(مقاله پژوهشی)

ارزیابی‌خواص‌آنتی‌اکسیدانی و عملکردی‌پروتئین هیدرولیزشده حاصل از هیدرولیزآنزیمی‌پروتئین جوانه‌گندم

سکینه قلیچ [۱]، پیمان آریایی [۲*]، محمد احمدی [۳]

۱- دانشجوی‌دکتری،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.

۳- استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۶/۲۹ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۸/۱۲

DOI: 10.30495/jfst.2021.1940928.1757

چکیده

پپتیدهای زیست فعال موجود در پروتئین هیدرولیزشده دارای خواص‌عملکردی مناسب و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشد. هدف از این مطالعه، تولید پروتئین هیدرولیز شده از جوانه‌گندم با بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عملکردی درآن می‌باشد. بدین‌منظورپروتئین هیدرولیزشده جوانه‌گندم توسط‌آنزیم‌های‌تجاری‌آلکالاز وفلاورزایم (pH بهینه فعالیت آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، در بازه‌های زمانی۱۰، ۲۰ و۳۰ دقیقه تولید شد. مقادیر درجه هیدرلیز، خواص عملکردی (pH ۷) شامل حلالیت، خاصیت کف‌زایی‌وامولسیون‌کنندگی‌وهمچنین‌خواص‌آنتی‌اکسیدانی‌شامل‌خنثی‌سازی‌رادیکال‌آزادDPPHوABTS و قدرت احیاءکنندگی فریک‌اندازه‌گیری‌شد. نتایج‌نشان‌داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که بیشترین مقادیر درجه‌هیدرولیزتوسط‌آنزیم‌آلکالازدرزمان۳۰ دقیقه مشاهده شد (۲۸/۲۶درصد) و این تیمار بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی را دارا بود ($p<۰/۰۵$). به طورکلی می‌توان‌گفت پروتئین هیدرولیزشده حاصل از جوانه‌گندم (توسط آنزیم آلکالاز) بهترین ویژگی‌های عملکردی وآنتی‌اکسیدانی را از خود نشان داد .بنابراین می‌توان از آن به عنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در رژیم غذایی و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیزشده، آنزیم‌های تجاری، جوانه‌گندم، آنتی‌اکسیدانی، خواص عملکردی.

* مسئول مکاتبات: p.aryaye@yahoo.com

۱- مقدمه

در حال حاضر پپتیدهای زیست فعال با استقبال روزافزونی برای استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی فراسودمند مواجه هستند. پروتئین‌ها علاوه بر خواص تغذیه‌ای نقش مهمی در فرآیندکردن و توسعه مواد غذایی دارند. این ترکیبات مسئول بروز بسیاری ازویژگی‌های‌عملکردی بوده و بنابراین تأثیر به‌سزایی بر نظر مصرف‌کننده در مورد ماده غذایی خواهند داشت (۲۱). اهمیت ویژگی‌های عملکردی بسته به نوع‌محصولی که‌پروتئین‌درآن 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 به‌نظرمی‌رسد (۱). اصلاح‌آنزیمی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولتیک به منظور شکست باندهای پپتیدی خاص و اصلاح پروتئین‌ها به طورگسترده در صنایع غذایی مورداستفاده‌قرارمی‌گیرد.ویژگی‌پپتیدهای‌حاصل از هیدرولیز آنزیمی تحت تأثیر شرایط هیدرولیز (دما، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا وزمان) ونوع‌آنزیم قرارمی‌گیرد. پپتیدهای حاصل ازهیدرولیزازنظرویژگی‌های‌تغذیه‌ای،عملکردی‌و بیولوژیکی با پروتئین‌های اولیه متفاوت هستند. مطالعه‌های انجام شده نشان‌دادعلاوه بر ویژگی‌های تغذیه‌ای پروتئین‌های هیدرولیز شده این ترکیبات دارای چندین اثر بیولوژیکی نیز می‌باشند. این مطالعه‌ها شامل استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلکالاز، تریپسین، فلاورزایم، پپسین، پانکراتین، کیموتریسین و غیره) در شرایط مختلف هیدرولیز از جمله زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا، pH مخصوص هر آنزیم و دما می‌باشد (۱۴، ۲۰، ۲۴). در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری‌مانند شیر، لوبیای سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده‌ی تخم‌مرغ، جانداردریایی blood clams، صدف خوراکی و ضایعات ماهی و میگو تولید شده اند (۸). در بین منابع‌گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع‌گیاهی‌به دلیل‌قیمت‌مناسب‌تر و آلرژی‌زایی‌کمتر، بیشترموردتوجه‌قرارگرفته‌اند(۱۰). گندم یکی از سه محصول عمده غلات است که سطح کاشت آن ۲۶ درصد عملکرد دانه را شامل می‌شود و بیش از نیمی از تولید غذای اصلی را به خود اختصاص داده است. نسبت جوانه گندم حدود ۲ درصددردانه‌کامل‌گندم‌است که به عنوان مغذی‌ترین قسمت دانه‌گندم‌محسوب‌می‌شود.جوانه‌گندم فرآورده جانبی حاصل ازآسیاب‌گندم‌بوده ومنبع‌عمده ویتامین‌ها و ترکیبات عملگرا مانند فرولیک اسید، فنیک اسید، گلوتاتیون، فیتواسترول و همچنین‌موادمعدنی، فیبررژیمی و فلاونوئیدها می‌باشد. نظر به ارزش تغذیه‌ای بالا و ویژگی‌های عملکردی مناسب، متخصصان‌تغذیه، از جوانه گندم به‌عنوان خزانه مغذی طبیعی و منبع زندگی بشر یاد می‌کنند. جوانه گندم همچنین غنی از اسیدهای‌آمینه به ویژه اسیدهای‌آمینه ضروری که در بسیاری ازدانه‌های‌غله‌ای‌کمیاب‌هستند مانند لیزین، متیونین و ترئونین می‌باشد،به‌همین‌دلیل،یکی‌از منابع مهم و با ارزش پروتئینهای گیاهی به شمار می‌رود (۱۲، ۱۴، ۳۳). صادقیان و همکاران (۱۳۹۸) به بررسی‌اثرزمان فرایند هیدرولیز(۰-۳۰۰ دقیقه) باهریک‌ازآنزیم‌های‌آلکالازو پانکراتین را بر درجه هیدرولیز پروتئین‌کینوا پرداختند. نتایج حاکی از افزایش پیوسته درجه هیدرولیز در طول زمان فرآیند بود. بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین‌کینوا مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز و در زمان ۳۰۰ دقیقه به دست آمد. اگرچه در سایر بازه های زمانی، تفاوتی‌بین مقدار این شاخص در نمونه های هیدرولیز شده با آلکالاز وپانکراتین‌مشاهده نشد (۱). با توجه به اینکه جوانه‌گندم با داشتن ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای بالا، اثرات مفیدی‌روی‌سلامتی انسان داشته و در عین حال منبع پروتئینی ارزان‌قیمتی‌است که‌سالانه به مقدار زیادی طی فرایند آسیاب گندم در سراسر جهان، به صورت ضایعات از دست می‌رود، می‌توان پروتئین موجود درآن را که به عنوان یکی از بهترین منابع‌پروتئین‌های‌گیاهی شناخته می‌شود، به منظور مصارف انسانی،استخراج‌ویاهیدرولیزکرده‌ودرفرمولاسیون‌موادغذایی به‌کار برد. هدف از مطالعه حاضر تولید پپتید از جوانه گندم توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی‌خواص‌آنتی اکسیدانی‌وعملکردی‌این‌پپتیدهامی‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد اولیه

جوانه گندم‌از کارخانه آردتابان(تهران)تهیه‌شد.آنزیم آلکالاز L2.4 (استخراج شده از*Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم500L(استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه‌حرارت۴درجه سانتی گراد نگهداری شد. میزان فعالیت آنزیمی‌به‌صورت‌واحدآنسون به ازای هرکیلوگرم‌پروتئین به سوبسترا(Au/kgprotein)ارائه‌شد.تمامی‌موادشیمیایی‌مورداستفاده درآزمایش‌ازشرکت‌مرک‌آلمان‌تهیه‌و از درجهٔ آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

۲-۲-۱-آماده‌سازی ایزوله پروتئین از جوانه‌گندم

جوانه گندم‌پس‌از تمیزشدن‌به‌منظورغیرفعال‌سازی آنزیم‌های آن‌تحت‌دمای۱۰۵درجه‌سانتی گرادبه‌مدت ۲۰دقیقه‌قرارگرفت وسپس‌به مدت ۸ ساعت توسط n-هگزان چربی‌زدایی و در دمای‌اتاق‌خشک‌شد. جوانه‌گندم‌فاقدچربی با استفاده آسیاب چکشی‌آزمایشگاهی‌آسیاب وآرد حاصله پس از غربال‌شدن بامش ۷۰،دردمای ۲۰-درجه‌سانتی‌گرادتازمان‌استفاده‌نگهداری شد(۳۴).آردجوانه‌گندم‌فاقدچربی‌در محلول Nacl۱mol/L (۱:۸ w/v)دردمای‌محیط‌برای ۳۰دقیقه همزده وسپس pH آن روی۹/۵ تنظیم شد. بعد از ۳۰ دقیقه‌همزدن، سوسپانسیون در ۸۰۰rpm‌به‌مدت ۲۰دقیقه‌دردمای۴درجه‌سانتی گرادسانتریفیوژ شد. مایع‌رویی‌درpH۴ با استفاده ازHcl۱ mol/L جهت رسوب پروتئین‌ها تنظیم شد و دوباره درrpm۸۰۰ به مدت ۲۰دقیقه‌دردمای۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوبات چندین‌بارباآب‌مقطرشسته‌و درآب‌مقطرحاوی NaOH تاpH ۷ تنظیم شد. ذرات‌پراکنده‌بااستفاده از خشک‌کن انجمادی (FDB-550، ایران، کره جنوبی) خشک شد (۳۴).

۲-۲-۲- هیدرولیزایزوله‌پروتئینی‌حاصل از جوانه گندم

۵۰گرم‌نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان۱۰۰میلی‌لیترآب مقطر به نسبت(۲:۱)به ارلن مایراضافه گردیدوباهمزن(DHS, 700، ایران)به‌مدت۲دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه‌کردن هیدروکسیدسدیم۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت‌آنزیم‌ها(آلکالاز۸/۵، فلاورزایم۷)، رسانده شد. نمونه‌هادرحمام‌آبی‌متحرک(لاتویا،بیوسان،لتونی)دردمای ۵۰ درجه‌سانتی گرادبرای‌تولیدپروتئین‌هیدرولیزشده‌بادورثابت ۲۰۰دوردردقیقه‌قرارداده‌شد،سپس‌آنزیم(۱درصدمیزان پروتئین نمونه‌اولیه)به‌آن‌اضافه‌وپس‌ازهربارنمونه‌گیری(زمان۱۰و۲۰دقیقه) ودرپایان‌آزمایش(زمان۳۰دقیقه)به‌منظورقطع‌واکنش‌آنزیمی درحمام‌آبی به مدت ۱۵دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرارداده‌شدند. پروتئین‌های هیدرولیزشده پس‌از خنک‌شدن بااستفاده ازسانتریفیوژ بادورثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰دقیقه‌سانتریفیوژشد،مایع‌رویی‌جمع‌آوری‌گردیدو پروتئین هیدرولیزشده‌درفریزرنگهداری‌شد، سپس‌با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشورکره)به‌صورت‌پودردرآمدودردمای ۲۰-درجه‌سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۲۹).

۲-۳- درجه هیدرولیز

میزان‌هیدرولیزبه‌کمک‌تری‌کلرواستیک‌اسید(TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول‌درتری‌کلرواستیک اسید۱۰درصد به‌کل پروتئین‌های موجوددرنمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با۵میلی‌لیترتری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور۶۷۰۰ rpm و زمان ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس‌مقدارپروتئین‌درفازمحلول‌اندازه‌گیری‌و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۱۹):

معادله(۱)

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰درصد / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-٤- ترکیب اسید آمینه

۱گرم پودرپروتئین هیدرولیزشده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای۱۱۰درجه‌سانتی‌گرادبااستفاده‌از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیزکامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات[1] (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای‌آمینه انجام شد. میزان اسیدهای‌آمینه‌کل‌با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) وبا استفاده ازآشکارسازفلورسنت (RF-530، کنور، آلمان) تعیین شد شد سپس نمونه ها با استفاده از فتال

1 -Phenyl Isothiocyanate

دی-آلدئید[1] (OPA) مشتق شده و با استفاده از ستون C18 با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه با آشکارساز فلورسانس آنالیز شدند (۱۳).

۲-۵-اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۵-۱- بررسی مهارراديكال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱میلی لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طورجداگانه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۶۰دقیقه دراتاق تاریک قرارداده و سپس جذب نوری نمونه‌ها درطول‌موج nm ۵۱۷ درمقابل شاهد (آب مقطر)خوانده شد. (۶).

معادله (۲)

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH = (جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) ×۱۰۰

۲-۵-۲- اندازه گیری قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه محلول با ۲/۵ میلی‌لیتر فسفات بافر ۰/۲ مولار (pH ۶/۶) و با ۲/۵ میلی‌لیترفریک سیانید پتاسیم ۱درصدترکیب‌شدوترکیب‌فوق‌به‌مدت ۲۰دقیقه در انکوباتور ۵۰درجه‌قرارداده‌شدوسپس‌با ۲/۵ میلی‌لیتر، تری‌کلرواستیک اسید(TCA)۱۰ درصد ترکیب و با دور ثابت ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد و ۲/۵ میلی‌لیتر از لایه بالایی این محلول با ۲/۵ میلی‌لیترآب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر فریک‌کلرید (Fecl3) ۰/۱ درصد ترکیب شد و به مدت ۱۰ دقیقه‌دردمای محیط‌قرارگرفت‌وسپس‌جذب در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد (۶).

۲-۵-۳-اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ABTS

ارزیابی‌میزان‌مهارراديكال‌آزادABTS (۲،۲- آزینوبیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-۶-سولفونیک‌اسید)باروش Memarpoor-Yazdi وهمکاران(۲۰۱۲) تعیین شد (۱۸). محلول رادیکال ABTS بامخلوط کردن۵میلی‌لیتراز۷ABTSمیلی‌مولاروAA میکرومولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی‌مولار مهیا شد و۱۶ ساعت در دمای‌محیط‌درتاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول موجودبا۴۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (۵ میلی مولار، pH۷/۴، حاوی۰/۲Nacl مولار)تاجذب‌محلول‌رادیکالABTS بتواند در۷۳۴ نانومتر عدد ۰/۰۲ ± ۰/۷۰ به دست آید، ترکیب شد. ۶۵ میکرومولار نمونه محلول با ۶۵ میکرومولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرومولاراز این مخلوط با ۹۱۰ میکرو-مولارمحلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ میکرومولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرومولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از۱۰دقیقه دردمای محیط در تاریکی قرارگرفت‌وجذب‌در۷۳۴نانومترقرائت‌شد.فعالیت‌پاک‌کنندگی رادیکال‌آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

معادله(۳)

درصد پاک‌کنندگی رادیکال آزاد ABTS = [(میزان جذب کنترل / میزان جذب نمونه)- ۱] ×۱۰۰

۲-۶- خواص عملکردی

۲-۶-۱- حلالیت

حلالیت‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌با استفاده از روش Bera و Mukherjee (۱۹۸۹)انجام‌شد. یک‌گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آب مخلوط‌کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱۰-۲ تنظیم‌کرده و سپس به مدت۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ سانتریفیوژانجام‌شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده ازروش‌کلدال تعیین‌شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۴۲) محاسبه شد (۵).

معادله (۴)

اندیس حلالیت در آب = (گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتنت) ×۱۰۰

۲-۶-۲- ظرفیت و پایداری امولسیون کنندگی

به ۳ گرم‌نمونه، ۵۰ میلی لیترآب مقطر و۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه‌شدوبه مدت ۳۰ ثانیه با هموژنایزر (APU500b، دیلکوفناور، ایران) هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله‌آزمایش تقسیم‌گردید و با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت‌زمان۵دقیقه‌سانتریفوژ(بهداد،ایران) شدEC طبق معادله (۵) زیرگزارش شد (۲۶).

معادله (۵)

EC(%) = حجم قسمت امولیسفیه شده / حجم کل

1 -o-phthaldialdehyde

۱۰میلی‌لیتروغن‌گیاهی‌کلزا با ۳۰ میلی لیتر محلول پروتئینی ۱درصد مخلوط شد وpH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰rpm به مدت‌یک‌دقیقه‌هموژنیزه‌شدسپس‌با میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله‌برداشته که‌این‌عمل‌درزمان‌های t=0' و t=10' انجام گرفت.سپس‌نمونه‌های‌به‌دست‌آمده‌درزمان‌های صفر و ده دقیقه با۵میلی‌لیترسدیم‌دودسیل‌سولفات ۱٪ مخلوط شد وجذب محلول رقیق شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۲۶).

معادله(۶)

$$ESI = A0 \times \Delta t/\Delta A$$
$$\Delta A = A0 - A\ 10\ ,\Delta t = 10\ \text{min}$$

۲-۶-۳ -اندازگیری ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی

برای‌اندازگیری‌ظرفیت‌کف‌کنندگی ۲۰ میلی لیتر محلول‌های پروتئینی‌باpH ۵-۸ تهیه‌شد ودراستوانه مدرج ۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف کنندگی در نظرگرفته شد (معادله ۷) (۲۵).

معادله (۷)

حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف - حجم نمونه قبل تشکیل کف = ظرفیت کف کنندگی (٪)

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم‌کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد (۲۵). (معادله ۸)

معادله(۸)

$$\text{پایداری کف} = \frac{V0 \times 100}{\Delta V}$$

V0:مقدارحجم‌کف‌درزمان صفر، ΔV: تغییرات حجم کف در بازه زمانی

۲-۷- تجزیه و تحلیل‌آماری

کلیه‌آزمایش‌هادرطرح‌آزمایشی‌کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف معیارگزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار(SPSS version 18) صورت‌گرفت. برای بیان اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون‌دانکن‌درسطح۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیردرجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به‌عنوان یک پارامتر ناظر بر میزان هیدرولیز پروتئین‌مورداستفاده قرار می‌گیرد، این فاکتور بیشتر به‌عنوان یک شاخص‌جهت‌مقایسه‌میان پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی مختلف‌کاربرددارد.ازطرفی‌درجه هیدرولیز یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده است که‌میزان‌شکسته‌شدن‌پیوندهای‌پپتیدی‌رابیان‌می‌کندوبایدکنترل گردد(۲۹).نتایج‌مربوط‌به‌درجه‌هیدرولیز(جدول۱)نشان‌دهنده این‌نکته‌است‌که‌کارایی‌هیدرولیزآنزیمی‌بسته‌به‌شرایط فرآیند، نوع‌آنزیم‌وزمان‌هیدرولیزمتفاوت‌است. به‌طوری‌که با افزایش زمان‌هیدرولیزمقادیردرجه هیدرولیز افزایش یافت. بر اساس نتایج‌به‌دست‌آمده‌از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان‌واکنش، هیدرولیزآنزیمی‌بایک فازسریع‌آغاز می‌شود و دراین‌مرحله‌تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود. همچنین، افزایش‌زمان‌فرآیندموجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثرآن بر سوبسترا می‌گردد (۱۹). همچنین درجه‌هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است. آلکالازبه‌دلیل‌تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم، به طور مکرر توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳، ۱۹، ۲۹، ۳۱).

جدول۱- مقادیردرجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های‌مختلف

آنزیم / زمان هیدرولیز (دقیقه)	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	۱۱/۳٦±۰/۳۳^{Ac}	٦/۵۰±۰/۸۲^{Bc}
۲۰	۲۰/٤۰±۰/۵٤^{Ab}	۱۳/۵۱±۰/۵۰^{Bb}
۳۰	۲۸/۲٦±۱/۷٤^{Aa}	۱۷/۲۵±۱/۵۲^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۲- ترکیب اسیدآمینه

مطالعه‌ترکیب‌اسیدهای‌آمینه‌موادمغذی‌مانندپروتئین‌هیدرولیز شده برای درک ارزش غذایی، خواص عملکردی و خواص آنتی‌اکسیدانی‌آن‌هاضروری است. خاصیت بیواکتیو پروتئین وپپتید هیدرولیزشده به شدت تحت تأثیر پروفایل اسید آمینه می‌باشد (۲۷). نتایج مربوط به ترکیب اسیدآمینه پروتئین‌های هیدرولیزشده با آنزیم‌آلکالاز و فلاورزایم در زمان ۳۰ دقیقه (با توجه به بالاتربودن درجه هیدرولیزاسیون) نشان داد، بالاترین مقادیر اسیدآمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم گلوتامیک اسید ۱۵/۴۵، ۱۳/۹۹ درصد و پس ازآن‌اسیدآمینه‌آسپارتیک‌اسید۹/۱۱،۹/۳۵ درصد (به ترتیب) بوده است. این نتایج با نتایج، Attia و همکاران (۲۰۱۱) هم‌خوانی داشت (۴).آن‌هابالاترین‌مقادیر اسید آمینه پروتئین جوانه گندم را به ترتیب گلوتامیک اسید (۱۴/۶۴درصد) و آسپارتیک اسید (۱۲/۷۶ درصد) اعلام نمودند. همچنین با نتایج Zhu و همکاران (۲۰۰۶) هم خوانی داشت (۳۴). آنها نیز بالاترین مقادیر اسید آمینه ایزوله پروتیئن جوانه گندم را به ترتیب گلوتامیک اسید (۱۵/۰۸ درصد) و آسپارتیک اسید (۹/۳۴ درصد) اعلام نمودند. تنها اسید آمینه محدود مطابق ۱۹۹۰FAO/WHO برای آنزیم آلکالاز، فنیل آلانین و برای آنزیم فلاورزایم، فنیل آلانین و لیزین بوده است. در مجموع نتایج مطالعه‌حاضرنشان می‌دهد که جوانه‌گندم منبع خوبی از اسیدهای‌آمینه‌ضروری و پروتئین باکیفیت بالا است (۹). و این‌نتایج‌با نتایج Attia و همکاران (۲۰۱۱) هم خوانی داشت (۴). به طورکلی، ترکیب اسیدآمینه هیدرولیزهای پروتئین منعکس‌کننده‌ترکیبات‌ایزوله‌پروتئین است، که نشان می‌دهدروندهیدرولیز پروتئین‌تأثیرمنفی برترکیب اسید آمینه هیدرولیزها ندارد (۳). مشخصات اسیدآمینه هیدرولیز شده تا حد زیادی به پروتئاز مورد استفاده وابسته است. اسیدهای آمینه، رادیکال‌های آزاد را با اهدای پروتون خنثی می‌کنند، رادیکال‌های آزاد محلول در چربی (رادیکال‌های پراکسیل) که در سراسر اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده تولید می‌شوند. توسط اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین، والین، آلانین و پرولین خنثی می‌شوند (۲۲). بنابراین، می‌توان ادعا کرد که پروتئین‌های هیدرولیز شده به دلیل وجود اسیدهای آمینه مختلف ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند و همچنین اسیدهای آمینه مذکور در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود، بنابراین به نظر می رسد خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتری نیز داشته باشند.

جدول۲- ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	فلاورزایم	FAO/ WHO, 1990
هیستدین[1]	۲/۹۹	۲/٦۹	
ایزو لوسین[1,2]	۳/۹۰	٤/۲٥	۲/۸۰
لوسین[1,2]	۷/۱٥	٦/۸٥	٦/٦۰
لایزین[1]	٦/۲٥	٥/٥٥	٥/۸۰
متیونین[1,2]	۲/٥۹	۳/۰٥	
فنیل آلانین[1,2]	٤/۸۹	٤/٦٥	٦/۳۰
تروئنین[1,2]	٤/۰۹	٤/۲٥	۳/٤
والین[1]	٥/٦٥	٥/۹۸	۳/٥
آرژنین[1]	٦/۹۹	۷/۲۱	
آسپارتیک اسید	۹/۳٥	۹/۱۱	
پرولین[2]	٥/۰٥	٤/۸۹	
سرین	٤/۹٥	٥/۱٥	
آلانین[2]	۸/۷٥	۷/۹۸	
سیستئین	۰/۱٥	۰/۱۲	
گلوتامیک اسید	۱٥/٤٥	۱۳/۹۹	
تیروزین[2]	۳/۱٥	۲/۹۸	۱/۱
گلایسین	٥/۸۹	٥/۳٥	
نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه	٤٥/۷٦	٤۷/۲۹	
نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیرضروری	۰/۸۳	۰/۸۹	
میزان اسید آمینه کل	۹۷/۲٤	۹٤/۰۷	
HAA[2]	**۲/۹۹**	**۲/٦۹**	

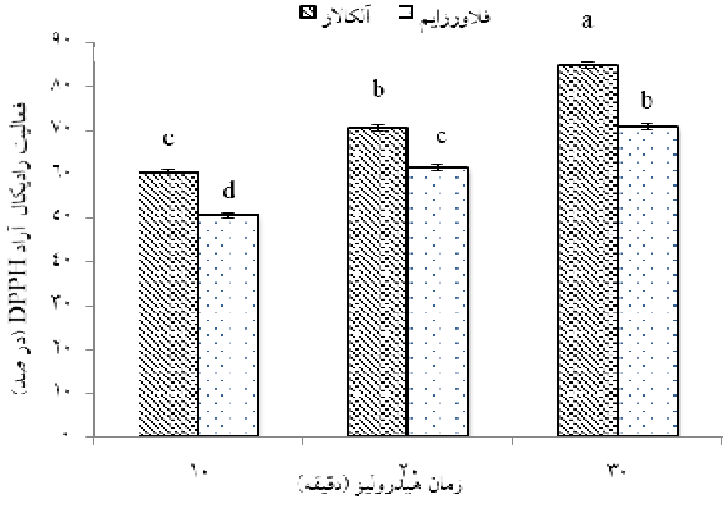
[1] اسیدآمینه ضروری

[2] مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۳-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-۳-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

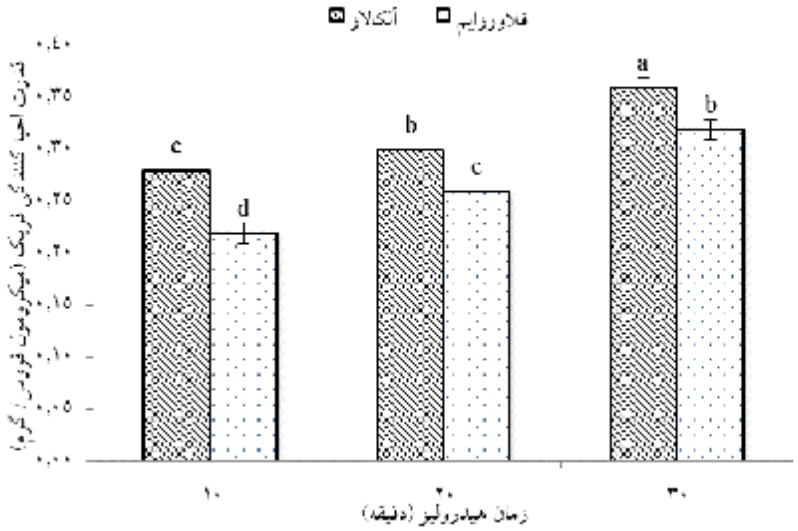
آزمون فعالیت‌رادیکال‌آزادDPPHمعمولاً برای اندازه‌گیری توانایی‌مهاررادیکال‌آزادیک‌نمونه استفاده می‌شود.DPPH ، رادیکال چربی دوستی است که دارای جذب بیشینه در طول موج۵۱۷ نانومتر می باشد که تمایل به پذیرش پروتون دارد، بنابراین، هنگامی‌که ترکیبی دارای پروتون آزاد وجود داشته باشد، همانند آنتی اکسیدان، با از بین بردن رادیکال آزاد DPPHمنجر به کاهش جذب اندازه‌گیری می‌شود. بنابراین خاصیت آنتی‌اکسیدانی چنین‌ترکیبی به عنوان توانایی آن در مهارراديكال هایDPPH بیان می شود (۲). با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده (شکل ۱) توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPH دارا بودند و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. به طوری‌که پروتئین هیدرولیزشده توسط‌آنزیم‌آلکالازبا زمان‌هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود (۸۴/۹۶ درصد). ویژگی‌آنزیم، نوع و ترکیب اسیدهای‌آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک تولید شده از طریق‌هیدرولیز از جمله دلایل اصلی فعالیت رادیکال آزاد DPPH می‌باشد. بنابراین به‌نظرمی‌رسد، آنزیم آلکالاز احتمالاً پپتیدهایی تولید می‌کند که اهداکننده الکترون یا هیدروژن هستند، که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند و محصولات پایدارتری‌ایجادکنند، واکنش زنجیره ای رادیکال را خاتمه دهند (۲۰). Karami و همکاران (۲۰۱۹) به‌بررسی‌خاصیت‌آنتی‌اکسیدانی(فعالیت‌رادیکال‌آزاد(DPPH) پروتئین‌هیدرولیزشده‌جوانه‌گندم‌توسط آنزیم پپسین، آلکالاز و پروتئیناز پرداختند، آنها نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده جوانه‌گندم دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود و همانند مطالعه حاضرخاصیت آنتی اکسیدانی توسط آنزیم آلکالاز بالاترازپروتئینازبود (۱۴). Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) نیزاعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته انگور افزایش یافت. متغیرهای مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم‌داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی‌مؤثرند. بنابراین‌ارزیابی‌پتانسیل‌آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آنها ارائه میدهد (۲۹).



شکل۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

۳-۳-۲- قدرت احیاءکنندگی‌فریک

روش‌سنجش‌قدرت‌احیای آهن پتانسیل اهدای الکترون یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی مانند پپتیدها را ارزیابی می کند که در نتیجه+Fe3به‌یون+Fe2کاهش می‌یابد.پتانسیل آنتی‌اکسیدانی یک‌ترکیب‌زیست‌فعال‌با قدرت کاهندگی‌آن ارتباط مستقیم دارد که این امر در مطالعات قبلی تایید شده است (۲، ۳۱). نتایج‌مربوط‌به‌مطالعه‌حاضرنشان‌داد(شکل ۲)تمامی‌پروتئینهای هیدرولیزشده‌توانایی‌بالایی‌برای‌قدرت احیای آهن دارا بودند دارابودن توانایی‌قدرت‌احیای‌آهن در پروتئین هیدرولیز شده سایرپروتئین‌های گیاهی‌نظیر کنجاله‌دانه‌کدو (۲۰)، بذر هویج (۳۲)،گزروغنی(*Moringa oleifera*)(۲)وگیاه آشلانتوس (*Amaranthus cruentus*) (۲۳)، نیز اعلام شد. قدرت احیاکنندگی‌یون‌آهن‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌توسط‌آنزیم‌آلکالاز بالاتربودوباافزایش‌زمان‌هیدرولیز مقادیر قدرت احیاکنندگی یون‌آهن‌افزایش‌یافت.فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود(۰/۳۶میکرومول فروس/گرم)،که این نتایج می‌تواند با این واقعیت همراه باشدکه هیدرولیز با استفاده‌ازآنزیم‌های‌مختلف‌ممکن‌است باعث تولید پپتیدهایی با طول وساختارهای مختلف و متعاقباً پتانسیل‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی شود. آلکالاز یک آنزیم با خاصیت گسترده است، که می‌تواند پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره پپتید جداکند و باعث آزادشدن پپتیدهای الیگو/ پلی زنجیره‌کوتاه یا متوسط حاوی آمینواسیدهای آب‌گریز مانند فنیل آلانین، تروئنین، لوسین، متیونین و والین می‌باشد (۲۰). همچنین با افزایش‌زمان‌هیدرولیزو کاهش‌اندازه‌پپتیدهای‌تولیدی‌برقابلیت حذف‌رادیکال‌های‌آزادتوسط‌پپتیدهاافزوده‌شد.نتایج‌مشابهی توسط Varedesaraوهمکاران(۲۰۲۱) در ارتباط با پروتئین هیدرولیزشده هسته انگور مشاهده شد آنها نیزاعلام‌نمودندبا افزایش‌زمان‌هیدرولیزمقادیرقدرت‌احیای‌آهن‌افزایش یافت و آنزیم‌آلکالازدارای‌قدرت‌احیای‌آهن بالاتری نسبت به‌آنزیم فلاورزایم بود (۲۹).

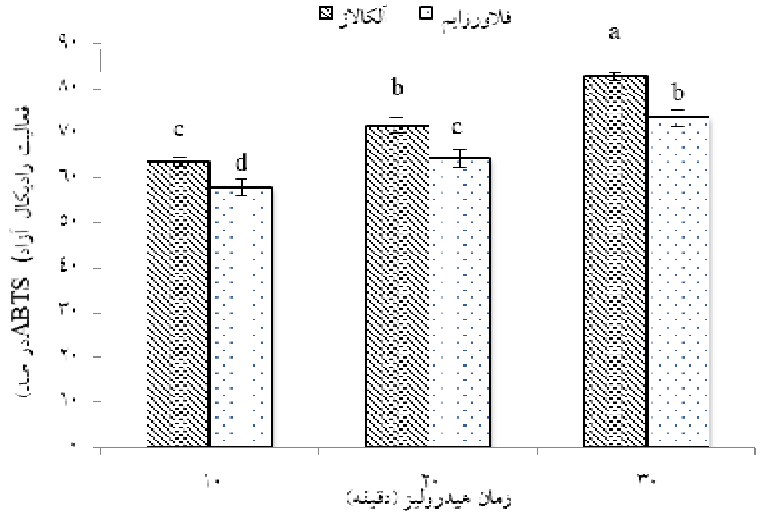


شکل۲- مقادیرقدرت احیاکنندگی‌آهن

۳-۳-۳- فعالیت رادیکال آزاد ABTS

ارزیابی‌مهار رادیکال محلول در آب ABTS یکی دیگراز شاخص‌های‌تعیین‌قدرت‌ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اثر فرآیند هیدرولیزآنزیمی‌براین‌شاخص است. عملکرد هرآنزیم از نظر نوع‌رهایش‌اسیدهای‌آمینه‌خاص(لیپوفیل‌یاهیدروفیل)می‌تواند برمهاررادیکال‌های‌آزادمؤثر باشد. این پپتیدها از طریق اهداء اتم هیدروژن به رادیکال های آزاد موجب توقف با کاهش سرعت‌فرآیند اکسیداسیون می شوند. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل ۳) تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد ABTS دارا بودند

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. به طورکلی، همه پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی پپتیدها هستند که اهداکننده هیدروژن بودند و می‌توانند با رادیکال‌ها برای تبدیل محصولات غیرقابل پیش‌بینی واکنش نشان دهند، بنابراین واکنش زنجیره رادیکال را خاتمه می دهند. با وجود چندین اتم هیدروژن و اسیدهای‌آمینه اهداکننده الکترون برای برخی پپتیدها، امکان انجام فعالیت‌ها بر اساس مکانیسم‌های واکنش چندگانه وجود دارد (۲). دارابودن‌توانایی‌حذف‌رادیکال‌آزاد ABTS در پروتئین‌هیدرولیزشده سایر پروتئین‌های گیاهی بذر هویج (۳۲)، گزروغنی (*Moringa oleifera*) (۲)، جوانه‌گندم (۱۴)وگیاه‌آشلانتوس(*Amaranthus cruentus*) (۲۳)، نیز گزارش شده است.



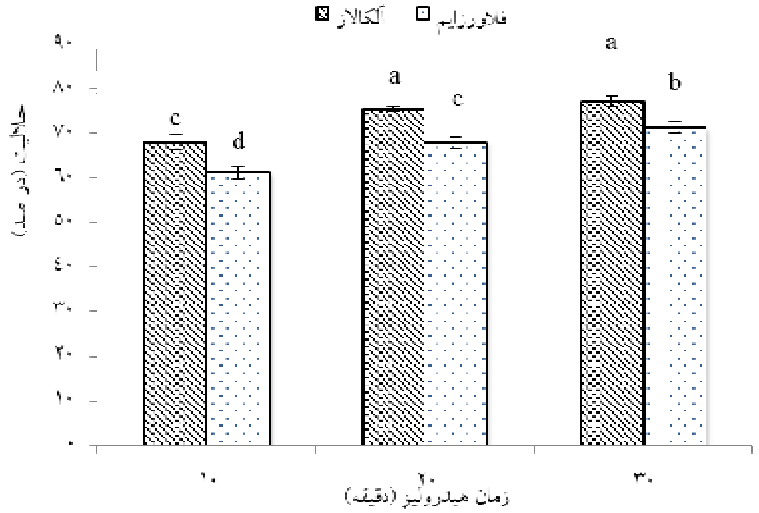
شکل۳- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS

۳-٤- خواص عملکردی

۳-٤-۱- حلالیت

ازبین‌تمام‌خواص‌عملکردی‌پروتئین‌ها، حلالیت بیشترین تأثیر را در ارتباط باسودمندی‌پروتئین‌هیدرولیزشده درسیستم های غذایی را نشان می‌دهد. سایر خصوصیات خواص عملکردی مانندکف و امولسیون‌وویژگی‌های‌ژل‌سازی‌معمولاً به محلول بودن‌پروتئین‌درمحیط‌مربوطه‌نیازدارند.بنابراین،به‌نظرمی‌رسد، پروتئین‌های‌نامحلول‌پتانسیل‌کاربردبسیارکمی‌درموادغذایی دارند(۳۰). با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های‌هیدرولیزشده ازحلالیت(شکل۴)بالایی‌برخوردار بودند و حلالیت پروتئین هیدرولیزشده‌توسط‌آنزیم‌آلکالازدرتمامی‌زمان‌های‌هیدرولیز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر حلالیت افزایش یافت.به‌طوری‌که پروتئین‌هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز با زمان‌هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین حلالیت را دارا بود اما با زمان۲۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشت. هیدرولیزآنزیمی به‌طوربالقوه‌باعث‌افزایش‌گروه‌های‌پروتئین‌قطبی‌و یونیزاسیون می‌شودکه‌می‌توانندپیوندهای‌هیدروژنی‌قوی‌تر با آب تشکیل تشکیل دهند. در نتیجه، پروتئین‌ها پس از هیدرولیز حلالیت بالاتری دارد(۱۶). بنابراین تفاوت در حلالیت پروتئین های هیدرولیزشده به اندازه پپتید، تعادل آب‌گریزی آب‌دوستی وهمچنین‌بارپپتیدهای‌تولیدشده‌درطول هیدرولیز بستگی‌دارد. حلالیت بالای پروتئین هیدرولیزشده‌ی، یک ویژگی مفید برای بسیاری از موادغذایی محسوب می‌شود (۲۸). علاوه بر این،پروتئین‌های‌بزرگتر(طول‌زنجیره‌پپتیدی‌بلندتر)به‌طورکلی دارای‌حلالیت کمتری نسبت به کوچکترها دارد زیرا کاهش آنتروپی هنگام ته‌نشینی برای این پروتئین‌ها (پپتیدها) کمتر است. همان‌طورکه ذکر شد با افزایش زمان هیدرولیز طول زنجیره‌پپتیدی‌کاهش می‌یابد همچنین پروتئین‌های حاصل از

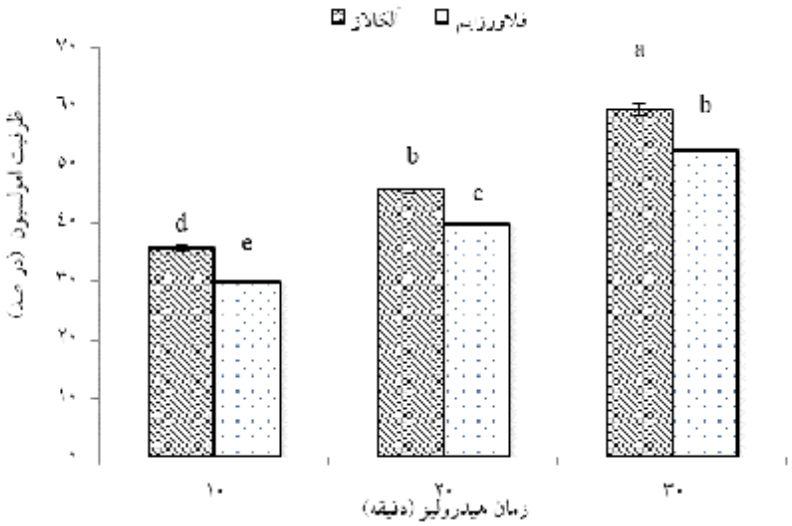
آنزیم‌آلکالازنیزطول‌زنجیره‌پپتیدی‌کوتاهتری‌داشتند، بنابراین پروتئین‌ها حلالیت بالاتری نیز دارند(۳۰). Ma و همکاران، (۲۰۱۸) نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، حلالیت پروتئین ازهیدرولیزآنزیمی پروتئین‌سویا افزایش یافت (۱۶).



شکل٤-مقادیر حلالیت تیمارهای مختلف

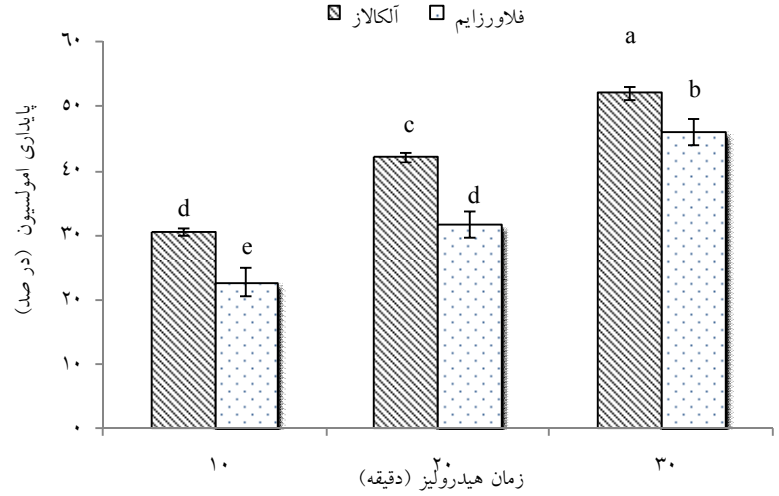
۳-٤-۲- خواص امولسیون‌کنندگی

مکانیسم‌امولسیون نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده به عنوان جذب‌قطرات‌روغن،پوشاندن‌آن‌هاوجلوگیری‌ازارتباط‌آن‌ها پس‌ازهمگن‌سازی‌تعریف‌شده‌است.درطول‌هیدرولیز،حلالیت هیدرولیزها افزایش می‌یابد و آن‌ها به حد فاصل آب-روغن منتقل‌می‌شوند(۱۷). نتایج مربوط‌به ظرفیت‌امولسیون‌کنندگی (شکل۵)وپایداری‌امولسیون‌باهم(شکل۶)،هم‌خوانی‌داشت، با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های‌هیدرولیزشده ازظرفیت امولسیون‌وپایداری‌امولسیون‌بالایی برخوردار بودند. یافته‌ها حاکی‌ازعدم‌قابلیت‌استفاده‌ازپروتئین‌های‌گیاهی‌هیدرولیزنشده باهدف‌غنی‌سازی‌وامولسیون‌کنندگی‌در محصولات مختلف غذایی‌ودرpHاسیدی‌است.Mazloomi-Kiyapeyوهمکاران (۲۰۱۹)گزارش‌نمودندکه‌ایزوله‌پروتئین‌دانه‌کدوتنبل‌ازقابلیت امولسیون‌کنندگی پایین برخوردار است (۱۷).



شکل۵-مقادیرظرفیت امولسیون تیمارهای‌مختلف

ظرفیت‌امولسیون پروتئین هیدرولیزشده و پایداری امولسیون توسط آنزیم آلکالازدرتمامی زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت امولسیون و پایداری امولسیون‌افزایش‌یافت.ازآن‌جاکه پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی‌توالی آبگریزوآب‌دوست‌هستندکه‌برای‌خواص سطحی ضروری‌می‌باشند، این‌اجزا به‌عنوان عوامل فعال سطح در نظر گرفته‌می‌شوند.درحین‌هیدرولیز،تعادل‌بین‌توالی‌های‌آبگریزو آب دوست از هیدرولیز منجر به افزایش ظرفیت امولسیون هیدرولیزمی‌شود (۱۷،۱۵). به عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیندهیدرولیز،امولسیون‌کنندگی‌پروتئین‌هاتحت‌تأثیردرجه هیدرولیزقرارمی‌گیرد وبا افزایش درجه هیدرولیز نیز ظرفیت امولسیون‌کنندگی افزایش می‌یابد.

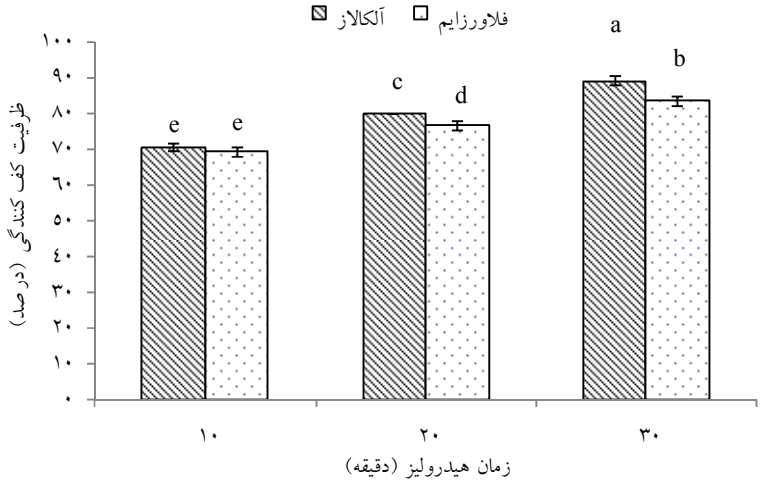


شکل٦-مقادیرپایداری‌امولسیون تیمارهای مختلف

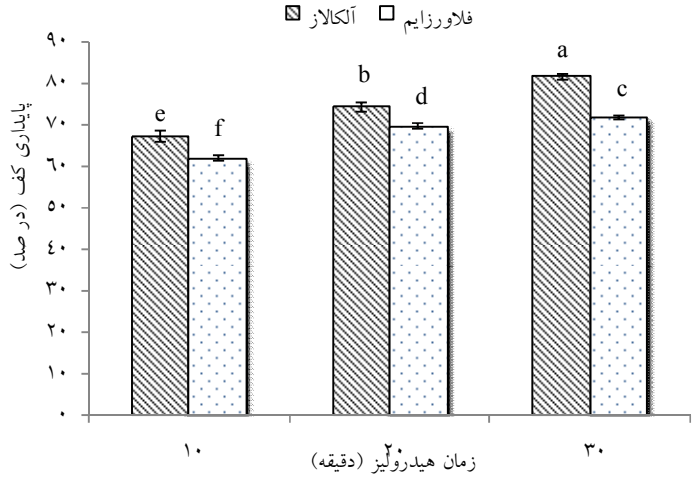
۳-٤-۳- خواص کف‌کنندگی

به‌دلیل‌فعالیت‌سطحی‌بالا،پروتئین‌هامسئول‌تولید کف‌می‌باشند. پروتئین‌های محلول‌می‌توانند کشش سطحی رابط مایع و هوا را کاهش دهند و از ارتباط حباب ها جلوگیری‌کنند. علاوه براین، مولکول‌های پروتئین می‌توانند باز شوند و با یکدیگر واکنش‌نشان‌دهند ویک فیلم پروتئینی چند لایه تشکیل دهند که منجر به انعطاف پذیری بالاتر در رابط‌آب وهوا شود. در نتیجه، شکستن حباب‌ها مشکل شده و کف مستحکم ایجاد می‌شود(۱۷). نتایج‌مربوط‌به‌کف‌کنندگی(شکل۷) و پایداری کف(شکل۸) باهم هم‌خوانی داشت. با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های‌هیدرولیزشده ازکف‌کنندگی بالایی برخوردار بودندوکف‌کنندگی‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌توسط‌آنزیم‌آلکالاز درتمامی‌زمان‌های‌هیدرولیزبالاتربود،باافزایش زمان هیدرولیز مقادیرظرفیت‌کف‌کنندگی‌افزایش‌یافت.به‌طوری که پروتئین هیدرولیزشده‌توسط‌آنزیم‌آلکالاز با زمان هیدرولیز۳۰ دقیقه بالاترین‌ظرفیت‌کف‌کنندگی‌وپایداری‌کف‌رادارابود. تحقیقات مختلفی،اثرفرآیندهیدرولیزآنزیمی‌وزمان هیدرولیز برظرفیت وپایداری‌کف‌کنندگی‌هیدرولیزشده‌های پروتئینی را بررسی کرده‌اند. عواملی مانند حلالیت پروتئین‌ها، درجه هیدرولیز، نوع پپتیدهای حاصل، قابلیت تشکیل فیلم، از موارد مؤثر بر این شاخص‌ها هستند (۷). بدین شکل که اثر افزایش درجه هیدرولیز تحت تأثیر زمان فرآیند و نوع آنزیم بر کاهش طول زنجیره پپتیدها و عملکرد آن‌ها در ایجاد و پایدارسازی کف مؤثر است. یکی از مواردی که در پایداری کف موثر است، پروفیل آمینواسید پروتئین است. وجود دو آمینواسید پرولین‌ولایزین در پروتئین‌ها موجب افزایش شمار پیوندهای هیدروژنی و متعاقب تراکم بار پروتئین می‌شود. به این طریق این‌دوآمینواسید کف‌راپایدارمی‌کنند(۱۱).بنابراین‌در پروتئین

آبکافتی که‌غلظت‌این‌دواسیدآمینه‌بالاست،پایداری کف مطلوبی‌انتظار می‌رود. در مطالعه حاضر نیز این دو اسیدآمینه در پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم‌آلکالاز بالاتر بود.



شکل۷-مقادیرکف‌کنندگی‌تیمارهای مختلف



شکل۸- مقادیر پایداری‌کف تیمارهای مختلف

٤- نتیجه‌گیری

مهم‌ترین هدف از تولید پروتئین هیدرولیزشده، استفاده از بخش‌پروتئینی‌موادغذایی،افزایش‌جذب‌وهضم این ترکیبات ازطریق‌کاهش‌اندازه‌آن‌ها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی‌آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی وعملکردی‌پپتیدهای‌به‌دست‌آمده از هیدرولیز آنزیمی جوانه گندم‌تعیین‌شد. نتایج‌مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان دادکه از میان آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، آنزیم آلکالازمی‌تواندپروتئین‌هیدرولیزی‌بادرجه‌هیدرولیز،خاصیت آنتی‌اکسیدانی‌وخواص‌عملکردی‌بالاتری‌تولیدکندو همچنین افزایش‌زمان‌هیدرولیزتأثیرمثبتی برروی‌ویژگی‌های مذکور داشت. بنابراین پروتئین هیدرولیزشده جوانه‌گندم‌می‌تواند به عنوان جایگزین پروتئین‌های‌حیوانی در رژیم غذایی مردم درکشورهای‌درحال‌توسعه‌وهمچنین‌به‌عنوان‌ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی مطرح باشند.

۵- منابع

۱. صادقیان امین، ی، صادقی ماهونک، ع، قربانی، م، اعلمی، م، و جوشقانی، ح، ۱۳۹۸. اثر زمان فرآیند بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کینوآ با آلکالاز و پانکراتین. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*،۱٤ (٤)، صص. ۱۰۲-۸۹.

2. Aderinola, T., Fagbemi, T., Enujiugha, V., Monisola Alashi, A., Emmanuel .and Aluko, R., 2018. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 10, pp.862-877.
3. Alashi, A.M., Blanchard, C.L., Mailer, R.J., Agboola, S.O., Mawson, A.J., Rong, H., Malomo, S.A., Girgih, A.T.and Aluko, R.E., 2014. Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*, 55, pp. 281–287.
4. Attia, R.S. and Abou-Gharbia, H.A., 2011. Evaluation and Stabilization of Wheat Germ and Its Oil Characteristics. Alex. *J. Fd. Sci. & Technol*, 8(2), pp.31-39.
5. Bera, M.B. and Mukherjee, R.K., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci*,54(1), pp.142-145.
6. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 14, pp. 1198-1205.
7. Chen, L., Chen, J., Ren, J. and Zhao, M., 2011. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll*, 25(5), pp. 887– 97.
8. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G. F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, pp. 301-313.
9. FAO/WHO., 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.
10. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M.J., 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, *science of food and agriculture*, 15, pp. 3165–3176.
11. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C. and Montero, M. P., 2009. Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), pp. 585-592.
12. Gomez, M., Gonzalez, J. and Oliete, B., 2012. Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. *Food Bioprocess Technology*, 5(6), pp. 2409-2418.
13. Hamzeh, A., Rezaei, M. and Khodabandeh,S. 2019., Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measure*,12, pp.721–727.
14. Karami, Z., Peighambardoust, S.H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B. and Andreu, D., 2019. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, pp.100450.
15. Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan ,W., Shahidi, F. and Hayes, K. D., 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe Trevally (*Selaroides leptolepis*). *J Food Sci*, 74(2), pp.126-133.
16. Ma, W., Qi, B., Sami, R., Jiang, L., Li, Y. and Wang, H., 2018. Conformational and Functional Properties of Soybean Proteins Produced by Extrusion-Hydrolysis Approach. *Int J Anal Chem*, 23, pp. 918-932.

(Vicia Faba) Proteins Hydrolysates Produced by Alcalase and Trypsin, *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 9(1), pp.1-10.

25. Shahidi, F. and Onodenalore, A.,1995. Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, pp. 51-54.
26. Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44, pp.668-677.
27. Taheri, A. and Bakhshizadeh, A., 2020 Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Kawakawa (*Euthynnus affinis*) Protein Hydrolysate Produced by Skipjack Tuna Pepsin. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2, pp. 148-166.
28. Tanuja, S., Viji, P., Zynudheen, A.A. and Joshy, C.G., 2012. Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egypt. J. Biol*, 14(1), pp.28–36.
29. Varedesara, M.S., Ariaii, P. and Hesari, J., 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of Lactobacillus casei in it. *Food Sci Nutr*, 9, pp. 2180–2190.
30. Wouters, A.G.B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein Hydrolysates in food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*,15, pp.786– 800.
31. Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. and Fattahi, E., 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26, pp.625–632.
17. Mazloomi-Kiyapey, S.N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E. and Nourmohammadi, E., 2015. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atheroscler*, 15(5), pp. 218-227.
18. Memarpoor-Yazdi, M., Asoodeh, A. and Chamani, J., 2012. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. *Journal of Funct Foods*, 4(1), pp.278-286.
19. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa *(Alosa caspia)* by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*,18(7), pp.950-956.
20. Nour mohammadi, E., SadeghiMahoonak, A., Alami, M. and Ghorbani, M., 2017. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein. *International Journal of Food Properties*, 20(12), pp.3244–3255.
21. 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, pp. 852-658.
22. Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M. and Rafieian-Kopaei, M., 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*,55, pp.1-10.
23. Ramkisson, A.,Shanece, D., Depika, S., Venter, S .and Mellem, J. 2020. In vitro anticancer and antioxidant potential of Amaranthus cruentus protein and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*, 40 (2), pp.634-639.
24. Samaei, S., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A. and Aalami, M., 2020. Antioxidant Activity of Faba Bean

32. Ye, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J. and Cai, T., 2018. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*, 22, pp. 1–9.
33. Zhang, J., Wen, C., Li, C., Duan, Y., Zhang, H. and Ma, H., 2019. Antioxidant Peptide Fractions Isolated from Wheat Germ Protein with Subcritical Water Extraction and Its Transport Across Caco-2 Cells. *Journal of Food Science*, 84, pp. 2139- 2146.
34. Zhu, K.X, Zhou, H.M. and Qian, H., 2006. Antioxidant and free radicalscavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemisrty*, 41, pp. 1296–1302.

(Original Research Paper)

Evaluation of Antioxidant and Functional Properties of Hydrolyzed Protein with Enzymatic Hydrolysis of Wheat Germ Protein

Sakineh Ghelich[1], Peiman Ariayi[2]*, Mohammad Ahmadi[3]

1-Ph.D student of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received:20/09/2021 Accepted:03/11/2021

Abstract

The bioactive peptides in the hydrolyzed protein have led to high antioxidant activity and good functional properties in these proteins. The aim of this study was to produce hydrolyzed protein from wheat germ and analyze its antioxidant and functional properties. For this purpose, hydrolyzed wheat germ protein was produced by commercial enzymes alcalase and flavourzyme enzyme (Optimal pH of alcalase activity 8.5, flavourzyme 7) at intervals of 10, 20 and 30 minutes. Degrees of hydrolysis, functional properties including solubility, foaming and emulsifying properties, as well as antioxidant properties including free radical scavenging DPPH and ABTS and ferric reducing power weسre measured. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase had a higher degree of hydrolysis than the enzyme flavourzyme. Also, increasing the hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ($p < 0.05$). The highest values of hydrolysis by alcalase were observed in 30 minutes (28.26%) and this treatment had the highest antioxidant activity and functional properties ($p < 0.05$). In general, it can be said that hydrolyzed protein from wheat germ (by alcalase enzyme) has the best functional and antioxidant properties and therefore can be used as a substitute for animal based protein in the diet as well as active ingredients in food formulations.

Keywords:Hydrolyzed Protein, Commercial Enzymes, Wheat Germ, Antioxidant, Functional Properties.

*Corresponding Author: p.aryaye@yahoo.com