www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1394، جلد 4، شماره 3، صفحات 282 – 271
DOI: 10.22101/JRIFST.2015.11.22.437

JRIFST

تولید پپتیدهای زیست فعال با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از کنسانتره پروتئین آب پنیر

شیما پیری قشلاقی[1*]،علیرضا صادقی ماهونک[2]، محمد قربانی[2]، مهران اعلمی[2]

1- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
* نویسنده مسئول (shima_piri1366@yahoo.com)
2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: 93/10/12
تاریخ پذیرش: 94/04/15

واژه‌های کلیدی
آلکالاز
پپتید زیست فعال
شرایط هیدرلیز
فعالیت آنتی‌اکسیدانی

چکیده

در تحقیق حاضر پروتئین هیدرولیز شده از کنسانتره پروتئین آب پنیر با بکارگیری آنزیم آلکالاز تولید شد. اثر متغیرهای دما (40، 45، 50 و 55 درجه سانتی‌گراد)، زمان (30، 60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (30، 60 و 90 واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده آب پنیر توسط آزمون‌های قدرت احیاءکنندگی و فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن اندازه‌گیری شد. بالاترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در دما و فعالیت آنزیمی به ترتیب 50 درجه سانتی‌گراد و 60 واحد آنسون بر کیلوگرم و در زمان هیدرولیز 90 دقیقه به میزان 87/2 درصد به‌دست آمد. بالاترین قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده نیز در دمای 40 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیمی90 واحد آنسون بر کیلوگرم و در زمان هیدرولیز 210 دقیقه و به میزان 0/435 حاصل شد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک 100ppm، 57/08 درصد قدرت احیاءکنندگی از خود نشان داد. نتایج نشان می‌دهد که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در فرمولاسیون غذایی و نیز به‌عنوان ترکیب دارویی به‌کار گرفته شوند.

مقدمه

اکسیداسیون لیپیدها یکی از نگرانی‌های بزرگ صنعت مواد غذایی و مصرف کنندگان است زیرا موجب توسعه طعم و بوی نامطلوب و تولید محصولات سمی می‌شود. همچنین نقش مهمی در ایجاد برخی بیماری‌ها دارد که عامل این بیماری‌ها پراکسیدهای چربی و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مرحله نهایی واکنش اکسیداسیون می‌باشند (Lin & Liang, 2000). از این‌رو به‌منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که از پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد درسلول‌های زنده و محصولات غذایی جلوگیری شود. آنتی‌اکسیدان‌ها با به تأخیر انداختن اکسیداسیون، تخریب و تغییرات نامطلوب رنگ، به‌منظور حفظ محصولات غذایی استفاده می‌شوند (Li *et al.*, 2008). بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به‌عنوان مکمل‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند اگرچه این آنتی‌اکسیدان‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از خود نشان می‌دهند ولی استفاده از این ترکیبات شیمیایی به دلیل آسیب به DNA و سمیت محدود شده است (Ito *et al.*, 1986). در سال‌های اخیر علاقه زیاد به پیدا کردن آنتی‌اکسیدان‌های جدید از منابع طبیعی برای استفاده در غذاها و مواد دارویی به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی منجر به تحقیقاتی در زمینه

بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ای از قبیل پروتئین سویا (Lee *et al.*, 2008)، کازئین (Gómez-Ruiz *et al.*, 2008)، پروتئین سفیده تخم مرغ (Davalos *et al.*, 2004)، پروتئین‌های گوشت و ماهی (Je *et al.*, 2007)، آب پنیر (Recio & Visser, 1999) و غیره شده است. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی عملکردهای فیزیکو-شیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند. این پپتیدها در اندازه‌های 2 تا 20 اسیدآمینه و جرم مولکولی کمتر از 6000 دالتون می‌باشند (Sarmadi & Ismail, 2010). آلکالاز یک آنزیم قلیایی تولید شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس*[1] است که در فرمولاسیون-های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرد. به‌طور کلی آنزیم Alcalase® 2.4 L به‌دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیزشده با درجه هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است (Ovissipour *et al.*, 2010). قابلیت آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌های هیدرولیز شده به تأثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل به‌عنوان شلاته‌کننده فلزات، خاموش‌کننده اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن می‌باشد (Li *et al.*, 2008). آب پنیر یکی از محصولات جانبی کارخانجات لبنی است که به مقدار فراوان و با هزینه پایین تولید می‌شود و دارای خواص تغذیه‌ای، عملکردی و بیولوژیکی بالا است. فعالیت آنتی-اکسیدانی آب پنیر از اسید آمینه سیستئین که در سنتز گلوتاتیون (GSH)[2] شرکت می‌کند ناشی می-شود (Walzem *et al.*, 2002). ترکیب α-لاکتو-آلبومین آب پنیر نیز فلزات سنگین را شلاته می‌کند و خطر اکسایش را کاهش می‌دهد زیرا خاصیت شلاته-کنندگی یون آهن را داراست (Ha *et al.*, 2003).

[1] *Bacillus licheniformis*
[2] Glutathione

هدف از این پژوهش بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++}) و نیز قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده از کنسانتره پروتئین آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز در شرایط مختلف دمایی، آنزیمی و در زمان‌های مختلف هیدرولیز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز (اندو پروتئیناز[3] گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی-فورمیس* با فعالیت مشخص 2/4 واحد آنسون بر گرم (یک واحدآنسون[4] عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک میلی‌اکی‌والان اسید آمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای 25 درجه سانتی‌گراد و pH=7/5) و دانسیته 1/18 گرم بر میلی‌لیتر، استفاده شد (Aspmo *et al.*, 2005). این آنزیم از شرکت سیگما (اسپانیا) تهیه شد و تا زمان آزمایش در 4 درجه‌سانتی‌گراد نگهداری‌گردید. کنسانتره پروتئین آب پنیر در آبان 1392 از کارخانه پگاه مشهد تهیه گردید. فروزین[5]، فری سیانید پتاسیم، تری‌کلرواستیک اسید، کلرید آهن، اتانول، تریس[6]، اسید هیدروکلریدریک و اسید آسکوربیک از شرکت مرک، مونو سدیم فسفات، دی سدیم فسفات، اسید سولفوریک، هگزان و سود پرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیزشده کنسانتره پروتئین آب پنیر

ابتدا نمونه کنسانتره با آب به نسبت 1 به 20 (نمونه کنسانتره به آب) به حالت سوسپانسیون یکنواخت در آمده، سپس بافر تریس-اسید کلریدریک به نسبت 1 به 5 (نمونه کنسانتره به بافر) به آن اضافه شد. در انتها آنزیم آلکالاز در pH=8 که با کمک بافر تنظیم شد و مناسب برای فعالیت آنزیم بود به مخلوط اضافه

[3] Endoproteinase
[4] Anson unit
[5] Ferrozine
[6] Tris

گردید. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های 100 میلی-لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[1] مدل VS-8480) و با دور ثابت 200 دور در دقیقه و در دمای مورد نظر برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم، با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای 85 درجه‌سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه واکنش آنزیمی به اتمام رسانیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به سرعت سرد شد. سپس سوسپانسیون برای جمع‌آوری سوپرناتانت در سانتریفیوژ یخچال‌دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل[2]، مدل Combi - 514R) با دور 6700×g در دمای 10 درجه‌سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه قرار گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009). به‌منظور یافتن دامنه مناسب شرایط هیدرولیز، ابتدا تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای 40، 45، 50 و 55 درجه‌سانتی‌گراد و زمان‌های 30، 60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه و فعالیت‌های آنزیمی 30، 60 و 90 واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین انجام شد.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

به‌منظور تعیین رطوبت، 5 گرم از نمونه روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده قرار داده شد (AOAC, 2000). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال با در نظر گرفتن ضریب نیتروژن 6/25 استفاده شد (AOAC, 2000). میزان خاکستر با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (ساخت آلمان، شرکت نابرترم[3]، مدل FX118-30) در دمای 550 درجه‌سانتی‌گراد تعیین گردید (AOAC, 2000).

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++})

4/7 میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده با 0/1 میلی‌لیتر از محلول 2 میلی‌مولار کلرید آهن II و 0/2 میلی‌لیتر فروزین 5 میلی‌مولار مخلوط گردیده و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. در انتها جذب در طول موج 562 نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به‌جای نمونه از آب مقطراستفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی از رابطه زیر به‌دست آمد (Nalinanon *et al.*, 2011)

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی (درصد)} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

آزمون قدرت احیاءکنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیزشده در احیای آهن III به روش Bougatef و همکاران (2009) صورت پذیرفت. برای این منظور 1 میلی‌لیتر از نمونه محلول هر کدام از نمونه‌ها با 2/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات 0/2 مولار (pH= 6/6) و 2/5 میلی‌لیتر از فری‌سیانیدپتاسیم 1 درصد مخلوط شد. مخلوط در 50 درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت 30 دقیقه انکوبه شده و سپس 2/5 میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرو استیک اسید 10 درصد (وزنی - حجمی) به آن اضافه‌گردید. مخلوط در 1650×g برای 10 دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت 2/5 میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر از محلول 0/1 درصد (وزنی-حجمی) کلریدآهن مخلوط شد. بعد از 10 دقیقه واکنش جذب محلول حاصل در 700 نانو-متر قرائت شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، بیانگر افزایش قدرت احیاءکنندگی آن می‌باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شد و اثر متغیرهای دما (در سطوح 40، 45، 50 و 55 درجه سانتی‌گراد)، زمان (در سطوح 30، 60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه) و میزان آنزیم (در سطوح 30، 60 و 90 واحد آنسون) در سه تکرار بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان 95 درصد صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزارSAS[4]و رسم نمودارها با نرم افزار اکسل[5] انجام شد.

[1] Vision
[2] Hanil
[3] Nabertherm
[4] SAS, 9.2 (32) (English)
[5] Microsoft Excel 2007

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه

در ابتدای آزمایش درصد رطوبت، خاکستر و پروتئین بر اساس وزن مرطوب[1] اندازه‌گیری شد. نتایج در جدول 1 آورده شده‌اند.

جدول 1- ترکیبات شیمیایی کنسانتره پروتئین آب پنیر

	پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)	چربی (درصد)
کنسانتره پروتئین آب پنیر	82±0/39	13± 0/33	2/6 ± 0/18	0

ارزیابی میزان فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++})

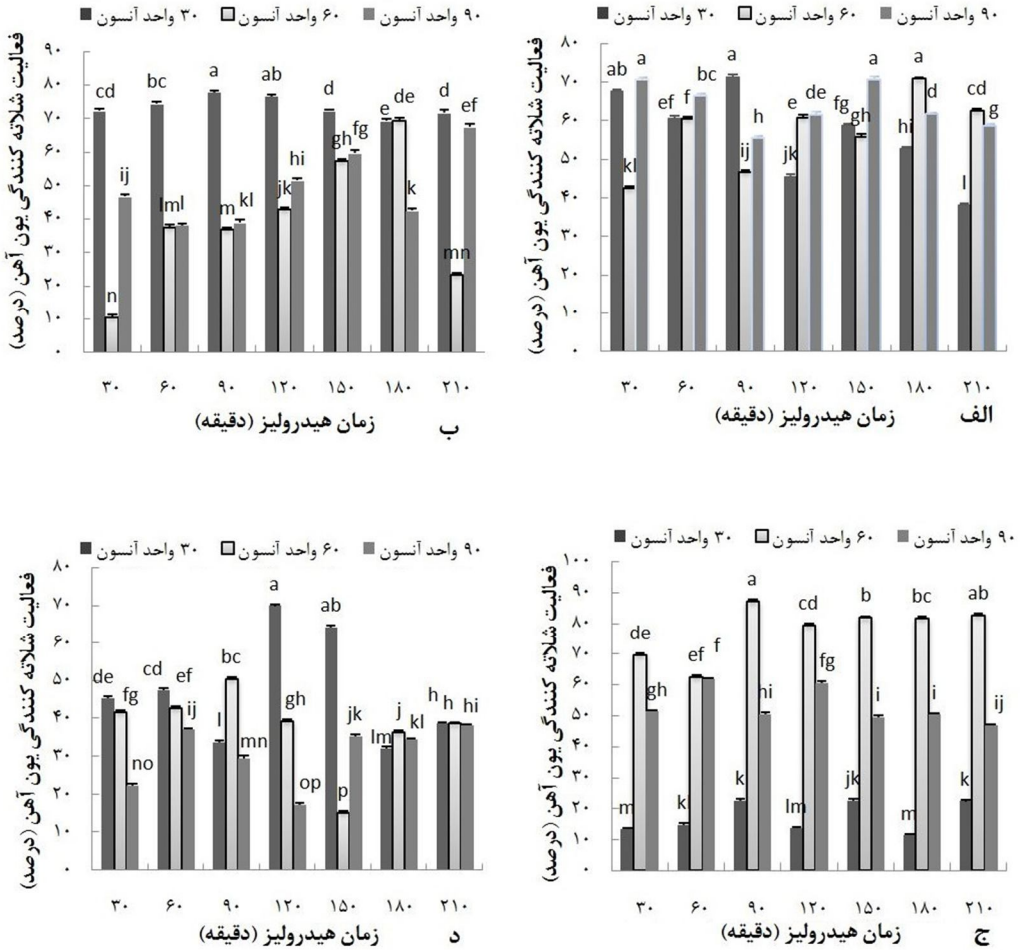
یون آهن (Fe^{++}) یکی از قوی‌ترین پرواکسیدان‌ها در بین یون‌های فلزی است که منجر به آغاز و سرعت‌بخشی به اکسیداسیون چربی با دخالت پراکسید هیدروژن در واکنش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل می‌گردد (Yomauchi *et al.*, 1988). به غیر از آهن فلزات دیگری مثل Cu و Co می‌توانند بر سرعت اکسیداسیون لیپید مؤثر باشند. از این‌رو، چلاته‌شدن یون‌های فلزی با پپتید‌های حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها می‌تواند واکنش اکسیداسیون را به تأخیر اندازد (Khantaphant *et al.*, 2011). فروزین یک کمپلکس بنفش رنگ با یون آهن (Fe^{++}) تشکیل می‌دهد. تشکیل این کمپلکس در حضور یک عامل چلاته‌کننده دچار اختلال شده در نتیجه رنگ بنفش ایجاد شده کم‌رنگ‌تر خواهد بود (Je *et al.*, 2009). بر طبق نتایج حاصل از جدول 2 عامل زمان، دما و میزان فعالیت آنزیم و همچنین اثر متقابل آنها اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن داشت (P<0/05). فعالیت شلاته‌کنندگی میان دماهای مختلف اختلاف معناداری داشت (P<0/05). با افزایش دمای هیدرولیز، میانگین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن روند تقریباً کاهشی داشت، به‌طوری‌که بیشترین میانگین فعالیت مهارکنندگی یون آهن در دمای 40 درجه سانتی‌گراد (59/03 درصد) و کمترین آن در دمای 55 درجه سانتی‌گراد (38/54 درصد) بود (جدول 3). فعالیت شلاته‌کنندگی میان آنزیم‌های مختلف نیز اختلاف معناداری داشت (P<0/05). با افزایش فعالیت آنزیمی میانگین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن از روند مشخصی پیروی نکرد. بین زمان 60 و 90 دقیقه اختلاف معناداری مشاهده نشد (P>0/05). بالاترین میانگین مقدار فعالیت شلاته‌کنندگی مربوط به زمان 150 دقیقه (53/58 درصد) و کمترین مقدار آن در زمان 30 دقیقه (46/13 درصد) بود (جدول 3). در دمای 45 درجه سانتی‌گراد در تمام زمان‌های مورد آزمایش (به غیر از 180 دقیقه) بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و کمترین مقدار آن به‌ترتیب در فعالیت آنزیمی 30 و 60 واحد آنسون بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 1- ب)، عکس این قضیه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد صادق بود، در این دما در تمام زمان‌های مورد آزمایش بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و کمترین مقدار آن به ترتیب در فعالیت آنزیمی 60 و 30 واحد آنسون بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 1-ج). در دمای 40 درجه سانتی‌گراد نیز در زمان‌ها و غلظت‌های مختلف آنزیم فعالیت شلاته‌کنندگی از روند مشخصی پیروی نکرد (شکل 1-الف). از میان تمام تیمارهای مورد آزمایش بالاترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (87/2 درصد) در دمای 50 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیمی 60 واحد آنسون بر کیلوگرم و زمان هیدرولیز 90 دقیقه به‌دست آمد (شکل 1-ج). این نتیجه مشابه Gimenez و همکاران (2009) در مطالعه پروتئین هیدرولیزشده پوست سول[2] و اسکوئید می‌باشد که آنها نیز به مقادیر بالای 80 درصد جهت این منظور دست یافتند. Gimenez و همکاران (2009) گزارش نموده‌اند که گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و اسیدهای آمینه بازی (آرژینین، هیستیدین و لایزین) در شلاته نمودن یون‌های فلزی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند. دلیل ایجاد پپتیدهایی با فعالیت شلاته‌کنندگی متفاوت در دما، فعالیت آنزیمی و زمان‌های مختلف در این پژوهش را می‌توان این‌گونه استنباط کرد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای

[1] Wet basis

[2] Sole

زیست فعال به‌طور ویژه تحت تأثیر ترکیب آمینواسید-های تشکیل دهنده، شکل و ساختمان ویژه پپتیدها، شرایط واکنش، نوع پروتئاز مورد استفاده و میزان درجه هیدرولیز قرار دارند (Calderon *et al*., 2000). پروتئین هیدرولیز شده آفتابگردان بعد از هضم توسط فلاورزایم و آلکالاز در مهار اکسیداسیون بتاکاروتن توسط مس نقش دارد (Megias *et al*., 2007).

همچنین پپتیدهای هیدرولیز شده از ماهی *silver carp* که با استفاده از آنزیم‌های مختلف تولید شدند دارای فعالیت شلاته‌کنندگی بیشتر از 93 درصد در پپتیدهای نهایی با غلظت 5 mg/mL بودند که به فاکتورهایی مثل درجه هیدرولیز و نوع آنزیم وابسته بود (Dong *et al*., 2008).



شکل 1- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده آب‌پنیر در فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف. الف) دمای 40 درجه سانتی‌گراد، ب) دمای 45 درجه سانتی‌گراد، ج) دمای 50 درجه سانتی‌گراد، د) دمای 55 درجه سانتی‌گراد

جدول 2- آنالیز واریانس فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چهار سطح دما، سه سطح آنزیم و هفت سطح زمان

		میانگین مربعات	
منابع تغییرات	درجه آزادی (DF)	فعالیت شلاته‌کنندگی	قدرت احیاءکنندگی
آنزیم	2	507/74**	0/046**
دما	3	4831/74**	0/ 7**
زمان	6	190/50**	0/014**
دما*آنزیم	6	9055/033 **	0/1**
آنزیم*زمان	12	414/28 **	0/0017**
دما*زمان	18	164/66 **	0/006**
دما*آنزیم*زمان	36	407/31 **	0/0021**
خطا	168	0/3290	0/0000125
ضریب تغییرات	1/14		2/12

**، *، ns به ترتیب معنی‌داری در سطح 1٪ و 5٪ و غیرمعناداری

در بررسی قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده ماهی هیک اقیانوس آرام[1] (*Merluccius productus*)، فعالیت شلاته‌کنندگی 7 تا 46 درصد را ثبت نمودند (Samaranayaka *et al.*, 2008). فعالیت شلاته‌کنندگی 60 درصد را از پروتئین هیدرولیزشده ماهی *اسکاد* حلقوی (*Decapterusmaruadsi*) حاصل شد (Thiansilakul *et al.*, 2007). جهت مقایسه از محلول EDTA، 2 میلی‌مولار استفاده شد و درصد چلاته‌کنندگی آن 92/45 درصد محاسبه گردید که نسبت به تمامی تیمارها تفاوت کاملاً معنی‌داری از خود نشان می‌دهد.

قدرت احیاءکنندگی

عامل زمان، دما و میزان فعالیت آنزیم اثر معنی‌داری بر میزان قدرت احیاءکنندگی داشت ($P<0/05$)، همچنین اثر متقابل دما، زمان و آنزیم بر میزان قدرت احیاءکنندگی کاملاً معنادار بود (جدول 2). با افزایش دمای هیدرولیز میانگین قدرت احیاءکنندگی روند تقریباً کاهشی داشت که این مطلب مشابه فعالیت شلاته‌کنندگی بود، به‌طوری که بیشترین میانگین فعالیت مهارکنندگی یون آهن در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و به میزان 0/3 حاصل شد (جدول 3) که این یافته‌ها با کار محققان دیگر همخوانی دارد (Mohamadi *et al.*, 2014). فعالیت احیاءکنندگی میان آنزیم‌های مختلف اختلاف معناداری داشت ($P<0/05$). با افزایش فعالیت آنزیمی میانگین فعالیت احیاءکنندگی روند مشخصی نداشت. بیشترین میانگین مقدار آن در فعالیت آنزیمی 90 واحد آنسون بر کیلوگرم و به میزان 0/182 و کمترین مقدار آن در فعالیت آنزیمی 60 واحد آنسون بر کیلوگرم و به میزان 0/014 به‌دست آمد (جدول 3). بین دمای 180 و 210 دقیقه اختلاف معناداری مشاهده نشد ($P>0/05$). بالاترین میانگین مقدار این صفت در زمان 210 دقیقه و به میزان 0/191 و کمترین مقدار آن در زمان 30 دقیقه و به میزان 0/137 حاصل شد (جدول 3). در دمای 45 درجه سانتی‌گراد در تمام زمان‌های مورد آزمایش (به غیر از 120دقیقه) بیشترین قدرت احیاءکنندگی و کمترین مقدار آن به ترتیب در فعالیت آنزیمی 30 و 60 واحد آنسون بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 2-ب). در دمای 50 درجه سانتی‌گراد عکس این مطلب صادق است. در دمای 40 درجه سانتی‌گراد نیز در تمام زمان‌های مورد آزمایش بیشترین مقدار آن به‌ترتیب در فعالیت آنزیمی 90 واحد آنسون بر کیلو-گرم حاصل شد و کمترین مقدار آن در فعالیت آنزیمی 30 واحد آنسون بر کیلوگرم مشاهده شد (شکل 2-الف). به‌منظور مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت 100 قسمت در میلیون به‌عنوان یک عامل احیاءکننده استفاده شد (Jayaprakasha *et al.*, 2001) که جذب

[1] Pacific hake

نمونه مربوط به آن در طول موج 700 نانومتر 0/762 به‌دست آمد، بین میانگین جذب تمامی نمونه‌ها و جذب نمونه‌ها با تیمار اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌دار وجود داشت (P<0/05) و بالاترین قدرت احیاء-کنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده از میان تمام تیمارهای مورد آزمایش در دما و فعالیت آنزیمی به ترتیب 40 درجه سانتی‌گراد، 90 واحد آنسون بر کیلو-گرم، در زمان هیدرولیز 210 دقیقه و به میزان 0/435 به‌دست آمد (شکل 4-a) که در مقایسه با اسیدآسکوربیک 100 قسمت در میلیون 57/08 درصد قدرت احیاءکنندگی از خود نشان داد. برای مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده از محلول اسید آسکوربیک به‌عنوان یک عامل احیاءکننده استفاده شد. به این صورت که غلظت‌های مختلف ppm 100، 200، 300 و 400 از اسید آسکوربیک و پروتئین هیدرولیزشده (منظور از شرایط بهینه شرایطی است که بیشترین مقدار احیاءکنندگی به دست آمد) تهیه شد. سپس آزمون قدرت احیاء-کنندگی بر روی غلظت‌های مختلف نمونه و استاندارد صورت پذیرفت و جذب نمونه‌ها در طول موج 700 نانومتر به‌دست آمد و با محلول استاندارد مقایسه گردید (جدول 4). بین میانگین جذب تمامی نمونه‌ها و جذب نمونه‌ها با تیمار اسیدآسکوربیک تفاوت معنی-دار وجود داشت (P<0/05). در تمامی غلظت‌های تهیه شده قدرت احیاءکنندگی اسید آسکوربیک از پروتئین هیدرولیزشده بیشتر بود اما پروتئین هیدرولیزشده نیز از قدرت احیاءکنندگی خوبی برخوردار بود. با مقایسه غلظت ppm 400 نمونه و استاندارد مشاهده گردید که این غلظت از نمونه حدود 44/71 درصد قدرت احیاءکنندگی از خود نشان داد. با بررسی اثر درجه هیدرولیز بر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بادام دریافتند که با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌ها (از 10 تا 40 درصد) توسط آنزیم آلکالاز فعالیت شلاته-کنندگی یون آهنII[1] و زدودن رادیکال‌های DPPH افزایش می‌یابد، درحالی‌که قدرت احیاءکنندگی روند کاهشی ازخود نشان داد (Jamdar *et al*., 2010).

نتایج قبلی نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی *round scad* احتمالاً حاوی آمینواسیدها یا پپتیدهایی باشد که به‌عنوان اهداءکننده الکترون عمل می‌کنند و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهد و محصولات پایدارتری را ایجاد کند. همه هیدرولیزشده‌هایی که توسط پپسین و تریپسین هضم شدند دارای قدرت احیاءکنندگی بیشتری نسبت به پروتئین‌های اولیه هستند. این می‌تواند به‌دلیل تولید زنجیره‌های پپتیدی کوتاه‌تر بعد از هیدرولیز آنزیمی باشد (Kong *et al*., 2007). با هیدرولیز آنزیمی پروتئین کلزا، پروتئین‌های هیدرولیزشده آن را (RPH[2]) تهیه نموده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را با روش‌های زدودن رادیکالی DPPH/سوپراکسید/هیدروکسیل و آزمون قدرت احیاءکنندگی تعیین نمودند. RPH فعالیت زدودن رادیکال‌های DPPH/سوپراکسید/هیدروکسیل را از خود نشان داد. به‌علاوه RPH قدرت احیاءکنندگی قابل‌توجهی از خود نشان داد (Pan *et al*., 2011). در پژوهشی پروتئین محلول در حین فراوری پروتئین تغلیظ‌شده سویا را با اولترافیلتراسیون بازیافت نموده و در معرض هیدرولیز آنزیمی با یک پروتئاز تجاری قرار دادند. هیدرولیزشده‌ها اجزایی با جرم مولکولی نسبتاً بالایی بودند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها مورد بررسی قرارگرفت. اجزاء با وزن مولکولی کمتر از 10 کیلو-دالتون بالاترین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت آنتی-اکسیدانی را در تمام روش‌های سنجش قدرت آنتی-اکسیدانی مورد بررسی از خود نشان دادند (Moure *et al*., 2006). Mohamadi و همکاران (2014) با بررسی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استخراج‌شده از میوه زرشک بی‌دانه دریافتند که قدرت احیاءکنندگی با افزایش دما از 120 به 180 درجه سانتی‌گراد کاهش می‌یابد.

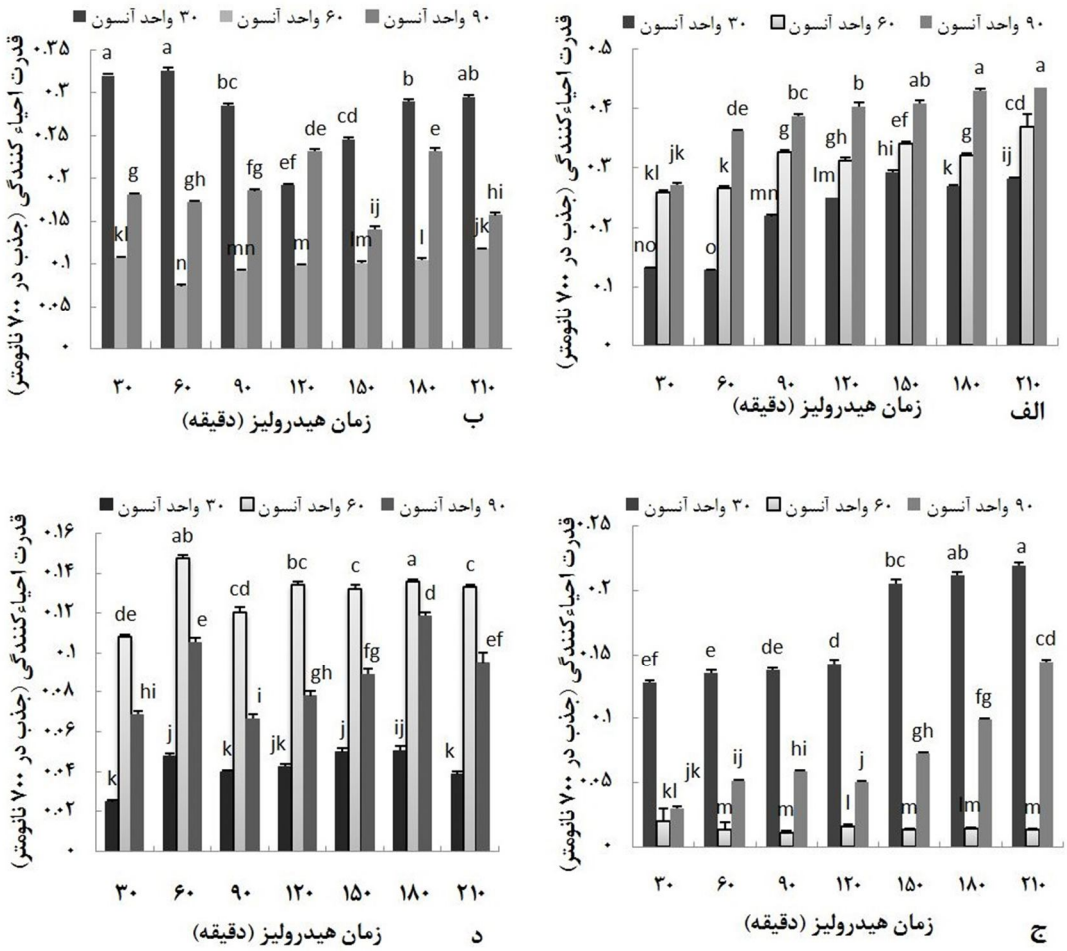
[1]Ferrous

[2]Rapeseed Protein Hydrolysates

جدول 3- نتایج مقایسه میانگین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در چهار سطح دما، سه سطح آنزیم و هفت سطح زمان

	تیمار	فعالیت شلاته‌کنندگی	قدرت احیاءکنندگی
دما	40°C	59/039[a]	0/308[a]
	45°C	54/11[b]	0/187[b]
	50°C	49/29[c]	0/084[d]
	55°C	38/54[d]	0/087[c]
آنزیم	30 واحد آنسون/کیلوگرم	48/59[c]	0/178[b]
	60 واحد آنسون/کیلوگرم	53/07[a]	0/14[c]
	90 واحد آنسون/کیلوگرم	49/074[b]	0/182[a]
زمان	210 دقیقه	49/09[e]	0/1916[a]
	180 دقیقه	51/05[c]	0/1914[a]
	150دقیقه	53/58[a]	0/174[b]
	120دقیقه	51/53[b]	0/162[c]
	90 دقیقه	50/04[d]	0/16[d]
	60 دقیقه	50/29[d]	0/152[e]
	30 دقیقه	46/13[f]	0/137[f]

حروف متفاوت در هر تیمار نشان دهنده اختلاف معنادار در آزمون دانکن در سطح 5 درصد است.



شکل 2- قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده آب پنیر در فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف الف) دمای 40 درجه سانتی‌گراد، ب) دمای 45 درجه سانتی‌گراد، ج) دمای 50 درجه سانتی‌گراد، د) دمای 55 درجه سانتی‌گراد

جدول 4- مقایسه میزان جذب غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیزشده آب پنیر (در دمای 40 درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیمی 90 واحد آنسون بر کیلوگرم و در زمان هیدرولیز 210 دقیقه) با محلول استاندارد آسکوربیک اسید

غلظت (ppm)	جذب آسکوربیک اسید	جذب پروتئین هیدرولیزشده
100	0/389 ±0/001	0/115 ±0/003
200	0 /415 ±0/004	0/148±0/001
300	0/430 ±0/001	0/156 ±0/001
400	0/454 ±0/002	0/203 ±0/002

انحراف معیار ± میانگین (3 تکرار)

نتیجه‌گیری

امروزه پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین غذاهای گوناگون شناخته شده و تحقیقات اخیر بر روی آنها متمرکز شده است. این پپتیدها نقش‌های بیولوژیکی متنوعی را ایفا می‌کنند، یکی از نقش‌های بسیار مهم آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی است. ارتباط معکوس میان فعالیت آنتی‌اکسیدان‌ها و وقوع بیماری‌ها در شماری از مطالعات به اثبات رسیده است. نتایج حاکی از پایین‌تر بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده نسبت به محلول‌های استاندارد مقایسه شده شامل اسید آسکوربیک و EDTA بود اما در عین حال مقادیر قابل قبولی را از خود نشان داد. با توجه به اینکه آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌طور معمول به‌دلیل قدرت پایین‌تر خود نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در مقادیر بیشتری به‌عنوان جایگزین با آنها استفاده می‌شوند در این مورد نیز می‌توان مصرف مقادیر بالاتر را برای تأثیر بیشتر توصیه نمود. رفتار آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده کنسانتره آب پنیر تحت تأثیر شرایط واکنش شامل دما، زمان و میزان آنزیم قرار گرفت. در نهایت با بررسی و مقایسه عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده در این پژوهش، می‌توان گفت که این محصول غنی از پروتئین به‌عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی در غلظت‌های مناسب قابل رقابت با محصولات آنتی‌اکسیدانی سنتزی می‌باشد.

منابع

1- Aspmo, S. I., Horn, S. J. & Eijsink, V. G. H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry, 40: 1957-1966.
2- AOAC. 2000. Official methods of analysis (18th ed.). Association of Official Analytical Chemists,Washington, DC.
3- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelusmustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry, 114: 1198–1205.
4- Calderon, D. I., Barca, A. M., Ruiz-Salazar, R. A. & Jara-Marini, M. E. 2000. Enzymatic hydrolysis of soy protein to improve its amino acid composition and functional properties. Food Science and Technology, 65: 246–253.
5- Dávalos, A., Miguel, M., Bartolomé, B. & López-Fandiño, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Food Protection, 67: 1939-1944.
6- Dong, S., Zeng, M.,Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. & Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry, 107: 1485–1493.
7- Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. & Gomez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chemistry, 114: 976-983.
8- Gómez-Ruiz, J. A., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. & Recio, I. 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. European Food Research and Technology, 227: 1061-1067.
9- Ha, E. & Zeniel, M. B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people (review). Nutritional Biochemistry, 14: 251-258.
10- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. & Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: Thecarcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. Food and Chemical Toxicology, 24: 1099–1102.
11- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P. & Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitisvinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chemistry, 73: 285-290.
12- Jamdar, S. N, Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D, Juan, F., Yardi, V. & 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.
13- Je, J. Y., Qian, Z., J, Byun, H. G. & Kim, S. K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42: 840-846.
14- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H. & Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42: 1266-1272.
15- Khantaphant, S., Benjakul, S. & Ghomi, M. R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brown stripe red snapper (*Lutjanus vitta*). Food Science and Technology, 44: 1139-1148.
16- Kong, B. & Xiong, Y. L. 2007. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. Agricultural and Food Chemistry, 54: 6059–6068.
17- Lee, J. S., Yoo, M. A., Koo, S. H., Baek, H. H. & Lee, H. G. 2008. Antioxidant and ACE inhibitory activities of soybean hydrolysates: effect on enzyme and degree of hydrolysis. Food Science and Biotechnology, 17: 873-877.
18- Lin, C. C. & Liang, J. H. 2000. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. Food Science, 67: 530–533.
19- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. & Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry, 106: 444-450.

20- Megias, C., Pedroche, J., Yust, M. M, Giron-Calle, J., Alaiz, M. & Millan, F. 2007. Affinity purification of copper-chelating peptides from sunflower protein hydrolysates. Agricultural and Food Chemistry, 55 (16): 6509–6514.
21- Moure, A., Domınguez, H. & Parajo, J. C. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry, 41: 447-456.
22- Mohamadi, M., Maskooki, A. M, Mortazavi, S. A, Nahardani, M., Pourfallah, Z. & Sadeghian, A. R. 2014. Stability and heat resistance of soybean oil with natural antioxidants from seedless barberries extracted using subcritical water. Nutrition Sciences & Food Technology, 8 (4): 113-124.
23- Nalinanon, S. T., Benjakul, S., Kishimura, H. & Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chemistry, 124: 1354-1362.
24- Ovissipour, M. R., Abedian-Kenari, A., Motamedzadegan, A. & Nazari, R. M. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnusalbacares*). Food and Bioprocess Technology, 5: 696-705.
25- Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. & Esmaeili-Mulla, A. 2009. Optimizationof enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *(Husohuso)* using Alcalase. International Aquatic Research, 1: 31-38.
26- Pan, M., Jiang, T. S. & Pan, J. L. 2011. Antioxidant Activities of Rapeseed Protein Hydrolysates. Food Bioprocess Technology, 4: 1144-1152.
27- Recio, I. & Visser, S. 1999. Identification of two distinct antibacterial domains within the sequence of bovine alpha (s2)-casein. Biochimica et Biophysica Acta, 1428: 314-326.
28- Sarmadi, B. H. & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides, 31: 1949-1956.
29- Samaranayaka, A. G. P. & Li-Chan, E. C. Y. 2008. Autolysis-assisted production of protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merlucciusproductus*). Food Chemistry, 107: 768-776.
30- Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. Food Biochemistry, 31 (2): 266–287.
31- Walzem, R. L, DiUard, C. J. & German, J. B. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be over lookins. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 42: 353-375.
32- Yomauchi, R., Tatsumi, Y., Asano, M., Kato, K. & Ueno, Y. 1988 . Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. Agricultural and Biological Chemistry, 52 (3): 849–850.

Production and study on antioxidant activity of protein hydrolysate from whey protein

Shima Piri[1*], Ali Reza Sadeghi Mahoonak[2], Mohamad Ghorbani[3], Mehran Alami[3]

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
*Corresponding author (shima_piri1366@yahoo.com)
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In this study, protein hydrolysate was prepared from whey protein concentrate with Alcalase 2.4 L. The effects of temperature (40, 45, 50 and 55 °C), time (30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 min) and enzyme/substrate ratio (30, 60 and 90 Anson unit), on antioxidant activity of the product were investigated in a completely randomized design. The antioxidant activity of protein hydrolysate was studied using reducing power and Fe^{2+} chelating activity. The highest Fe^{2+} chelating activity (87.2%) was observed in temperature 50 ºC, enzyme activity of 60 Au/kg and hydrolysis time of 90 min. The highest reducing power (0.435) of protein hydrolysate was observed in temperature of 40ºC, enzyme activity of 90 Au/kg and hydrolysis time of 210 min which showed 57.08% reducing power compared to 100 ppm ascorbic acid. The results indicate that the antioxidant peptides can be used as a natural antioxidant in food formulations, as well as a pharmaceutical composition.

Keywords: Alcalase, Antioxidant activity, Bioactive peptide, Hydrolysis conditions