/۲±۳/۰ Fbc	۹۱/۶±۱/۷ Hc	۹۲/۷±۲/۳ Ec
پانکراتین	۴۰	۱۱۴/۴±۴/۲ Aa	۱۳۹/۸±۳/۴ Aa	۱۲۸/۱±۱/۹ Bb	۱۲۹/۳±۶/۷ Bb	۱۱۷/۱±۵/۹ Bc
پانکراتین	۸۰	۱۳۹/۷±۲/۵ Ba	۱۳۴/۰±۲/۹ ABCa	۱۱۷/۴±۴/۱ CDb	۱۱۵/۴±۴/۵ DEFb	۱۱۶/۵±۱/۱ Bb
پانکراتین	۱۲۰	۱۳۰/۶±۲/۷ CDa	۱۳۲/۱±۵/۹ ABCa	۱۱۶/۹±۶/۱ CDb	۱۱۷/۱±۵/۱ CDEb	۱۰۴/۰±۵/۴ CDc
پانکراتین	۱۶۰	۱۲۱/۶±۶/۱ EFab	۱۲۳/۹±۱/۴ DEa	۱۱۴/۸±۵/۸ CDb	۱۱۵/۳±۴/۴ DEFab	۱۰۳/۵±۴/۱ CDc
پانکراتین	۲۰۰	۱۰۹/۸±۴/۶ Ga	۱۱۰/۵±۱/۹ Fa	۱۰۹/۴±۲/۹ Da	۱۰۷/۴±۱/۸ FGa	۹۸/۸±۳/۸ CDEb
پانکراتین	۲۴۰	۱۰۷/۱±۶/۳ Ga	۱۰۵/۲±۴/۳ FGa	۹۹/۲±۳/۸ EFab	۹۵/۸±۳/۴ Hb	۹۶/۷±۲/۱ DEb

میانگین ± انحراف معیار از میانگین، حروف بزرگ مشترک در هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در تیمارهای مختلف در یک pH مشخص است ($P>0.05$)، حروف کوچک مشترک در هر ردیف نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در یک تیمار در pHهای مختلف است ($P>0.05$).



شکل۲- اثر زمان‌های متفاوت هیدرولیز آنزیمی پروتئین زیره سیاه با آلکالاز (الف) و پانکراتین (ب) بر پایداری کف هیدرولیزشده‌ها در pHهای مختلف

۵-منابع

1. Abeyrathne, E. D., Lee, H. Y., Jo, C., Suh, J. W. and Ahn, D. U. 2016. Enzymatic hydrolysis of ovomucin and the functional and structural characteristics of peptides in the hydrolysates. *Food Chemistry*, 192:107-113.
2. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussiaodoratissima Mozaff.*in model and food systems. *Food Chemistry*, 105: 57-64.
3. Al-Jasass, F. M. and Al-Jasser, M. S. 2012. Chemical composition and fatty acid content of some spices and herbs under Saudi Arabia conditions. *The Scientific World Journal*, 2012.
4. Aluko, R. E. and Monu, E. 2003. Functional and bioactive properties of quinoa seed protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 68: 1254-1258.
5. Balasundram, N., Sundram, K. and Samman, S. 2006. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, 99(1): 191-203.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-254.
7. Chen, C., Chi, Y. J., Zhao, M. Y. and Xu, W. 2012. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21: 27-34.
8. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. Fujimoto, K. and Nokihara, K., 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 49-53.
9. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109: 144-148.
10. Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. and Varidi, M. J. 2018. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (Trigonellafoenumgraecum) protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98 (5):1880-1888.
11. 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 inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121: 178-184.
12. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroidesleptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102 (4): 1317-1327.
13. 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.
14. Peña-Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2003. Whey and soy protein hydrolysates inhibit lipid oxidation in cooked pork patties. *Meat Science*, 64: 259-263.
15. Peñta-Ramos, E. A. and Xiong, Y. L. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. *Journal of Food Science*, 67: 2952-2956.
16. Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16:1306-1314.
17. Ramadan, M. F. 2007. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa L.*): an overview. *International Journal of*

Food Science &Technology, 42(10): 1208-1218.

18. Sakanaka, S. and Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. *Food Chemistry*, 95: 243-249.
19. Sarmadi B. H. and Ismail A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10):1949-1956.
20. Tong, L. M., Sasaki, S., Mc Clements, D. J. and Decker, E. A. 2000. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 1473-1478.
21. Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W. and Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. *LWT-Food Science and Technology*, 38: 255-261.
22. Van der Ven, C., Gruppen, H., de Bont, D. B. and Voragen, A. G. 2002. Correlations between biochemical characteristics and foam-forming and-stabilizing ability of whey and casein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 2938-2946.
23. Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberaustriasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.
24. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnusanguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 235-240.
25. You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M. and Ren, J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnusanguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120: 810-816.

(Original Research Paper)

Evaluation of Enzyme Type and Process Time on Functional Properties of Hydrolyzed Proteins Obtained from Defatted *Buniumpersicum* Bioss. Pressed Cake

Zahra Shahi[1], Seyyedeh Zahra Sayyed-Alangi[2*], Leila Najafian[1]

1-Ph.D Students of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.
2-Associate Professor, Department of Chemistry, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Received:29/08/2019 Accepted:28/06/2020

Abstract

Considering that humanity is currently facing major problems such as cardiovascular diseases, researchers have found that there is a tight relationship between nutrition and health. Thus, there are extensive studies conducted on enriching food products and beverages with a variety of salutary compounds (such as nutraceutical food) and producing functional food. The present study aimed at investigating the effect of enzymatic hydrolysis process time with alcalase and pancreatin on the functional properties of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of defatted Bunium persicum Bioss. pressed cake. The hydrolysis process was performed using alcalase and pancreatin enzymes in the ratio of enzyme to substrate (2% w/w) at different times (40-240 min). The solubility of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. pressed cake under acidic conditions (pH = 4-5) was increased from about 20% to more than 60% following just hydrolysis for 40 min. Generally, by increasing the time and degree of hydrolysis, the solubility of the hydrolysates in both enzymes was significantly increased ($p<0.05$) at the isoelectric point of the protein. Thus, as the degree of hydrolysis was increased, the sensitivity to pH was decreased and the solubility was maintained in a wide range of pH. The emulsion activity index (ESI) and its stability were reached their maximum values following the enzymatic hydrolysis of the defatted Bunium persicum Bioss. pressed cake with pancreatin and alcalase peaked for 40 minutes under acidic pH. Considering the evaluated functional properties such as protein emulsion and foaming, the results indicated that hydrolyzed proteins for 40 minutes with alcalase have better functional properties than other treatments with pancreatin or other times.

Keywords: Enzyme Hydrolysis, Functional Properties Black Cumin, Pancreatin, Alcalase

[*]Corresponding Author: zalangi@gmail.com