نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد دوازدهم، شماره دوم، ۹۹
۲۵-۳۸
http://ejfpp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/ejfpp.2021.14033.1452

بررسی ویژگی‌های عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین باقلای هیدرولیز شده به روش هیدرولیز ترکیبی

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

[۱]دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان
[۲]عضو هیات‌علمی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، گلستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۲۲؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۹/۰۷

چکیده

سابقه و هدف: غذا نه تنها به‌عنوان منبع انرژی و ترکیبات اصلی برای رشد و سلامت بدن بلکه به عنوان منبع ترکیبات زیست‌فعال با اثرات مفید محسوب می‌شود. پپتیدهای زیست فعال جزء ترکیبات عملکردی محسوب می‌شوند که اخیراً در مواد غذایی شناخته شده‌اند. روش هیدرولیز آنزیمی به‌منظور بهبود ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است. ویژگی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده از آن‌ها را به عنوان ترکیبات ضد اکسایش در مدل‌های غذایی امکان‌پذیر می‌سازد. در پژوهش حاضر اثر استفاده از آنزیم‌های مختلف و ترکیب آن‌ها در تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی عملکردی مطلوب و فعالیت ضداکسایشی بالا مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: ایزوله‌ی پروتئین باقلا به‌وسیله آنزیم‌های تریپسین، آلکالاز و ترکیب آنزیم‌های تریپسین و آلکالاز در غلظت‌های ۱/۵ و ۳ درصد در زمان واکنش ۳ ساعت تولید شد. دما و pH بهینه‌ی هر آنزیم به‌ترتیب، دمای ۳۷ و ۵۰ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH ۷ و ۸/۵ بود. شاخص‌های حلالیت در pHهای ۱۲-۲، کف کنندگی و پایداری کف در pHهای ۴، ۶، ۸ و ۱۰، مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ و شلاته کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش حلالیت به‌ویژه در محدوده pH اسیدی شد. در pH ۳ پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز و ترکیب آنزیم آلکالاز و تریپسین ۳ درصد به‌ترتیب با ۶۴/۵۱ و ۶۰/۹۵ درصد از بیشترین حلالیت برخوردار بودند. با افزایش pH از۴ به ۸ کف کنندگی افزایش یافت؛ بطوریکه بیشترین کف کنندگی در pH ۸ مشاهده شد. کف کنندگی در pH ۱۰ در تمامی نمونه‌ها کاهش یافت. هیدرولیز آنزیمی پروتئین سبب افزایش کف کنندگی پروتئین دانه باقلا شد. پایداری کف پس از زمان ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. ایزوله‌ی پروتئین در pH ۴ پس از زمان ۶۰ دقیقه فاقد کف بود. بیشترین پایداری کف نیز در تمامی نمونه‌ها در pH ۸ مشاهده شد. نتایج نشان داد که هیدرولیز پروتئین دانه باقلا سبب افزایش معنی‌داری در پایداری کف گردید ($P<0/05$). در pH ۸ نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم تریپسین و ترکیب آنزیم تریپسین و آلکالاز در غلظت ۱/۵ درصد بیشترین پایداری کف را داشتند. هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش قابل ملاحظه‌ای در فعالیت مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ شد ($P<0/05$). بیشترین مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ (۷۵/۴۱ درصد) در نمونه هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز از تفاوت معنی‌داری با سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده برخوردار بود ($P<0/05$). فعالیت مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ در پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی تریپسین و ترکیب تریپسین و آلکالاز با غلظت‌های ۱/۵ و ۳ درصد به‌ترتیب ۷۲/۵۴، ۷۳/۰۶ و ۷۳/۶۲ درصد بود؛ هرچند تفاوت معنی‌داری بین این نمونه‌ها مشاهده نشد ($P<0/05$). هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش معنی‌داری

[*]مسئول مکاتبات: moghorbani@yahoo.com

در شلاته کنندگی یون آهن نسبت به ایزوله‌ی پروتئین باقلا شد (P<۰/۰۵). بیشترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به‌ترتیب با ۹۲/۷۲ و ۸۸/۶۸ درصد در پروتئین هیدرولیز شده توسط ترکیب آنزیم تریپسین و آلکالاز در غلظت ۱/۵ و ۳ درصد مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد آنزیم‌های مختلف در شرایط هیدرولیز ثابت روی یک سوبسترای ثابت اثرات متفاوتی اعمال می‌کنند. اصلاح آنزیمی پروتئین سبب ایجاد یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی می‌گردد که می‌توان از آن در مدل‌های غذایی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: اصلاح آنزیمی، ویژگی‌های عملکردی، پپتیدهای زیست فعال، ویژگی آنتی اکسیدانی

مقدمه

در سال‌های اخیر غذا نه تنها به عنوان منبع انرژی و ترکیبات اصلی برای رشد و سلامت بدن بلکه به عنوان منبع ترکیبات زیست فعال با اثرات مفید نیز محسوب می‌شود. پپتیدهای زیست فعال جزء ترکیبات عملکردی محسوب می‌شوند که اخیرا در مواد غذایی شناخته شده‌اند (۱۹). این ترکیبات زیست فعال قطعات کوچک پروتئینی با اثرات بیولوژیک می‌باشند و در حین هضم و یا هیدرولیز پروتئین در خارج از بدن موجود زنده تولید می‌شوند (۳۴، ۳۵). در سال‌های اخیر ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده (۲۱) بویژه انواع حاصل از منابع مختلف گیاهی مانند سویا (۱۰)، نخود (۳۸) و سبوس برنج (۱) با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا در برابر پراکسیداسیون لیپیدها و چربی‌ها گزارش شده است (۱۰، ۲۰).

ایزوله پروتئین‌های گیاهی و پروتئین هیدرولیز شده‌ی آن در فرمولاسیون گوشت، سوپ، محصولات لبنی و نانوایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بخش قابل توجهی از ویژگی‌های عملکردی مواد غذایی مربوط به پروتئین‌ها می‌باشد (۳). هرگونه تغییر در آرایش ساختمانی پروتئین‌ها سبب تغییر در ویژگی‌های عملکردی پروتئین نیز می‌گردد (۲).

حلالیت یکی از مهم‌ترین و به‌طورکلی اولین ویژگی عملکردی است که در حین تولید اجزای پروتئینی جدید مورد بررسی قرار می‌گیرد زیرا دارای اثر قابل توجهی در سایر ویژگی‌های عملکردی می‌باشد (۱۸). حلالیت کم سبب ایجاد ظاهر نامناسب و احساس دهانی شنی در محصول نهایی می‌شود (۲۶، ۲۸). ویژگی کف‌کنندگی نیز دارای اهمیت ویژه‌ای در صنایع غذایی می‌باشد زیرا بافت مطلوب و منحصر به فردی به غذاهای هوادهی شده و نوشیدنی‌ها از جمله بستنی، نان، کیک و آبجو می‌دهد. از آنجا که درک مصرف کننده از کیفیت مواد غذایی تحت تأثیر ظاهر قرار می‌گیرد، پایداری کف‌های غذایی از نقطه نظر پذیرش مصرف کنندگان امری ضروری است.

در بین پروتئین‌ها با منشأ گیاهی بقولات دارای تعادل خوبی در آمینواسیدهای ضروری هستند و به صورت گسترده در شکل‌های مختلف (نوشیدنی‌ها، دسرها، محصولات بافت داده شده و...) مورد استفاده قرار می‌گیرند (۹). باقلا به خانواده ولات[1] تعلق دارد و مشابه سایر گیاهان متعلق به خانواده‌ی بقولات، دارای مقادیر قابل توجهی پروتئین است (۱۳)؛ بطوریکه پودر چربی‌گیری شده دانه باقلا دارای حدود ۲۶ درصد پروتئین می‌باشد.

تاکنون پژوهش‌های متعددی در رابطه با اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از محصولات کشاورزی انجام شده است. با هیدرولیز پروتئین‌های جو (۴۱)، گلوتن گندم (۲۲)، دانه‌ی چای (۲۳)، بادام زمینی (۱۶) و نخود فرنگی (۴۲) حلالیت

1. *Leguminosae*

پروتئین به‌ویژه در pHهای اسیدی افـزایش یافـت. در پژوهشـی هیـدرولیز پـروتئین نخـودفرنگی بـا آنـزیم آلکالاز سبب افزایش حلالیت در تمام pHها شد و بـا افـزایش درجـه هیـدرولیز، حلالیـت در نقطـه ایزوالکتریک افزایش چشـمگیری نشـان داد (۱۴، ۴۲، ۴۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیـز شـده نخود با استفاده از ترکیب آنزیم آلکالاز و فلایورزایم[1] در مقایسه با ایزوله‌ی پروتئین بالاتر بود (۴۳).

از آنجایی که اطلاعات جامعی در رابطه با ویژگی عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده دانـه باقلا وجـود نـدارد، در ایـن پـژوهش اثـر اسـتفاده از آنـزیم‌هـای مختلـف و ترکیـب آن‌هـا در تولیـد پروتئین‌های هیدرولیز شده بـا ویژگی عملکـردی و ضداکسایشی مناسب مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: برای انجام تمامی آزمایش‌ها از باقلای رقم برکت تأیید شده توسط سازمان جهاد کشاورزی استان گلستان استفاده شد. آنزیم آلکالاز حاصـل از بـاکتری *Bacillus licheniformis* با فعالیت ۲/۴ واحد آنسـون به ازای یک میلـی‌لیتـر)، آنـزیم تریپسـین، فـروزین و DPPH• از شـرکت سـیگما خریـداری شـدند. اسـید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، اتـانول، کلریـد آهـن (II) و دی هیدروژن پتاسیم فسفات از شرکت تیتراکم تهیه شدند. تمامی مـواد دارای درجـه‌ی آزمایشـگاهی بودند.

آماده‌سازی آرد دانه باقلا: پس از حذف مواد خارجی از دانه‌های باقلا، دانه‌ها به همراه پوست توسط آسیاب برقی (آسان توس شرق، مـدل ۱۰۰۰، ایـران) بـه آرد تبدیل شدند. آرد حاصل پس از عبور از الک بـا مـش ۵۰ به‌مدت ۶ ساعت با حلال هگـزان بـه نسـبت ۱:۳ (وزنی/حجمی) چربی‌گیری شد. سپس هر ۲ سـاعت حلال تازه به نمونه اضافه و پـس از حـلال زدایـی و خشک شدن در دمای محیط به‌منظور ایجاد پودر دانـه باقلا از الک بـا مـش ۵۰ عبـور داده شـد. در نهایـت نمونه‌های خشک شده تا زمان اسـتخراج پـروتئین در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی‌گـراد نگهـداری شـد (۳۶).

استخراج پروتئین دانه باقلا: بـه منظـور تهیـه ایزولـه پروتئین باقلا، آرد چربی زدایی شده باقلا (۱۰۰ گـرم) با آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی) مخلوط و pH با استفاده از سود ۱ مولار بـه ۱۱ رسـانده شـد. سپس بـه‌مـدت ۶۰ دقیقـه در دمـای اتـاق و سـرعت ۵۰۰rpm هم زده شـد. عصـاره‌ی قلیـایی حاصـل در ۱۶۰۰×g و دمای ۴ درجه سـانتی‌گـراد بـه مـدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (هانیل Combi-514، کره‌جنوبی) شد. پس از جمع‌آوری روماند و تنظـیم pH بـا اسـتفاده از HCl (یک مولار) به ۳، پروتئین رسوب داده شـده بـا سانتریفیوژ جداسازی شد. در نهایت پروتئین حاصـل در خشـک‌کـن انجمـادی (آپـرون FDB-5503، کـره جنـوبی) خشـک گردیـد و تـا زمـان هیـدرولیز در کیسه‌های پلاستیکی در فریـزر بـا دمـای ۱۸- درجـه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۷).

هیدرولیز پـروتئین دانـه بـاقلا: بـه‌منظـور هیـدرولیز پروتئین دانه بـاقلا، پـودر ایزولـه پـروتئین حاصـل از مرحله قبل به نسبت ۴ درصد (وزنی/حجمی) در بافر فسفات (pH=۸/۵) برای آنزیم آلکـالاز و pH ۷ بـرای آنزیم تریپسین حل شد. عمل هیدرولیز در دمای بهینه آنزیم آلکالاز (۵۰ درجه سانتی‌گـراد) و تریپسـین (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و محدوده‌ی زمانی ۱ تـا ۶ سـاعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کـره‌جنـوبی) با ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، محلول پروتئین مجدداً در حمام آب ۸۲ درجـه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در استفاده از ترکیب دو آنزیم (تریپسین- آلکالاز) به این صورت

1. Flavourzyme

عمل شد که ابتدا سوبسترا به صورت محلول ایزوله پروتئین در غلظت ۴ درصد (وزنی/حجمی) در pH ۷ تهیه شد. سپس محلول تریپسین در غلظت ۱/۵ و ۳ درصد (وزنی/حجمی) در آب مقطر تهیه و pH مجدداً به ۷ رسانده شد. پس از این مرحله در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱/۵ ساعت گرمخانه گذاری شد. به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم تریپسین، محلول پروتئین در حمام آب ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت و پس از سرد شدن، pH به ۸/۵ رسانده شد. محلول آلکالاز ۱/۵ و ۳ درصد (وزنی/حجمی) هر یک به‌صورت مجزا اضافه و مجدداً به مدت ۱/۵ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، محلول پروتئین در حمام آب ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد عمل سانتریفوژ در ۱۰۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور تولید پودر پروتئین هیدرولیز شده، روماند حاصل در خشک‌کن انجمادی خشک و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۸).

اندازه‌گیری حلالیت: حلالیت پروتئین هیدرولیز شده دانه باقلا در pHهای مختلف به روش ور و همکاران (۱۹۹۷) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (۴۰). پروتئین هیدرولیز شده به نسبت ۱ به ۲۰ (وزنی/حجمی) با آب مقطر مخلوط شد. pH مخلوط حاصل با هیدروکسید سدیم و اسید کلریدریک ۱ مولار به محدوده ۱۲-۲ رسانده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای محیط به کمک همزن مغناطیسی تحت اختلاط قرار گرفت و pH دوباره تنظیم شد. نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه با دور g ×۱۲۰۰۰ سانتریفیوژ شده و از کاغذ صافی عبور داده شدند. پروتئین روماند هر نمونه که معرف پروتئین‌های محلول می‌باشد به روش بیورت اندازه‌گیری شد (۴۰). حلالیت به‌عنوان میزان پروتئین موجود در جزء محلول از طریق رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱

$$\text{درصد حلالیت پروتئین} = \frac{\text{پروتئین موجود در روماند}}{\text{پروتئین موجود در پروتئین هیدرولیز شده}} \times ۱۰۰$$

تعیین کف‌کنندگی و پایداری کف: ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد پروتئین به pH ۴، ۶، ۸ و ۱۰ رسانده شد. سپس به‌مدت ۲ دقیقه در ۱۶۰۰۰ دور بر دقیقه هموژن و مخلوط یکنواخت شده بلافاصله به یک استوانه مدرج ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. حجم کف اولیه پس از ۳۰ ثانیه قرائت و با استفاده از رابطه ۲ درصد کف کنندگی گزارش شد (۱۶).

رابطه ۲

$$\text{کف کنندگی} (٪) = \frac{\text{حجم کف اولیه}}{\text{حجم نمونه قبل از زده شدن}} \times ۱۰۰$$

برای اندازه‌گیری پایداری کف، نمونه زده شده به‌مدت ۳۰ دقیقه به حال خود رها شده و سپس حجم نمونه زده شده با استفاده از رابطه ۳ محاسبه شد.

رابطه ۳

$$\text{پایداری کف} (٪) = \frac{\text{حجم کف در دقیقه t}}{\text{حجم نمونه قبل از زده شدن}} \times ۱۰۰$$

فعالیت مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$: برای تعیین فعالیت مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$، ۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیز شده ۱ درصد با ۱ میلی‌لیتر محلول $DPPH^{\bullet}$ ۰/۱ میلی‌مولار تهیه شده در اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و مکان تاریک نگهداری و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به جای نمونه پروتئین هیدرولیز شده از ۱ میلی‌لیتر آب مقطر استفاده شد (۶). فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه ۴ محاسبه گردید.

رابطه ۴

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

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{2+}): برای تعیین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (Fe^{2+})، ۴/۷ میلی‌لیتر از محلول پروتئین ۱ درصد هیدرولیزشده 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 (۳۰). در نمونه‌ی شاهد به جای نمونه‌ی پروتئین از آب مقطر استفاده شد. فعالیت شلاته کنندگی از رابطه ۵ محاسبه گردید:

رابطه ۵

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

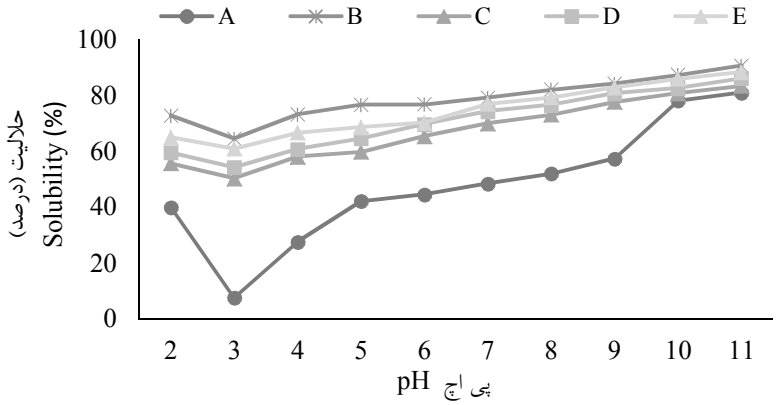
تجزیه و تحلیل آماری: به منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات حاصل از آزمایش از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. اثر دو فاکتور ثابت آنزیم و pH بر متغیرهای وابسته حلالیت، کف‌کنندگی و پایداری کف بررسی شد. در رابطه با مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$ و شلاته کنندگی یون آهن (Fe^{2+}) به عنوان متغیر وابسته، اثر یک فاکتور ثابت (آنزیم) مورد بررسی قرار گرفت. جهت تعیین اختلاف بین میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Excel استفاده شد. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

حلالیت: بر اساس نتایج حاصل از هیدرولیز آنزیم پروتئین دانه‌ی باقلا به وسیله‌ی آنزیم‌های تریپسین و آلکالاز (شکل ۱) افزایش قابل توجهی در حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده در مقایسه با ایزوله‌ی پروتئینی مشاهده می‌شود ($P<0.05$). کمترین حلالیت (۷/۶ درصد) در همه‌ی تیمارها در pH ۳ مشاهده شد؛ درحالی‌که حلالیت در نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز، تریپسین و ترکیب آنزیم‌ها در غلظت‌های ۱/۵ و ۳ درصد آنزیم به‌ترتیب به ۶۴/۵۱، ۵۰/۳۳، ۵۴/۳ و ۶۰/۹۵ درصد افزایش یافت (شکل ۱). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز دارای بیشترین حلالیت بود و پس از آن نمونه‌های حاصل از ترکیب آنزیم‌ها در غلظت ۳ درصد حلالیت بالاتری داشتند (شکل ۱). حین هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها وزن مولکولی کاهش می‌یابد، گروه‌ها از آمینواسیدهای آزاد، دی، تری و الیگوپپتیدها ایجاد می‌شوند و گروه‌های قطبی و یونیزه شونده در سطح افزایش می‌یابند. بنابراین حلالیت ترکیبات هیدرولیز شده افزایش، ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها تغییر و کیفیت عملکردی و قابلیت دسترسی آن‌ها افزایش می‌یابد (۱۴، ۲۹).

براساس پژوهش‌ها هیدرولیز پروتئین نخودفرنگی با آنزیم آلکالاز سبب افزایش حلالیت در تمام pHها گشت؛ بطوریکه با افزایش درجه هیدرولیز، حلالیت در نقطه‌ی ایزوالکتریک افزایش چشمگیری نشان داد (۱۴، ۴۲، ۴۴). با هیدرولیز آنزیمی گلوتن گندم نیز حلالیت در محدوده pH ۲-۱۲ افزایش یافت (۲۲). بررسی حلالیت پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه‌ی چای در دامنه‌ی pH ۲-۱۲ و در درجات هیدرولیز مختلف نشان داد حلالیت تمامی نمونه‌های هیدرولیز شده با افزایش درجه هیدرولیز بویژه در pH ۴ افزایش یافت (۲۳). هیدرولیز ترکیبی ایزوله پروتئین لوبیا با استفاده

از آنزیم‌های پپسین و پانکراتین سبب افزایش حلالیت و کف‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده در مقایسه با ایزوله‌ی پروتئین در نقطه‌ی ایزوالکتریک شده بود (۳۲). این امر به دلیل تغییر در کنفورماسیون پروتئین ناشی از اثر فعالیت اندوپپتیدازی آنزیم‌ها می‌باشد (۵). اصلاحات جزئی در وزن مولکولی زنجیره‌های پروتئینی سبب افزایش حلالیت آن‌ها در محیط‌های آبی می‌شود (۲۵).



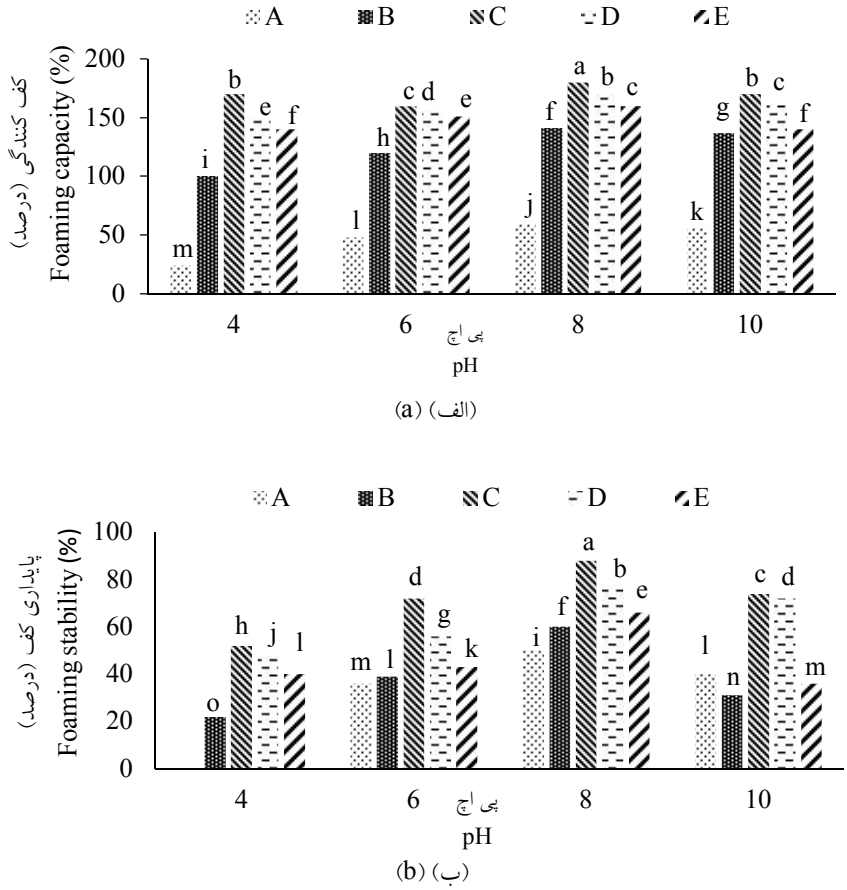
شکل ۱- حلالیت ایزوله پروتئین باقلا (A) و پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی باقلا توسط آنزیم‌های مختلف (B: آلکالاز ۳٪، C: تریپسین ۳٪، D: تریپسین ۱/۵٪- آلکالاز ۱/۵ ٪، E: تریپسین ۳٪- آلکالاز ۳٪) در pHهای مختلف.

Figure 1. Solubility of Faba bean protein isolate (A) and Faba bean protein hydrolyzed by different enzymes (B: Alcalase 3%, C: Trypsin 3%, D: Trypsin 1.5%-Alcalase 1.5%, E: Trypsin 3%-Alcalase 3%) at different pH values.

کف‌کنندگی و پایداری کف: کف‌ها سیستم‌های کلوئیدی با فاز پیوسته‌ی مایع یا فاز آبی و فاز پراکنده‌ی گاز یا هوا هستند. کف‌های غذایی عموماً در اثر تکان دادن و یا هم‌زدن شدید ایجاد می‌شوند و روش مورد استفاده بر ویژگی‌های کف حاصل موثر است. ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف دو ویژگی رایج کف‌ها هستند. پایداری کف بستگی به استحکام فیلم پروتئینی و نفوذ ناپذیری آن به هوا دارد. پروتئین‌های غذایی توانایی ایجاد کف خوبی دارند. پروتئین‌ها در دیسپرسیون‌ها سبب کاهش کشش سطحی در سطح بین آب و هوا و در نتیجه ایجاد کف می‌شوند (۳۷). بر اساس نتایج پژوهش حاضر، کف‌کنندگی ایزوله پروتئین باقلا و نمونه‌های هیدرولیز شده در pHهای مختلف با افزایش pH از ۴ به ۸ افزایش یافت (شکل ۲-الف). بیشترین کف‌کنندگی در pH ۸ مشاهده شد و در pH ۱۰ در تمامی نمونه‌ها کف‌کنندگی کاهش یافت (شکل ۲-الف). افزایش کف‌کنندگی پروتئین دانه باقلا تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی را می‌توان به تولید پپتیدهای دوگانه دوست[1] پس از هیدرولیز نسبت داد. همچنین کاهش وزن مولکولی سبب افزایش انعطاف‌پذیری و تشکیل لایه‌ی پایدارتر در منطقه‌ی بین سطحی می‌شود. در نتیجه با افزایش سرعت انتشار به سطح مشترک[2] کف‌کنندگی افزایش می‌یابد (۲۴). بیشترین کف‌کنندگی در pH ۸ در نمونه‌های هیدرولیز شده‌ی تریپسین مشاهده شد و پس از آن به ترتیب، در نمونه‌های هیدرولیزشده توسط ترکیب آنزیم‌ها با غلظت ۱/۵ درصد، ترکیب آنزیم‌ها با غلظت ۳ درصد و آلکالاز مشاهده شد. مطالعات نشان دادند هیدرولیز جزئی ایزوله‌ی پروتئین نخود فرنگی با آنزیم آلکالاز سبب افزایش کف

1. Amphiphilic
2. Interface

کننـدگی شـد؛ در صـورتی‌کـه ایزولـه‌ی پـروتئین نخـودفرنگی فاقـد قـدرت کـف‌کننـدگی بـود (۴۲). پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا بـه وسـیله آنـزیم‌هـای پپسین و پاپـائین در pHهـای ۴، ۵/۵ و ۷ نسـبت بـه ایزوله پروتئین سویا کف‌کننـدگی بیشـتری نشـان داد (۳۹). سایر پژوهش‌ها نیز نشان داد که پروتئین کلزای هیدرولیزشده بـه‌وسـیله آنـزیم آلکـالاز کـف‌کننـدگی بیشتری نسبت به پروتئین اولیه داشت (۷). هیـدرولیز ترکیبی ایزوله پروتئین لوبیا (*Phaseolus lunatus* L.) با استفاده از آنزیم پپسین و پـانکراتین سـبب افـزایش ویژگی کف‌کنندگی در مقایسه با ایزوله پروتئین لوبیـا شد (۳۲).



شکل۲- ظرفیت کف‌کنندگی (الف) و پایداری کف (ب) ایزوله پروتئین باقلا (A) و پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی باقلا توسط آنزیم‌های مختلف (B: آلکالاز ۳٪، C: تریپسین ۳٪، D: تریپسین ۱/۵٪- آلکالاز ۱/۵ ٪، E: تریپسین ۳٪- آلکالاز ۳٪) در pH های مختلف.

***حروف متفاوت نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P<۰/۰۵)**

Figure 2. Foaming capacity (a) and foaming stability (b) of Faba bean protein isolate (A) and Faba bean protein hydrolyzed by different enzymes (B: Alcalase 3%, C: Trypsin 3%, D: Trypsin 1.5%-Alcalase 1.5%, E: Trypsin 3%-Alcalase 3%) at different pH values.

*Different letters represent a significant statistical difference between the means (P <0.05)

پایداری کف در pHهای مختلف پس از زمان ۶۰ دقیقه در شکل ۲-ب نشان داده شده اسـت. ایزولـه‌ی پروتئین در pH ۴ پس از زمان ۶۰ دقیقه فاقد کف بود. بیشترین پایداری کـف در تمـامی نمونـه‌هـا در pH ۸ مشاهده شـد و هیـدرولیز پـروتئین دانـه بـاقلا سـبب افزایش معنی‌داری در پایداری کف گردید (شـکل ۲-ب). در pH ۸ نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنـزیم تریپسین و ترکیب آنزیم تریپسین و آلکالاز در غلظت ۱/۵ درصد بیشترین پایداری کف را داشتند (شکل ۲-ب). در پژوهشـی اثـر هیـدرولیز محـدود ایزولـه‌ی

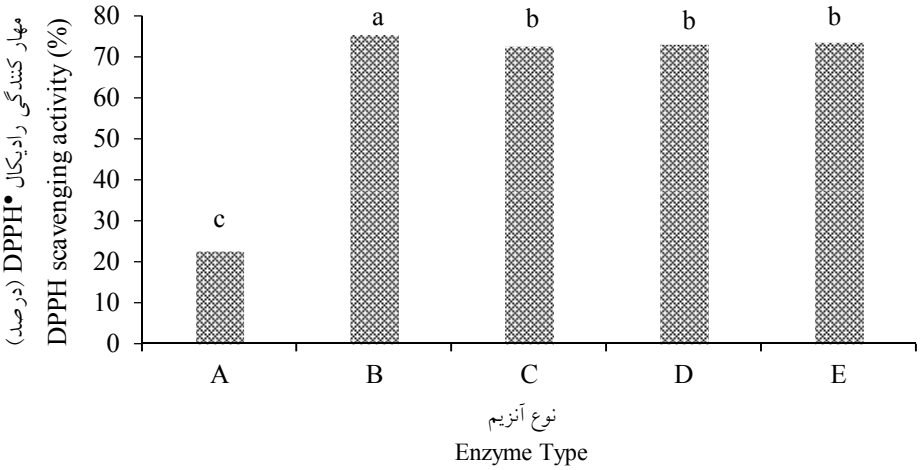
پروتئین نخود به وسیله‌ی آنزیم کیموسین[1] در pH های ۳، ۵، ۷ و ۸ بر ویژگی کف‌کنندگی مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی pHها نمونه‌های هیدرولیز شده دارای کف کنندگی و پایداری کف بهتری نسبت به ایزوله‌ی پروتئینی بودند (۴). بر اساس گزارشات موجود در پروتئین هیدرولیز شده‌ی جوانه‌ی گندم در درجات پایین هیدرولیز ۷۴ درصد افزایش در ظرفیت کف‌کنندگی و بیشینه پایداری کف مشاهده شد (۱۱).

مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$: نتایج مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$ پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی باقلا در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$ (۷۵/۴۱ درصد) در نمونه‌ی هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز حاکی از وجود تفاوت معنی‌دار با سایر پروتئین‌های هیدرولیزشده می‌باشد ($P<0/05$). فعالیت مهارکنندگی رادیکال $DPPH^{\bullet}$ در پروتئین‌های هیدرولیز شده باقلا با تریپسین (۷۲/۵۴ درصد)، ترکیب تریپسین و آلکالاز با غلظت‌های ۱/۵ درصد (۷۳/۰۶ درصد) و ۳ درصد (۷۳/۶۲ درصد) نیز تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P>0/05$). همانطور که مشاهده می‌شود (شکل ۳). هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش معنی‌داری در فعالیت مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ شد ($P<0/05$). بر اساس پژوهش‌های پیشین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به ترکیب آن‌ها وابسته است. به‌عنوان مثال، تری پپتیدهای حاوی تریپتوفان یا تایروزین در پایانه کربوکسیل زنجیره پپتیدی قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارند. تفاوت ترکیب آمینواسیدها در زنجیره‌های پپتیدی نیز سبب تغییر در ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. از آنجایی که مهارکنندگی رادیکال آزاد به فعالیت هیدروژن‌دهندگی گروه هیدروکسیل آمینواسیدهای آروماتیک وابسته است، بنابراین وجود و یا عدم وجود آمینواسیدهای مذکور در پپتیدها بر فعالیت مهارکنندگی $DPPH^{\bullet}$ متفاوت است. بنابراین هیدرولیز پلی‌پپتیدها در شرایط مختلف و تحت عمل آنزیم‌های متفاوت می‌تواند سبب ایجاد پروتئین‌های هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت گردد (۱۲). براساس نتایج پژوهش برخی محققان هیدرولیز ترکیبی لوبیا با استفاده از آنزیم پپسین و پانکراتین سبب افزایش ویژگی آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با ایزوله پروتئینی شد (۳۲). پروتئین هیدرولیز شده‌ی نخود با استفاده از ترکیب آنزیم آلکالاز و فلاپورزایم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به ایزوله پروتئین نشان داد (۴۳). فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیاری از منابع پروتئینی از جمله پروتئین سویا، کانولا و ذرت بعد از فرآیند هیدرولیز آنزیمی افزایش یافت (۱۲، ۲۱، ۳۱).

شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{2+}): شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی باقلا در شکل ۴ نشان داده شده است. همانطورکه ملاحظه می‌شود هیدرولیز آنزیمی سبب افزایش معنی‌داری در شلاته کنندگی یون آهن نسبت به ایزوله‌ی پروتئین باقلا گشت ($P<0/05$). بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی در پروتئین هیدرولیز شده توسط ترکیب آنزیم تریپسین و آلکالاز در غلظت ۱/۵ و ۳ درصد به‌ترتیب ۹۲/۷۲ و ۸۸/۶۸ درصد بود (شکل ۴). نوع آنزیم اثر معنی‌داری بر فعالیت شلاته‌کنندگی دارد ($P<0/05$). بطورکلی اندازه، ساختار و یا وجود توالی ویژه در پروتئین‌های هیدرولیزشده در بهبود ویژگی شلاته‌کنندگی موثر هستند . اثر نوع آنزیم بر شلاته کنندگی یون آهن در پژوهشی پیرامون هیدرولیز پروتئین بذرکتان توسط آنزیم‌های پپسین، تریپسین، پانکراتین، آلکالاز و فلاپورزایم بررسی شد. نتایج نشان داد شلاته‌کنندگی یون آهن در پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در بیشترین مقدار و در پروتئین هیدرولیزشده توسط فلاپورزایم در کمترین مقدار بود

1. Chymosin

(۱۷). تحقیقات وانگ و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین بذرکتان با استفاده از آنزیم پروتئاز *Bacillus altitudinis* فعالیت شلاته کنندگی یون آهن بسیار بالایی داشتند (۱۵). پروتئین هیدرولیز شده نخود با استفاده از ترمولایزین نیز ۹۵ درصد فعالیت شلاته کنندگی یون آهن نشان داد (۳۳).

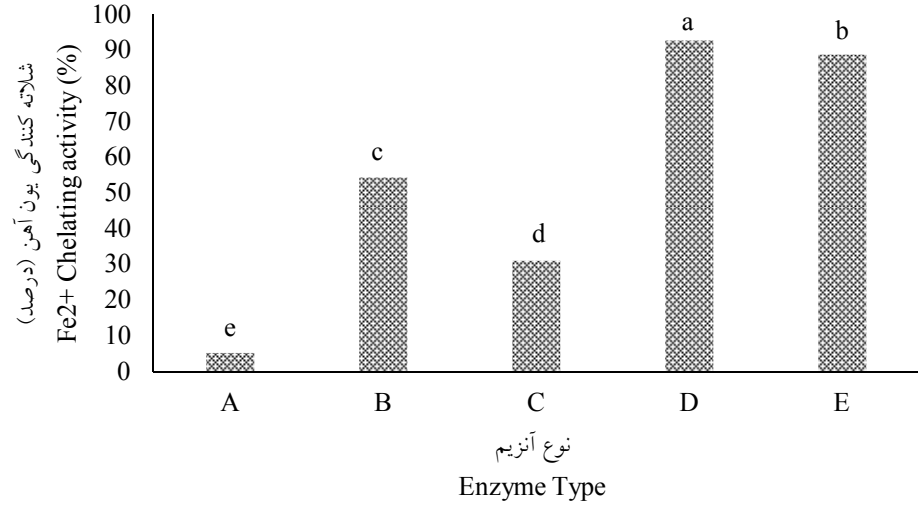


شکل ۳- مهارکنندگی رادیکال DPPH• ایزوله پروتئین باقلا (A) و پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی باقلا توسط آنزیم‌های مختلف (B: آلکالاز ۳٪، C: تریپسین ۳٪، D: تریپسین ۱/۵٪- آلکالاز ۱/۵ ٪، E: تریپسین ۳٪- آلکالاز ۳٪) در pHهای مختلف.

***حروف متفاوت نشان دهنده‌ی وجود اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P< ۰/۰۵)**

Figure 3. DPPH• radical scavenging activity of Faba bean protein isolate (A) and Faba bean protein hydrolyzed by different enzymes (B: Alcalase 3%, C: Trypsin 3%, D: Trypsin 1.5%-Alcalase 1.5%, E: Trypsin 3%-Alcalase 3%) at different pH values.

*Different letters represent a significant statistical difference between the means (P <0.05)



شکل٤- شلاته‌کنندگی یون آهن ایزوله پروتئین باقلا (A) و پروتئین‌های هیدرولیز شده باقلا توسط آنزیم‌های مختلف (B: آلکالاز ۳٪، C: تریپسین ۳٪، D: تریپسین ۱/۵ ٪- آلکالاز ۱/۵ ٪، E: تریپسین ۳٪- آلکالاز ۳٪) در pHهای مختلف.

***حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها می‌باشد (P< ۰/۰۵)**

Figure 4. Fe^{2+} chelating activity of Faba bean protein isolate (A) and Faba bean protein hydrolyzed by different enzymes (B: Alcalase 3%, C: Trypsin 3%, D: Trypsin 1.5%-Alcalase 1.5%, E: Trypsin3%-Alcalase 3%) at different pH values.

*Different letters represent a significant statistical difference between the means (P<0.05)

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد آنزیم‌های مختلف روی یک سوبسترای ثابت اثرات متفاوتی اعمال می‌کنند. پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ترکیب آنزیم‌ها، ویژگی‌های عملکردی و ضد اکسایشی قابل قبولی داشتند و تفاوت معنی‌دار با نمونه‌ی شاهد (ایزوله‌ی پروتئین باقلا) مشاهده شد. نوع آنزیم بر ویژگی‌های عملکردی و ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده موثر بود. پروتئین هیدرولیز شده‌ی باقلا حلالیت، کف‌کنندگی و پایداری کف، مهارکنندگی DPPH• و شلاته کنندگی بهتری در مقایسه با ایزوله پروتئین باقلا نشان داد. استفاده از ترکیب آنزیم تریپسین و آلکالاز نیز روش مناسبی برای بهبود ویژگی‌های عملکردی و ضد اکسایشی پروتئین باقلا محسوب می‌شود؛ بطوری‌که نمونه‌های هیدرولیز شده توسط ترکیب دو آنزیم آلکالاز و تریپسین ویژگی شلاته کنندگی یون آهن بالاتری در مقایسه با پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی هر یک از آنزیم‌ها به تنهایی داشتند. اگرچه بیشترین مهارکنندگی DPPH• در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز مشاهده شد اما، نمونه‌های حاصل از هیدرولیز ترکیب دو آنزیم نیز از قابلیت بالایی در مهار DPPH• برخوردار بودند و تفاوت معنی‌داری با نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم تریپسین نداشتند. در واقع اصلاح آنزیمی پروتئین سبب ایجاد یک منبع طبیعی آنتی‌اکسیدانی گردید که در مدل‌های غذایی می‌تواند به‌عنوان یک منبع ضد اکسایش طبیعی در نظر گرفته شود.

منابع

1. Adebiyi, A.P., Adebiyi, A.O., Ogawa, T., and Muramoto, K. 2008. Purification and characterization of antioxidative peptides from unfractionated rice bran protein hydrolysates. International J. of Food Science and Technology. 43: 1.35-43.
2. Aluko, R.E., and Yada, R.Y. 1995. Structure-function relationship of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: Influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. Food Chemistry. 53: 3.259-265.
3. Asadpour, E., Jafari, S.M., Sadeghi Mahoonak, A.R., and Ghorbani, M. 2011. Investigating the emulsifying and foaming capacity and the effect of acidity and ionic strength on the characteristics of different beans flour. Iranian Journal of Food Science and Technology. 7: 80-91.
4. Barac, M., Cabrilo, S., Stanojevic, S., Pesic, M., Pavlicevic, M., Zlatkovic, B., and Jankovic, M. 2012. Functional properties of protein hydrolysates from pea (*Pisum sativum,* L.) seeds. International J. of Food Science and Technology. 47: 7.1457-1467.
5. Benitez, R., Ibarz, A., and Pagan, J. 2008. Protein hydrolysates: Processes and applications. Acta Bioquimica Clinica Latinoamericana. 42: 2.227-236.
6. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and 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.
7. Chabanon, G., Chevalot, I., Framboisier, X., Chenu, S., and Marc, I. 2007. Hydrolysis of rapeseed protein isolates: Kinetics, characterization and functional properties of hydrolysates. Process Biochemistry. 42: 10.1419-1428.
8. Chanput, W., Theerakulkait, C., and Nakai, S. 2009. Antioxidative properties of partially purified barley hordein, rice bran protein fractions and their hydrolysates. J. of Cereal Science. 49: 3.422–428.
9. Chardigny, J. M., and Warland, S. 2016. Plant protein for food: Opportunities and

bottlenecks. Oil Seeds and Fats Crops and Lipids. 23: 4. 1-6.
10. Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J. of Agricultural and Food Chemistry. 46: 49-53.
11. Claver, I.P., and Zhou, H. 2005. Enzymatic hydrolysis of defatted wheat germ by proteases and the effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. J. of Food Biochemistry. 29: 1.13-26.
12. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry. 109: 144-148.
13. Duranti, M. 2006. Grain legume proteins and nutraceutical properties. Fitoterapia. 77: 2.67-82.
14. Ghribi, A.M., Gafsi, I.M., Sila, A. Blecker, C., Danthine, S., Attia, H., Bougatef, A., and Besbes, S. 2015. Effects of enzymatic hydrolysis on conformational and functional properties of chickpea protein isolate. Food chemistry. 187: 322-330.
15. Hwang, C.F., Chen, Y.A., Luo, C., and Chiang, W.D. 2016. Antioxidant and antibacterial activities of peptide fractions from flaxseed protein hydrolysed by protease from *Bacillus altitudinis* HK02. International J. of Food Science and Technology. 51: 3.681–689.
16. Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., and Arun Sharma, V. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry. 121: 1.178-184.
17. Karamac, M., Kosińska-Cagnazzo, A. and Kulczyk, A. 2016. Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. International J. of Molecular Sciences. 17: 7.1027-1040.
18. Kinsella, J.E., and Melachouris, N. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 7: 3.219-280.
19. Kitts, D.D. 1993. Bioactive substances in food: Identification and potential uses. Canadian J. of Physiology and Pharmacology. 72: 4.423-434.
20. Kitts, D.D., and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources: Application of bioprocesses used in isolation and recovery. Current Pharmaceutical Design. 9: 16.1309-1323.
21. Kong, B., and Xiong, Y.L. 2006. Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. J. of Agricultural and Food Chemistry. 54: 16.6059-6068.
22. Kong, X., Zhou, H., and Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. Food Chemistry. 101: 2.615-620.
23. Li, X., Shen, S., Deng, J., Li, T., and 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.
24. Liceaga-Gesualdo, A.M., and Li-Chan, E. C. Y. 1999. Functional properties of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). J. of Food Science. 64: 6.1000-1004.
25. Liu, Y., Zhao, G., Ren, J., Zhao, M., and Yang, B. 2011. Effect of denaturation during extraction on the conformational and functional properties of peanut protein isolate. Innovative Food Science and Emerging Technology. 12: 3.375-380.
26. Mahmoud, M.I., Malone, W.T., and Cordle, C.T. 1992. Enzymatic hydrolysis of casein: Effect of degree of hydrolysis on antigenicity and physical properties. Food Science. 57: 5.1223–1229.
27. Makri, E.A., Papalamprou, E.M., and Doxastakis, G.I. 2006. Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. J. of the Science of Food and Agriculture. 86: 12.1855–1862.
28. Molina Ortiz, S.E., and Anon, M.C. 2000. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional

properties of soy protein hydrolysates. J. of the American Oil Chemists' Society, 77: 12.1293-1301.
29. Mullally, M.M., O Callaghan, D.M., Fitzgerald, R.J., Donnelly, W.J., and Dalton, J.P. 1995. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. J. of Food Science. 60: 2.227-233.
30. Nalinanon, S.T., Benjakul, S., Kishimura, H., and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. J. of Food Chemistry. 124: 4.1354-1362.
31. Pena-Ramos, E.A., and Xiong, Y.L. 2002. Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. J. of Food Science. 67: 8.2952-2956.
32. Polanco-Lugo, E., Davila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D.A., and 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.
33. Pownall, T.L., Udenigwe, C.C., and Aluko, R.E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum sativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. J. of Agricultural and Food Chemistry. 58: 8.4712-4718.
34. Schlimme, E., and Meisel, H. 1995. Bioactive peptides derived from milk proteins: Structural, physiological and analytical aspects. Nahrung. 39: 1.1-20.
35. Smacchi, E., and Gobbetti, M. 2000. Bioactive peptides in dairy products: Synthesis and interaction with proteolytic enzymes. Food Microbiology. 17: 2.129-141.
36. Sogi, D.S., Arora, M.S., Garg, S.K., and Bawa, A.S. 2002. Fractionation of tomato waste seed proteins. Food Chemistry. 76: 4.449-454.
37. Surowka, K., and Fik, M. 1992. Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate. International J. of Food Science and Technology. 27: 1.9-20.
38. Tsai, P.J., and She, C.H. 2006. Significance of phenol–protein interactions in modifying the antioxidant capacity of peas. J. of Agricultural and Food Chemistry. 54: 22.8491-8494.
39. Tsumura, K., Saito, T., Tsuge, K., Ashida, H., Kugimiya, W., and Inouye, K. 2005. Functional properties of soy protein hydrolysates obtained by selective proteolysis. LWT- Food Science and Technology. 38: 3.255-261.
40. Were, L., Hiettiarachy, N.S., and Kalapathy, U. 1997. Modified soy proteins with improved foaming and water hydration properties. J. of Food Science. 62: 4.821-824.
41. Yalcin, E., and Celik, S. 2007. Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. Food Chemistry. 104: 4.1641-1647.
42. Yust, D.M., Pedroche, J., Millan-Linares, M.D.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., and Millan, F. 2010. Improvement of functional properties of chickpea proteins by hydrolysis with immobilized alcalase. Food Chemistry. 122: 4.1212-1217.
43. Yust, M.D.M., Millan-Linares, M.D.C., Alcaide-Hidalgo, J.M., Millan, F., and Pedroche, J. 2012. Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (*Cicer arietinum* L.) protein hydrolysates. J. of the Science of Food and Agriculture. 92: 9.1994-2001.
44. Zhao, G., Liu, Y., Zhao, M., Ren, J., and Yang, B. 2011. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. Food Chemistry. 127: 4.1438-1443.

EJFPP, Vol. 12 (2): 25-38
http://ejfpp.gau.ac.ir

Investigation of functional and antioxidant properties of Faba bean protein hydrolysates using combined hydrolysis

S.P. Samaei[1], M. Ghorbani[2*], A.R. Sadeghi Mahoonak[2], M. Alami[2]
[1]Ph.D graduate student of food Chemistry, Department of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
[2]Faculty member, Department of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
Received: 2017/10/14; Accepted: 2018/11/28

Abstract

Background and objectives: Food is considered not only as a source of energy and essential ingredients for growth and health but as a source of bioactive compounds with beneficial effects. Bioactive peptides are considered as functional compounds that have been known in food recently. Enzymatic hydrolysis is used to improve the functional properties of plant proteins. One of the features of the protein hydrolysates is their antioxidant activity, which makes it possible to use them as antioxidant agents in the diet. In this study, the effect of different enzymes and their combination in the production of protein hydrolysates with high functional and antioxidant properties was investigated.

Material and methods: Faba bean protein isolate was enzymatically hydrolyzed by trypsin and alcalase each, and in a successive way with trypsin and alcalase at the concentrations of 1.5 and 3% for reaction time of 3 h. The optimum temperature of 37 and 50 °C and pH of 7 and 8.5 was used for trypsin and alcalase, respectively. The solubility parameters at pH 2-12, foaming and foam stability at the pH level of 4, 6, 8 and 10, DPPH radical scavenging activity, and iron chelating activity of protein hydrolysates were investigated.

Results: The results showed that enzymatic hydrolysis increased the solubility, especially in acidic pH range. The protein hydrolysates derived from alcalase and trypsin-alcalase combinations (at the concentration of 3%) showed the highest solubility of 64.51% and 60.95% at pH value of 3, respectively. Foaming capacity enhanced with pH increment from 4 to 8. The maximum and minimum foaming capacity of protein hydrolysates were observed at pH values of 8 and 10, respectively, while protein isolate created no foam at pH value of 4. The highest foam stability was observed at pH level of 8 in all samples. The results also showed that hydrolysis of Faba bean protein significantly increased the foaming stability ($P<0.05$). Hydrolyzed samples from trypsin and trypsin-alcalase combination (at the concentration of 3%) showed the highest foam stability at pH=8. The enzymatic hydrolysis significantly increased the DPPH radical scavenging activity ($P<0.05$). Maximum DPPH radical scavenging activity was observed in the alcalase treated samples (75.71%) which showed significant difference with other treatments ($P<0.05$). There was no significant difference in the DPPH radical scavenging activity of trypsin treated samples (72.54%), and trypsin-alcalase combinations with concentrations of 1.5% (73.66) and 3% (73.62%) ($P>0.05$). The enzymatic hydrolysis significantly increased the iron chelating activity compared to Faba bean protein isolate ($P<0.05$).

*Corresponding author: moghorbani@yahoo.com

Conclusion: The results showed that different enzymes under constant hydrolysis conditions have different effects on a single substrate. Enzymatic modification of proteins creates a natural antioxidant source in food models, which may increase the shelf-life of products.

Keywords: Enzymatic modification, Functional properties, Bioactive peptides, Antioxidant properties.