JRIFST

مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۹، جلد ۹، شماره ۱، صفحات ۱-۱۰
DOI: 10.22101/JRIFST.2019.09.21.e1285

بررسی تأثیر شرایط عملیاتی هیدرولیز پروتئین دانهٔ باقلا (*Vicia faba*) بر فعالیت ضداکسایشی آن

سیده‌پریا سمائی[۱]، محمد قربانی[۲*]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، مهران اعلمی[۲]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
* نویسندهٔ مسئول (m.ghorbani@gau.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۱/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۶/۲۱

واژه‌های کلیدی
اصلاح پروتئین
پپتیدهای زیست‌فعال
فعالیت آنتی‌اکسیدانی
هیدرولیز آنزیمی

چکیده

اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها به‌منظور شکست باندهای پپتیدی خاص و اصلاح پروتئین‌ها به‌طور گسترده در صنایع غذایی مورداستفاده قرار می‌گیرد. در این پژوهش پروتئین دانهٔ باقلا با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین در سه غلظت (۱، ۲ و ۳ درصد) و زمان‌های واکنش ۶-۱ ساعت در دما و pH بهینهٔ هر آنزیم (به‌ترتیب ۵۰ و ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد و pH ۸/۵ و ۷) هیدرولیز شد. درجهٔ هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی رادیکال دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و شلاته‌کنندگی یون فرو پروتئین‌های هیدرولیزشده موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد درجهٔ هیدرولیز با افزایش زمان واکنش و غلظت آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین افزایش یافت. زمان هیدرولیز و نوع آنزیم اثر معنی‌داری بر درجهٔ هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ دانهٔ باقلا داشته است ($P<۰/۰۵$). پروتئین‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز در غلظت ۳ درصد و زمان ۳ ساعت بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۵/۴۱ درصد) و شلاته‌کنندگی یون فرو (۵۵/۹۵ درصد) را داشته است. در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد آنزیم تریپسین بیشترین مهارکنندگی رادیکال DPPH در زمان ۴ ساعت مشاهده شد که به‌ترتیب ۴۲/۳۸ و ۵۳/۷۰ درصد بوده است. بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو در تیمارهای هیدرولیزشده توسط آنزیم تریپسین در زمان واکنش ۲ ساعت مشاهده شد و پس از آن فعالیت شلاته‌کنندگی کاهش یافت. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافت. نتایج نشان دادند آنزیم آلکالاز در مقایسه با آنزیم تریپسین، کارایی بالاتری در تولید پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته است.

مقدمه

پروتئین‌های گیاهی به‌صورت آرد، کنسانتره و ایزوله در فرمولاسیون‌های غذایی به‌عنوان ترکیبات مغذی برای افزایش محتوای پروتئینی محصول نهایی مورداستفاده قرار می‌گیرند. در بین پروتئین‌های با منبع گیاهی، بقولات دارای تعادل خوبی در اسیدهای آمینهٔ ضروری هستند و به‌صورت گسترده در شکل‌های مختلف (نوشیدنی‌ها، دسرها، محصولات بافت‌داده‌شده و غیره) مورداستفاده قرار می‌گیرند (Chardigny & Walrand, 2016). باقلا که متعلق به خانوادهٔ بقولات است دارای سابقهٔ طولانی در استفاده‌های متعدد به‌عنوان غذا می‌باشد. دلیل این امر دارابودن مقادیر ارزشمندی از پروتئین و انرژی به‌طور

همزمان است (Crépon *et al*., 2010). بقولات ازجمله باقلا به‌صورت ترکیب با سایر غذاهای گیاهی برای افزایش کیفیت و کمیت پروتئین مورداستفاده قرار می‌گیرند.

اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولتیک به‌منظور شکست باندهای پپتیدی خاص و اصلاح پروتئین‌ها به‌طور گسترده در صنایع غذایی مورداستفاده قرار می‌گیرد (Mullally, O'Callaghan, FitzGerald, Donnelly, & Dalton, 1994). ویژگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی تحت‌تأثیر شرایط هیدرولیز (دما، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان) و نوع آنزیم قرار می‌گیرد. پپتیدهای حاصل از هیدرولیز ازنظر ویژگی‌های تغذیه‌ای، عملکردی و بیولوژیکی با پروتئین‌های اولیه متفاوت هستند. مطالعه‌های انجام‌شده نشان داد علاوه‌بر ویژگی‌های تغذیه‌ای پروتئین‌های هیدرولیزشده این ترکیبات دارای چندین اثر بیولوژیکی نیز می‌باشند. این مطالعه‌ها شامل استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلکالاز، تریپسین، فلیورزایم، پپسین، پانکراتین، کیموتریسین و غیره) در شرایط مختلف هیدرولیز ازجمله زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا، pH مخصوص هر آنزیم و دما می‌باشد (Ahn, Je, & Cho, 2012; Alashi *et al*., 2014; Fritz, Vecchi, Rinaldi, & Añón, 2011; Onuh, Girgih, Aluko, & Aliani, 2013; Zhao *et al*., 2012).

پپتیدهای حاصل از هیدرولیز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Iwaniak & Minkiewicz, 2007; Peñta-Ramos & Xiong, 2002; Zhao, Huang, Zhang, Chen, & Jiang, 2011)، ضدسرطان (Shahidi & Zhong, 2008; Silva-Sánchez *et al*., 2008)، ضدمیکروبی (Harris, Mora-Montes, Gow, & Coote, 2009) و چندین عملکرد فیزیولوژیک دیگر می‌باشند. درصورت آماده‌سازی پروتئین هیدرولیزشده برای مصارف انسانی هیدرولیز آنزیمی ترجیح داده می‌شود زیرا در شرایط ملایمی انجام می‌شود ایمن و اختصاصی‌تر عمل می‌کند و اسیدهای آمینه را تخریب نمی‌کند درحالی‌که هیدرولیز اسیدی و قلیایی می‌توانند L- اسیدآمینه‌ها را تخریب کنند و ترکیبات سمی ازجمله لایزینوآلانین[1] تولید کنند (Zhang *et al*., 2012).

پروتئین‌های هیدرولیزشده بسته به ساختار پپتید مانند اندازهٔ پپتید و توالی اسیدآمینه که تحت‌تأثیر منشأ پروتئین و شرایط هیدرولیز قرار می‌گیرند، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Shahidi & Zhong, 2008). فاکتورهای متعددی ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد که می‌توان به نوع پروتئین و آنزیم، درجهٔ هیدرولیز و پیش‌تیمارهای سوبسترا اشاره کرد (Elias, Kellerby, & Decker, 2008; Pazinatto, Malta, Pastore, & Maria Netto, 2013; Polanco-Lugo, Dávila-Ortiz, Betancur-Ancona, & Chel-Guerrero, 2014). فعالیت آنتی‌اکسیدانی با یک مکانیسم خاص انجام می‌گیرد که شامل ظرفیت واحدهای اسیدآمینه در انتقال الکترون‌ها به رادیکال‌های آزاد می‌باشد. پپتیدهای زیست‌فعال دارای توانایی بالایی در کاهش فعالیت مجدد رادیکال‌های آزاد هستند که این امر به‌دلیل تماس اسیدآمینه و واکنش اثرگذارتر با این رادیکال می‌باشد (Elias *et al*., 2008).

مقایسهٔ آنزیم‌های مختلف نشان داد که آنزیم‌های مختلف روی یک سوبسترای ثابت اثرات متفاوتی داشته‌اند. پروتئین هیدرولیزشدهٔ سویا با استفاده از آنزیم‌های پپسین، پاپائین[2]، کیموتریپسین، آلکالاز، پروتامکس[3] و فلیورزایم دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند که در محدودهٔ ۲۸ تا ۶۵ درصد بوده است (Peñta-Ramos & Xiong, 2002).

ازآنجایی‌که مطالعهٔ جامعی دررابطه‌با هیدرولیز آنزیم دانهٔ باقلا[4] صورت نگرفته است هدف این پژوهش بررسی پتانسیل استفاده از آنزیم آلکالاز و تریپسین در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانهٔ باقلا و مطالعهٔ ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشدهٔ حاصل می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی آرد دانهٔ باقلا

پس از حذف مواد خارجی، دانه‌های باقلا توسط آسیاب برقی آسان توس شرق (مدل ۱۰۰۰، ساخت ایران) به آرد تبدیل شد. آرد حاصل از الک با مش ۵۰ عبور داده شد سپس به مدت ۶ ساعت با حلال هگزان به نسبت ۳:۱ چربی‌گیری شد. پس از هر ۲ ساعت حلال تازه به نمونه اضافه شد. پس از حلال‌زدایی از الک با مش ۵۰ به‌منظور ایجاد پودر دانهٔ باقلا عبور داده شد. سپس در دمای اتاق

[1] Lysinoalanine

[2] Papain

[3] Protamex

[4] *Vicia faba*

خشک و تا زمان استخراج پروتئین در فریزر و دمای ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (Sogi, Arora, Garg, & Bawa, 2002).

استخراج پروتئین دانهٔ باقلا

به‌منظور تهیهٔ ایزولهٔ پروتئین باقلا آرد چربی‌زدایی‌شدهٔ باقلا به میزان ۱۰۰ گرم در آب‌مقطر به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) مخلوط و با استفاده از سود ۱ مولار pH آن به ۱۱ رسانده شد سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه مزده شد. عصارهٔ قلیایی حاصل در نیروی گرانشی دورانی ۱۶۰۰ و دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار pH آن به ۳ رسانده شد و پروتئین رسوب‌داده‌شده با سانتریفیوژ جداسازی شد. درنهایت پروتئین حاصل در خشک‌کن انجمادی خشک گردید و تا زمان هیدرولیز در کیسه‌های پلاستیکی در فریزر و دمای ۱۸- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (Makri, Papalamprou, & Doxastakis, 2006).

هیدرولیز پروتئین دانهٔ باقلا

به‌منظور هیدرولیز پروتئین دانهٔ باقلا، پروتئین به نسبت ۴ درصد (وزنی-حجمی) در بافر فسفات pH ۸/۵ (Kong, Chanput, Theerakulkait, & Nakai, 2009) و ۷ (Zhou, & Qian, 2007) به‌ترتیب برای آنزیم آلکالاز و تریپسین تهیه شد. هیدرولیز در دمای بهینهٔ آنزیم آلکالاز و تریپسین به‌ترتیب ۵۰ و ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد، غلظت‌های آنزیم ۱ تا ۳ درصد و محدودهٔ زمانی ۱ تا ۶ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، ساخت کره‌جنوبی) با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به‌منظور غیرفعال‌کردن فعالیت آنزیم، مجدداً محلول پروتئین در حمام آب‌گرم با دمای ۸۲ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در مرحلهٔ بعد عمل سانتریفیوژ در نیروی گرانیش دورانی ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور تولید پودر پروتئین هیدرولیزشدهٔ سوپرناتانت حاصل در خشک‌کن انجمادی در دمای۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد، فشار ۴۰ میلی‌بار و زمان ۴۸ ساعت (مدل Operon FDB 5503، ساخت کره‌جنوبی) خشک و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد (Chanput *et al*., 2009).

تعیین درجهٔ هیدرولیز (DH[1])

برای تعیین درجهٔ هیدرولیز در انتهای هر واکنش ۱۰ میلی‌لیتر از پروتئین هیدرولیزشده با ۱۰ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۰/۴۴ مولار مخلوط شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه در نیروی گرانشی دورانی ۲۶۰۰ سانتریفیوژ گردید (Hoyle & Merrltt, 1994). مقدار پروتئین سوپرناتانت با روش برادفورد اندازه‌گیری شد (Bradford, 1976). به‌این‌منظور ابتدا با استفاده از غلظت‌های مختلف پروتئین آلبومین سرم گاوی منحنی استاندارد رسم شد و با رسم منحنی و تعیین معادلهٔ خط غلظت نمونه‌های مجهول محاسبه شد. درجهٔ هیدرولیز با استفاده از رابطهٔ (۱) محاسبه گردید:

رابطهٔ (۱)

$$\text{درجه هیدرولیز} = \frac{\text{میزان پروتئین موجود در تری کلرو استیک اسید ۰/۴۴ مولار}}{\text{پروتئین کل موجود در نمونه}} \times ۱۰۰$$

تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH[2])

برای تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال ۲ و ۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) ۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیزشده (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب‌مقطر) با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار تهیه‌شده در اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک نگهداری و درنهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونهٔ شاهد به‌جای نمونهٔ پروتئین هیدرولیزشده از ۱ میلی‌لیتر آب‌مقطر استفاده شد (Bougatef *et al*., 2009). فعالیت مهارکنندگی رادیکال با استفاده از رابطهٔ (۲) محاسبه گردید:

رابطهٔ (۲)

$$\text{درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو (Fe^{2+})

برای تعیین فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو (Fe^{2+}) ۴/۷

[1] Degree of Hydrolysis
[2] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیزشده (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب‌مقطر) با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن (II) و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار مخلوط گردید. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. پس از طی این زمان جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد (Nalinanon, Benjakul, Kishimura, & Shahidi, 2011). در نمونهٔ شاهد به‌جای نمونهٔ پروتئین از آب‌مقطر استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی با استفاده از رابطهٔ (۳) محاسبه گردید:

رابطهٔ (۳)

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی (درصد)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

تجزیه‌وتحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد. به‌منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات حاصل از آزمایش از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت تعیین اختلاف بین میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس (ANOVA)، از آزمون چنددامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده گردید. تجزیه‌وتحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS نسخهٔ ۱۶ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ ۲۰۱۳ استفاده شد.

نتایج و بحث

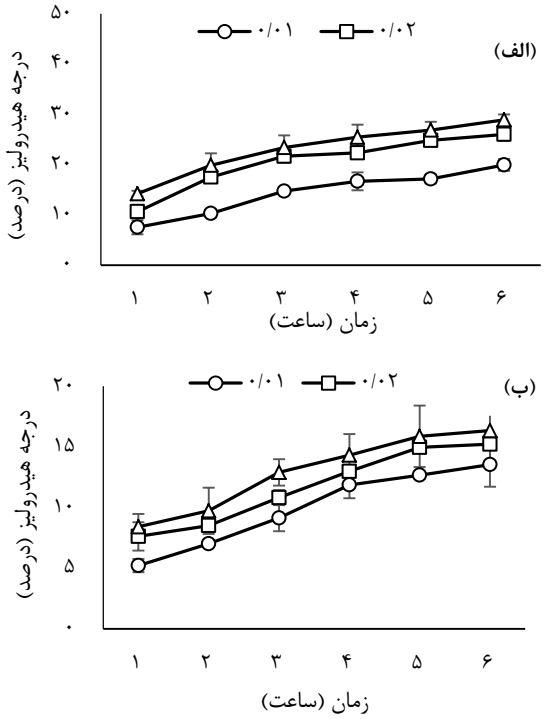
درجهٔ هیدرولیز

دانهٔ باقلای اولیه دارای درصد پروتئین ۳۰/۱۹ درصد می‌باشد. درجهٔ هیدرولیز نشان‌دهندهٔ نسبت پیوندهای پپتیدی شکسته‌شده در پروتئین هیدرولیزشده می‌باشد. بسیاری از خواص پروتئین‌های هیدرولیزشده، ازجمله اسیدهای آمینهٔ آزاد، میزان انحلال‌پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و خواص ضداکسایشی و سایر فعالیت‌های زیستی پپتیدهای تولیدشده وابسته به شدت و میزان درجهٔ هیدرولیز می‌باشد، بنابراین کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز طی فرایند هیدرولیز حائز اهمیت است (Himonides, Taylor, & Morris, 2011).

تغییرات درجهٔ هیدرولیز آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین طی زمان‌های مختلف ۶-۱ ساعت و در غلظت‌های مختلف آنزیم (۱، ۲ و ۳ درصد) در شکل (۱) نشان داده شده است. با گذشت زمان درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت. زمان‌ها و غلظت‌های مختلف آنزیم دارای اثر قابل‌ملاحظه‌ای بر درجهٔ هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین بوده است (P<۰/۰۵). با افزایش غلظت آنزیم‌ها درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت بیشترین درجهٔ هیدرولیز در غلظت ۳ درصد آنزیم آلکالاز و تریپسین مشاهده شد. نتایج نشان داد که توانایی آنزیم آلکالاز در هیدرولیز پروتئین دانهٔ باقلا بیشتر بوده است به‌طوری‌که در غلظت ۳ درصد و زمان هیدرولیز ۶ ساعت آنزیم آلکالاز و تریپسین به‌ترتیب درجهٔ هیدرولیز ۲۸/۹۱ و ۱۷/۹۰ درصد داشته‌اند. تحت‌تأثیر غلظت ۳ درصد آنزیم آلکالاز و زمان‌های واکنش ۴، ۵ و ۶ ساعت اختلاف معنی‌داری در درجهٔ هیدرولیز مشاهده نشد (P>۰/۰۵)، اما در غلظت مشابه آنزیم تریپسین درجهٔ هیدرولیز در زمان هیدرولیز ۶ ساعت با درجهٔ هیدرولیز در زمان‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ ساعت تفاوت معنی‌داری وجود نداشت (P<۰/۰۵). تریپسین یک سرین پپتیداز است و پیوندهای بعد از واحدهای با بار مثبت را می‌شکند. در واقع تریپسین پپتیدهای C- ترمینال واحدهای لیزین و آرژنین را می‌شکند. به‌بیان‌دیگر تریپسین بسیار اختصاصی عمل می‌کند و نرخ هیدرولیز در آن کمتر است (Ng & Khan, 2012). در پژوهشی اثر آنزیم‌های مختلف (آلکالاز، فلیورزایم، پپسین و تریپسین) بر میزان پیشرفت هیدرولیز پروتئین هستهٔ پالم موردمطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که آنزیم آلکالاز بیشترین توانایی را در هیدرولیز پروتئین هستهٔ پالم داشته است و با افزایش غلظت آنزیم درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت (Ng & Khan, 2012). هیدرولیز پروتئین دانهٔ کنار[1] با استفاده از غلظت ۳ درصد آنزیم آلکالاز و زمان ۱۸۰-۰ دقیقه انجام شد. نتایج نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت به‌طوری‌که در زمان ۱۸۰ درجهٔ هیدرولیز به ۲۲/۸۲ درصد رسید (Tatontos, 2015)، درحالی‌که پروتئین هیدرولیزشدهٔ سویا توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۱۲۰ دقیقه بیشترین درجهٔ هیدرولیز را داشته است زیرا بسته به نوع مادهٔ اولیه اثر آنزیم متفاوت است (Hrckova, Rusnakova, & Zemanovic, 2002). در پژوهش دیگری پروتئین کنجالهٔ کدو به‌وسیلهٔ آنزیم‌های آلکالاز، فلیورزایم، پروتامکس و نئوتراز[2] هیدرولیز شد. پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم

[1] Lotus seed protein
[2] Neutrase

آلکالاز دارای بیشترین درجهٔ هیدرولیز (۱۴/۲۰ درصد) بوده است (Muhamyankaka, Shoemaker, Nalwoga, & Zhang, 2013). پروتئین دانهٔ گوجه‌فرنگی نیز به‌وسیلهٔ غلظت‌های ۱ و ۲ درصد آنزیم آلکالاز و فلیورزایم هیدرولیز شد. نتایج نشان داد که افزایش غلظت آنزیم‌ها سبب افزایش درجهٔ هیدرولیز گشت و غلظت ۲ درصد آنزیم آلکالاز بیشترین درجهٔ هیدرولیز را داشت (امیری‌اندی، معتمدزادگان و حسینی‌پرور، ۱۳۹۵). درجهٔ هیدرولیز ایزولهٔ پروتئین سویا با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز افزایش یافت (اعتمادی، صادقی ماهونک، قربانی و مقصودلو، ۱۳۹۴). نتایج هیدرولیز ایزولهٔ پروتئین نخود[1] با غلظت‌های مختلف آنزیم تریپسین نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم درجهٔ هیدرولیز افزایش یافت (Karamac, Amarowicz, & Kostyra, 2002).



شکل ۱- اثر زمان واکنش و غلظت آنزیم بر درجهٔ هیدرولیز پروتئازهای مختلف (الف): آنزیم آلکالاز (ب): آنزیم تریپسین

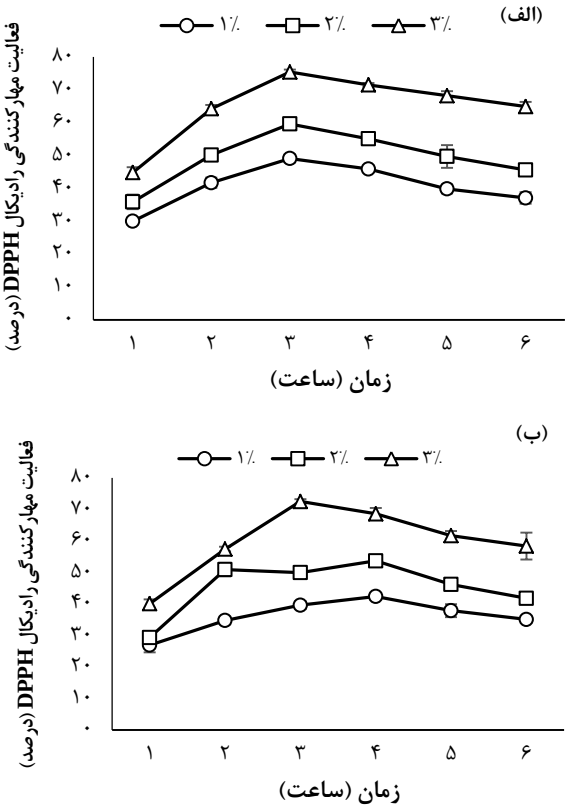
فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH)

فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیزشدهٔ باقلا تحت‌تأثیر دو آنزیم آلکالاز و تریپسین در بازهٔ زمانی ۶-۱ ساعت در شکل (۲) نشان داده شده است. هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH) نسبت به پروتئین اولیه (۲۲/۵۴ درصد) شد ($P<۰/۰۵$).

افزایش زمان هیدرولیز تا زمان ۳ ساعت توسط آنزیم آلکالاز سبب افزایش درصد مهار رادیکال (DPPH) در پروتئین هیدرولیزشده گشت و پس از این زمان روند نزولی مشاهده شد. بیشترین مهارکنندگی رادیکال (DPPH) ۷۵/۴۱ درصد در غلظت ۳ درصد آنزیم آلکالاز و زمان واکنش ۳ ساعت بوده است که با زمان‌های ۴ و ۵ ساعت اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در تمام تیمارها افزایش غلظت آنزیم سبب افزایش درصد مهارکنندگی رادیکال (DPPH) گشت. در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد آنزیم تریپسین بیشترین مهارکنندگی رادیکال (DPPH) در زمان ۴ ساعت و در غلظت ۳ درصد آنزیم تریپسین بیشترین مهارکنندگی در زمان ۳ ساعت مشاهده شد که به‌ترتیب ۴۲/۳۸، ۵۳/۷۰ و ۷۲/۵۴ درصد بوده است. اثر زمان و غلظت آنزیم بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH) معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$). میزان مهارکنندگی در پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم تریپسین کمتر از پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز بوده است این امر ممکن است به‌دلیل نوع اسیدهای آمینهٔ موجود در پپتیدهای حاصل و توالی آنها باشد (Marcuse, 1962). پروتئین‌های هیدرولیزشده بسته به ساختار پپتیدها، اندازهٔ پپتید و توالی اسیدآمینه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی هستند (Shahidi & Zhong, 2008). کاهش فعالیت مهارکنندگی توسط پروتئین هیدرولیزشده با زیادشدن زمان هیدرولیز می‌تواند ناشی از پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر مادهٔ پروتئینی باشد که این موضوع باعث شکستن زنجیرهٔ برخی از پپتیدهای ضداکسایشی تشکیل‌شده در مراحل اولیهٔ هیدرولیز و کاهش آنها می‌شود (Wu, Chen, & Shiau, 2003). تفاوت در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده با درجهٔ هیدرولیز یکسان در اثر تفاوت در فعالیت کاتالیکی و اختصاصی‌بودن آنزیم می‌باشد که می‌تواند تعداد و مکان هیدرولیز باندهای پپتیدی را تحت‌تأثیر قرار دهد (Polanco-Lugo *et al.*, 2014). در تحقیقی که دررابطه‌با هیدرولیز پروتئین نان زنجبیلی با استفاده از هیدرولیز دو مرحله‌ای آنزیم‌های پپسین و تریپسین انجام شد نتایج مشابهی حاصل شد و در زمان ۱۸۰ دقیقه بیشترین فعالیت ضداکسایشی

[1] *Propulse*

مشاهده شد (Amza, Balla, Tounkara, Man, & Zhou, 2013). مطالعه‌های انجام‌شده نشان داد پروتئین هیدرولیزشدهٔ آفتاب‌گردان توسط آنزیم تریپسین در زمان‌های ۶۰ و ۱۸۰ دقیقه بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشته است که به‌ترتیب ۹۴/۳۲ و ۶۱/۲۱ درصد بوده است (Taha, Mohamed, Wagdy, & Mohamed, 2013).



شکل ۲- فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH) در زمان‌های واکنش و غلظت‌های مختلف آنزیم آلکالاز و تریپسین (الف): آنزیم آلکالاز (ب): آنزیم تریپسین

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو (Fe^{2+})

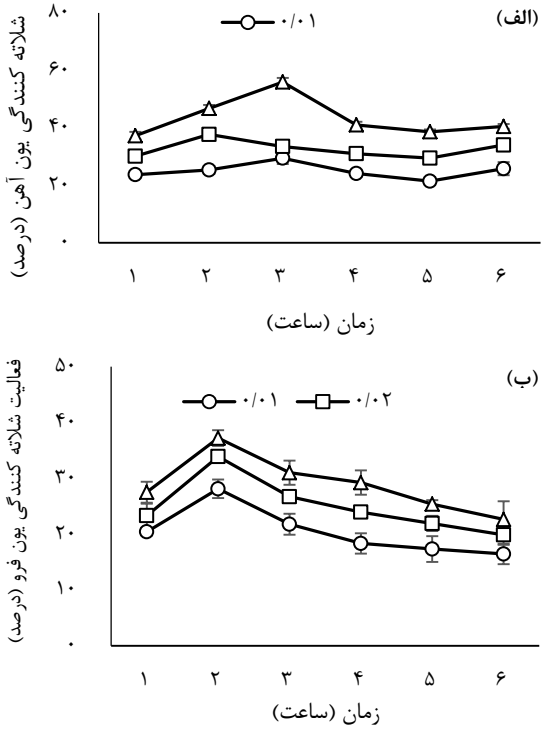
فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو پروتئین هیدرولیزشدهٔ دانهٔ باقلا توسط آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین در شکل (۳) نشان داده شده است.

نتایج نشان داد که تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده فعالیت شلاته‌کنندگی بیشتری نسبت به پروتئین اولیهٔ باقلا (۵/۲ درصد) داشته‌اند ($P<۰/۰۵$). در تیمارهای حاصل از هیدرولیز آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم درصد شلاته‌کنندگی یون فرو افزایش یافت. در غلظت‌های آنزیم ۱ و ۳ درصد از زمان ۱ تا ۳ ساعت روند افزایشی در مهارکنندگی یون فرو مشاهده شد سپس در زمان‌های ۴ و ۵ ساعت با افزایش درجهٔ هیدرولیز کاهش و پس از آن افزایش یافت. اگرچه بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی در غلظت‌ها ۱ و ۳ درصد آنزیم آلکالاز در زمان ۳ ساعت و به‌ترتیب ۲۹/۴۵ و ۵۵/۹۵ درصد بوده است اما در غلظت ۱ درصد آنزیم آلکالاز اختلاف معنی‌داری در شلاته‌کنندگی یون آهن در پروتئین هیدورلیزشده طی زمان‌های واکنش متوالی ۲ و ۳ ساعت مشاهده شد ($P>۰/۰۵$). شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیزشدهٔ حاصل از غلظت آنزیم ۳ درصد و زمان واکنش ۳ درصد با سایر زمان‌های واکنش اختلاف معنی‌داری داشته است ($P<۰/۰۵$). در غلظت ۲ درصد آنزیم آلکالاز بیشترین فعالیت مهارکنندگی در زمان ۲ ساعت (۳۷/۷۲ درصد) مشاهده شد و پس از آن روند کاهشی تا زمان ۵ ساعت ادامه یافت. فعالیت مهارکنندگی در این غلظت آنزیم آلکالاز و زمان واکنش ۲ و ۳ ساعت اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ($P>۰/۰۵$). اثر زمان و غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو معنی‌دار بوده است ($P<۰/۰۵$).

در تیمارهای هیدرولیزشده توسط آنزیم تریپسین بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی در زمان هیدرولیز ۲ ساعت مشاهده شد و پس از آن فعالیت شلاته‌کنندگی با افزایش زمان و درجهٔ هیدرولیز کاهش یافت ($P<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی در غلظت ۳ درصد آنزیم تریپسین، ۳۷/۲۱ درصد بوده است. نتایج نشان داد پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیم آلکالاز فعالیت شلاته‌کنندگی بیشتری نسبت به پپتیدهای حاصل از آنزیم تریپسین داشته‌اند. نتایج هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانهٔ کدو توسط غلظت‌های ۱ و ۲ درصد آنزیم تریپسین نشان داد که افزایش غلظت آنزیم سبب افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی شد (نورمحمدی، صادقی‌ماهونک، قربانی، اعلمی و صادقی، ۱۳۹۴). فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشدهٔ پروتئین دانهٔ چای توسط آنزیم آلکالاز نیز در ابتدای زمان هیدرولیز افزایش و سپس کاهش یافت (Li, Shen, Deng, Li, & Ding, 2014). هیدرولیز آنزیمی سبب در معرض قرارگیری دومین‌های[1] پپتیدهای داخلی پروتئین می‌شود. اگرچه هیدرولیز زیاد سبب شکسته‌شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک می‌شود و ساختار پپتیدهای

[1] Domains

فعال را می‌شکنند و سبب کاهش فعالیت زیستی آن می‌گردد (Kristinsson & Rasco, 2000). پیشرفت هیدرولیز بسته به نوع آنزیم، درجهٔ هیدرولیز و زمان هیدرولیز بر فعالیت زیستی پپتیدهای حاصل اثرگذار است. زمان هیدرولیز پروفایل پروتئین‌های هیدرولیزشده را تحت‌تأثیر قرار می‌دهد و سبب عملکردهای متفاوتی در آنها می‌شود (Klompong, Benjakul, Kantachote, & Shahidi, 2007; Liu, Kong, Xiong, & Xia, 2010).



شکل ۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو در زمان‌های واکنش و غلظت‌های مختلف آنزیم آلکالاز و تریپسین (الف): آنزیم آلکالاز (ب): آنزیم تریپسین

نتیجه‌گیری

نتایج تحقیق نشان داد با تغییر شرایط هیدرولیز ازجمله نوع آنزیم، غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز می‌توان به پروتئین‌های هیدرولیزشده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت دست یافت. درجهٔ هیدرولیز با افزایش زمان واکنش و غلظت آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین افزایش یافت. اثر زمان واکنش و نوع آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ دانهٔ باقلا توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین معنی‌دار بوده است (P<۰/۰۵). پروتئین‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز در غلظت ۳ درصد و زمان ۳ ساعت بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۷۵/۴۱ درصد) و شلاته‌کنندگی یون فرو (۵۵/۹۵ درصد) را داشته است. در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد آنزیم تریپسین بیشترین مهارکنندگی رادیکال (DPPH) در زمان ۴ ساعت و در غلظت ۳ درصد آنزیم تریپسین بیشترین مهارکنندگی در زمان ۳ ساعت مشاهده شد که به‌ترتیب ۴۲/۳۸، ۵۳/۷۰ و ۷۲/۵۴ درصد بوده است. بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو در زمان هیدرولیز ۲ ساعت مشاهده شد و پس از آن فعالیت شلاته‌کنندگی کاهش یافت. فعالیت مهارکنندگی رادیکال (DPPH) و شلاته‌کنندگی یون فرو با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافت. آنزیم آلکالاز در مقایسه با آنزیم تریپسین، کارایی بالاتری در تولید پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشته است.

منابع

اعتمادی، م.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، م.، و مقصودلو، ی. (۱۳۹۴). تولید و بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا. *علوم غذایی و تغذیه*، ۱۳(زمستان ۹۴)، ۶۵-۷۴.

امیری‌اندی، م.، معتمدزادگان، ع.، و حسینی‌پرور، س. (۱۳۹۵). مقایسه روش‌های قلیایی و آنزیمی استخراج در ویژگی‌ها و راندمان هیدرولیز پروتئین دانه گوجه‌فرنگی. *پژوهش های صنایع غذایی*، ۲۶(۲)، ۳۳۳-۳۴۳.

نورمحمدی، ا.، صادقی‌ماهونک، ع.، قربانی، م.، اعلمی، م.، و صادقی، م. (۱۳۹۴). بهینه‌سازی شرایط تولید پپتیدهای ضداکسایش از هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو توسط تریپسین به روس سطح پاسخ. *پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، ۱۳(۱)، ۱۴-۲۶. doi:https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423

Ahn, C.-B., Je, J.-Y., & Cho, Y.-S. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, *49*(1), 92-98. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.08.002

Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., . . . Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry, 146*, 500-506. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.09.081

Amiri Andi, M., Motamedzadegan, A., & Hosseini-Parvar, S. H. (2016). Comparison of enzymatic and alkaline treatment on hydrolysis yield and properties of tomato seed protein. *Journal of Food Research, 26*(2), 333-343. (in Persian)

Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., & Zhou, H. (2013). Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (Neocarya macrophylla) seeds. *International Food Research Journal, 20*(5), 2081 .

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry, 114*(4), 1198-1205. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075

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*(1), 248-254. doi:https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Chanput, W., Theerakulkait, C., & Nakai, S. (2009). Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. *Journal of Cereal Science, 49*(3), 422-428. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.02.001

Chardigny, J.-M., & Walrand, S. (2016). Plant protein for food: opportunities and bottlenecks. *OCL Oilseeds and fats crops and lipids, 23*(4), 6 p. doi:https://doi.org/10.1051/ocl/2016019

Crépon, K., Marget, P., Peyronnet, C., Carrouée, B., Arese, P., & Duc, G. (2010). Nutritional value of faba bean (Vicia faba L.) seeds for feed and food. *Field Crops Research, 115*(3), 329-339. doi:https://doi.org/10.1016/j.fcr.2009.09.016

Elias, R. J., Kellerby, S. S., & Decker, E. A. (2008). Antioxidant Activity of Proteins and Peptides. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 48*(5), 430-441. doi:https://doi.org/10.1080/10408390701425615

Etemadi, M., Sadeghi Mahonak, A. R., Ghorbani, M., & Maghsoudlou, Y. (2015). Production and Evaluation of Chelating Activity and Reducing Power of Protein Hydrolysates Obtained from Soy Protein Isolate. *Journal of Food Technology and Nutrition, 13*(1), 65-74. (in Persian)

Fritz, M., Vecchi, B., Rinaldi, G., & Añón ,M. C. (2011). Amaranth seed protein hydrolysates have in vivo and in vitro antihypertensive activity. *Food Chemistry, 126*(3), 878-884. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.065

Harris, M., Mora-Montes, H. M., Gow, N. A., & Coote, P. J. (2009). Loss of mannosylphosphate from Candida albicans cell wall proteins results in enhanced resistance to the inhibitory effect of a cationic antimicrobial peptide via reduced peptide binding to the cell surface. *Microbiology, 155*(4), 1058-1070 .

Himonides, A .T., Taylor, A. K., & Morris, A. J. (2011). A study of the enzymatic hydrolysis of fish frames using model systems. *Food and Nutrition Sciences, 2*(06), 575-585. doi:https://dx.doi.org/10.4236/fns.2011.26081

Hoyle, N. T., & Merrltt, J. H. (1994). Quality of Fish Protein Hydrolysates from Herring (Clupea harengus). *Journal of Food Science, 59*(1), 76-79. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x

Hrckova, M., Rusnakova, M., & Zemanovic, J. (2002). Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *Czech journal of food sciences, 20*(1), 7-14 .

Iwaniak, A., & Minkiewicz, P. (2007). Proteins as the source of physiologically and functionally active peptides. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, 6*(3), 5-15 .

Karamac, M., Amarowicz, R., & Kostyra, H. (2002). Effect of temperature and enzyme/substrate ratio on the hydrolysis of pea protein isolates by trypsin. *Czech journal of food sciences, 20*(1), 1-6 .

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry, 102*(4), 1317-1327. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016

Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry, 101*(2), 615-620. doi:https//:doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.01.057

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Biochemical and Functional Properties of Atlantic Salmon (Salmo salar) Muscle Proteins Hydrolyzed with Various Alkaline Proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48*(3), 657-666. doi:https://doi.org/10.1021/jf990447v

Li, X., Shen, S., Deng, J., Li, T., & Ding, C. (2014). Antioxidant activities and functional properties of tea seed protein hydrolysates (Camellia oleifera Abel.) influenced by the degree of enzymatic hydrolysis. *Food Science and Biotechnology, 23*(6), 2075-2082. doi:https://doi.org/10.1007/s10068-014-0282-2

Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chemistry, 118*(2), 403-410. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.05.013

Makri, E. A., Papalamprou, E. M., & Doxastakis, G. I. (2006). Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture, 86*(12), 1855-1862. doi:https://doi.org/10.1002/jsfa.2531

Marcuse, R. (1962). The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. *Journal of the American Oil Chemists Society, 39*(2), *97-103.* doi:https://doi.org/10.1007/BF02631680

Muhamyankaka, V., Shoemaker, C., Nalwoga, M., & Zhang, X. (2013). Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (Cucurbita moschata) protein meal. *International Food Research Journal, 20*(5), 2227 .

Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., FitzGerald, R. J., Donnelly, W. J., & Dalton, J. P. (1994). Proteolytic and Peptidolytic Activities in Commercial Pancreatic Protease Preparations and Their Relationship to Some Whey Protein Hydrolyzate Characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 42*(12), 2973-2981. doi:https://doi.org/10.1021/jf00048a062

Nalinanon, S., 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*(4), 1354-1362. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089

Ng, K., & Khan, A. M. (2012). Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate (PKEPH). *International Food Research Journal, 19*(2), 721 .

Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2015). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technokogy Research Journal, 13*(1), 14-26. doi:https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423 (in Persian)

Onuh, J. O., Girgih, A. T., Aluko, R. E., & Aliani, M. (2013). Inhibitions of renin and angiotensin converting enzyme activities by enzymatic chicken skin protein hydrolysates. *Food Research International, 53*(1), 260-267. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.05.010

Pazinatto, C., Malta, L. G., Pastore, G. M., & Maria Netto, F. (2013). Antioxidant capacity of amaranth products: effects of thermal and enzymatic treatments. *Food Science and Technology, 33*(3), 485-493 .

Peñta-Ramos, E. A., & Xiong, Y. L. (2002). Antioxidant Activity of Soy Protein Hydrolysates in a Liposomal System. *Journal of Food Science, 67*(8), 2952-2956. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2002.tb08844.x

Polanco-Lugo, E., Dávila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. A., & Chel-Guerrero, L. A. (2014). Effects of sequential enzymatic hydrolysis on structural, bioactive and functional properties of Phaseolus lunatus protein isolate. *Food Science and Technology, 34*(3), 441-448 .

Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international, 91*(4), 914-931 .

Silva-Sánchez, C., de la Rosa, A. P. B., León-Galván, M. F., de Lumen, B. O., de León-Rodríguez, A., & de Mejía, E. G. (2008). Bioactive Peptides in Amaranth (Amaranthus hypochondriacus) Seed. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56*(4), 1233-1240. doi:https://doi.org/10.1021/jf072911z

Sogi, D. S., Arora, M. S., Garg, S. K., & Bawa, A. S. (2002). Fractionation and electrophoresis of tomato waste seed proteins. *Food Chemistry, 76*(4), 449-454. doi:https://doi.org/10.1016/S0308-8146(01)00304-1

Taha, F. S., Mohamed, S. S., Wagdy, S. M., & Mohamed, G. F. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Science Journal, 21*(5), 651-658 .

Tatontos, M. I. (2015). *Analysis on degree of hydrolysis and molecular weight of lotus seed protein isolate by alcalase enzyme*. Retrieved from

Wu, H.-C., Chen, H.-M., & Shiau, C.-Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). *Food Research International, 36*(9), 949-957. doi:https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2

Zhang, H., Yu, L ,.Yang, Q., Sun, J., Bi, J., Liu, S., . . . Tang, L. (2012). Optimization of a microwave-coupled enzymatic digestion process to prepare peanut peptides. *Molecules, 17*(5), 5661-5674. doi:https://doi.org/10.3390/molecules17055661

Zhao, J., Huang, G., Zhang ,M., Chen, W., & Jiang, J. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant stability of shrimp processing byproduct hydrolysate. *Am J Food Technol, 6*(10), 904-913 .

Zhao, Q., Selomulya, C., Xiong, H., Chen, X. D., Ruan, X ,.Wang, S., . . . Zhou, Q. (2012). Comparison of functional and structural properties of native and industrial process-modified proteins from long-grain indica rice. *Journal of Cereal Science, 56*(3), 568-575. doi:https://doi.org/10.1016/j.jcs.2012.08.012

Antioxidant Activity of Faba Bean (*Vicia Faba*) Proteins Hydrolysates Produced by Alcalase and Trypsin

Seyedeh Parya Samaei[1], Mohammad Ghorbani[2*], Alireza Sadeghi Mahoonak[2], Mehran Alami[2]

1- PhD. Student, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author (m.ghorbani@gau.ac.ir)

Abstract

Enzymetic modification of proteins in order to break down specific peptide bonds and protein modification is widely used in the food industry. In this research, protein of faba bean seeds was hydrolyzed using alcalase and trypsin enzymes at three concentrations (1, 2 and 3%) and reaction times of 1-6 h at optimal temperature and pH of enzymes (50 and 37 °C, pH 8.5 and 7, respectively). Hydrolysis degree, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity, and iron chelating activity of hydrolyzed proteins were investigated. The results showed that the degree of hydrolysis increased with increasing reaction time and concentration of alcalase and trypsin enzymes. The time of hydrolysis and type of enzyme has a significant effect on the degree of hydrolysis, the antioxidant and chelating activity of the faba bean protein hydrolysates ($P<0.05$). The proteins hydrolyzed by alcalase at concentration of 3% and reaction time of 3 h had the highest antioxidant (75.41%) and metal chelating activity (55.95%). At the 1 and 2% concentration of trypsin, the highest DPPH radical scavenging activity was observed at 4 h which was 42.38 and 53.7 %, respectively. The most metal chelating activity in trypsin hydrolyzed treatments was observed in a reaction time of 2 h, after which the activity decreased. DPPH radical scavenging and metal chelating activity increased with increasing enzyme concentration. The results showed that alcalase have more efficiency in the production of anti-oxidant peptides compared to the trypsin.

Keywords: Antioxidant activity, Bioactive peptides, Enzymatic hydrolysis, Protein modification