اثر پیش تیمارهای حرارت و انجماد-یخ زدایی بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس به وسیله آنزیم آلکالاز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان

پرستو قاسمی[a]، مهتا میرزایی[b*]، سعید میردامادی[c]

[a] دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهر قدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[c] استاد پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۰۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۰۸/۱۸
https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1400.18.3.2.0

چکیده

مقدمه: فعالیت زیستی محصولات هیدرولیز پروتئینی تحت تاثیر نوع آنزیم، فعالیت آنزیم و شرایط هیدرولیز آنزیمی نظیر دما، زمان و نسبت آنزیم/ سوبسترا و فرآیند پیش تیمار پروتئین می‌باشد. فرآیند پیش تیمار می‌تواند از طریق تاثیر بر ساختار فضایی پروتئین و افزایش دسترسی آنزیم به باندهای پپتیدی، بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان موثر باشد.

مواد و روش‌ها: پروتئین استخراج شده از عدس ابتدا تحت پیش تیمارهای حرارت (۶۵، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) و انجماد-یخ زدایی (۳ سیکل انجماد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد و یخ زدایی در دمای محیط) و هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم آلکالاز (با نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰ آنسون / کیلوگرم پروتئین، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، ۳ ساعت) قرار گرفت. در طی زمان، پیشرفت هیدرولیز آنزیمی با روش ارتوفتال آلدئید (OPA) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش‌های مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفتند و با نمونه کنترل (بدون پیش تیمار) مقایسه شدند.

یافته‌ها: پیش تیمار نمونه در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۸۰ دقیقه، بیشترین اثر را در افزایش شدت هیدرولیز آنزیمی نسبت به نمونه‌های کنترل بدون پیش تیمار داشت. حداکثر میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (۶۳/۵۷ درصد) مربوط به نمونه پیش تیمار شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد و حداکثر میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (۳۶/۲۴ درصد) مربوط به نمونه پیش تیمار شده بوسیله فرآیند انجماد-یخ زدایی در زمان ۱۸۰ دقیقه بود.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان دادند که پیش‌تیمار حرارتی و انجماد-یخ زدایی قبل از هیدرولیز آنزیمی اثر مثبتی بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان دارد. بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، فرآیند پیش تیمار حرارتی پروتئین عدس در دمای ۶۵ درجه سانتی-گراد یا انجماد-یخ زدایی و هیدرولیز آنزیمی بوسیله آنزیم آلکالاز روشی موثر در تولید محصول هیدرولیز پروتئین عدس برای کاربرد در فرمولاسیون محصولات غذایی فراسودمند شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: *پیش تیمار حرارت، پیش تیمار انجماد-یخ زدایی، پروتئین عدس، پپتیدهای آنتی‌اکسیدان، هیدرولیز آنزیمی*

* نویسنده مسئول مکاتبات
email: mahtam86@gmail.com

مقدمه

تحقیقات مختلف در طی سال‌های گذشته نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین تغذیه و سلامت وجود دارد. تا به حال ترکیبات زیست فعال بسیاری از ماکرومولکول‌ها (نظیر لیپیدها و پروتئین‌ها) مشتق شده‌اند. ترکیبات مشتق شده از پروتئین‌ها جز مهم‌ترین و متداول‌ترین انواع مورد مطالعه هستند (Mirdamadi *et al*., 2017). محصولات هیدرولیز پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال به دلیل اثرات تغذیه‌ای و سلامت بخشی مورد توجه بسیاری از دانشمندان قرار گرفته‌اند و منابع پروتئینی مختلفی برای تولید این نوع محصولات مورد مطالعه و تحقیق قرار گرفته‌اند (Sarmadi and Ismail, 2010). در این میان پروتئین حبوبات و از آن جمله پروتئین عدس، مَرجو یا مَرجُمَک با نام علمی *Lens esculinaris* بعنوان یک منبع پروتئینی با ارزش، دارای پتانسیل بالایی برای تولید محصولات هیدرولیز پروتئینی حاوی پپتیدهای زیست فعال می‌باشد (Shekib *et al*.,1986; Shahidi *et al*., 2008; Joshi *et al*., 2017).

خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده به عوامل زیادی از جمله نوع سوبسترا، شرایط هیدرولیز (دما، زمان، pH)، نوع آنزیم و نوع فرآیند پیش تیمار پروتئین بستگی دارد (Adjonu *et al*., 2013). امروزه از روش‌های مختلفی نظیر تیمار با قلیا، اسید، اکسترود کردن، سونیکاسیون (امواج فراصوت)، مایکروویو، انجماد، حرارت و غیره برای پیش-تیمار پروتئین استفاده می‌شود (Ramaswamy and Singh, 2014). استفاده ترکیبی از پیش تیمار و هیدرولیز آنزیمی باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود (Chen *et al*., 2011). یکی از پیش تیمارهای موثر بر دناتوره شدن پروتئین‌ها و باز شدن ساختار پروتئین، تیمار حرارتی می‌باشد که باعث هیدرولیز غیر اختصاصی پیوندها می‌شود و هیدرولیز برخی از پروتئین‌های کروی را افزایش می‌دهد. استفاده از پیش تیمار حرارت قبل از هیدرولیز آنزیمی با تغییر در ساختار سه‌بعدی پروتئین می‌تواند باعث پیدایش پپتیدهای آزاد در طول هیدرولیز گردد و از این رو عملکرد هیدرولیز آنزیمی را بهبود دهد (Adjonu *et al*., 2013). یکی دیگر از پیش تیمارهای موثر بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی، پیش تیمار انجماد-یخ زدایی می‌باشد. در این روش بدون استفاده از مواد شیمیایی یا کاتالیزور و بدون ایجاد آلودگی زیست محیطی ساختار چهارم پروتئین باز شده و سطح دسترسی پروتئین برای هیدرولیز آنزیمی افزایش می‌یابد (Rooni *et al*., 2017).

تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان به عنوان نسل جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه واقع شده است. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی فعالیت قوی‌تری دارند اما به دلیل سمیت این ترکیبات شیمیایی استفاده از آن‌ها محدود شده است (Wang *et al*., 2017). در تحقیق حاضر اثر پیش تیمار حرارت و انجماد-یخ زدایی بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس به وسیله آنزیم آلکالاز در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

- مواد

عدس (واریته *Lens culinaris*) از بازار محلی تهیه شد، آنزیم آلکالاز بافعالیت ۲/۴ Au/kg protein از شرکت نوونزایم دانمارک خریداری شد، ۱-۱ دی فنیل-۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲و۲ آزینو بیس ۳-اتیل بنزوتیازولین - ۶ سولفونیک اسید (ABTS) از شرکت سیگما- آمریکا خریداری شدند. سرم آلبومین گاوی (BSA)، ارتوفتال آلدئید (OPA)، سدیم پتاسیم تارتارات، کربنات سدیم، سولفات مس، سدیم تترا بورات، سود سوزآور، معرف فولین از شرکت مرک- آلمان خریداری شدند.

- روش آماده‌سازی محلول پروتئینی

آماده‌سازی محلول پروتئینی طبق روش DE Castro و همکاران (۲۰۱۷) انجام شد. ابتدا عدس با استفاده از آسیاب برقی آرد شد. سپس ۲۰۰ گرم آرد با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و pH آن در ۹ با استفاده از سود ۰/۱ مولار تنظیم شد. سپس مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد همزده و نگهداری شد و در ۱۰۰۰۰ × g به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی-گراد سانتریفیوژ (Centric MF48-R، Merck آلمان) و سوپرناتانت (فاز رویی) جمع آوری شد. سپس pH محلول رویی با اسید هیدروکلریک ۱ مولار در ۴/۳ (pH ایزوالکتریک) تنظیم و مخلوط در ۱۰۰۰۰ ×g به مدت ۱۵

دقیقه، در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوب‌ها جمع‌آوری شدند و مجددا در آب به صورت سوسپانسیون درآمده و مجددا pH آن توسط سود ۰/۱ مولار خنثی گردید و برای هیدرولیز آنزیمی در شرایط سرما نگهداری شد (DE Castro *et al.*, 2017).

- پیش تیمار محلول پروتئینی

محلول پروتئینی در غلظت ۱/۰۶ میلی‌گرم / میلی‌لیتر در دماهای ۶۵، ۷۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت داده شدند. سپس نمونه‌ها بلافاصله سرد شدند و در شرایط سرما برای مراحل بعدی نگهداری شدند (Arrutia *et al.*, 2016).

- پیش تیمار انجماد- یخ زدایی

برای استفاده از پیش تیمار انجماد-یخ زدایی محلول پروتئینی (با غلظت ۱/۰۶ میلی‌گرم/ میلی لیتر) در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شد و مجددا یخ زدایی شد. این فرآیند سه بار تکرار شد و سپس نمونه برای مطالعات بعدی در شرایط سرما نگهداری شدند (Rooni *et al.*, 2017).

- هیدرولیز محلول پروتئینی

در ابتدا به منظور هیدرولیز آنزیمی، به ایزوله پروتئینی آماده شده (pH=۸، با استفاده از بافر فسفات ۵ میلی مولار)، آنزیم آلکالاز (با فعالیت ۲/۴ آنسون بر میلی لیتر)، نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰ آنسون / کیلوگرم پروتئین اضافه شد. سپس هیدرولیز آنزیمی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت در انکوباتور شیکردار (INC108، Memmert آلمان) با ۱۲۰ دور در دقیقه انجام شد. در فواصل زمانی ۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه نمونه-برداری انجام شد. سپس در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه آنزیم غیرفعال شد. نمونه به منظور حذف رسوبات احتمالی سانتریفوژ (g× ۵۰۰۰، به مدت ۱۵ دقیقه) و سپس در دمای یخچال نگهداری شد. ۵ سی‌سی نمونه نیز به عنوان نمونه کنترل و بدون آنزیم مورد بررسی قرار گرفت (Nourmohammadi *et al.*, 2015).

- اندازه‌گیری میزان پروتئین

محتوای پروتئین کل نمونه‌ها با استفاده از روش کلدال (Morr *et al.*, 1985) و میزان پروتئین محلول نمونه‌ها با روش لوری اندازه‌گیری شد.

در روش لوری، محلول A (ریجنت) از ترکیب ۱ سی-سی سولفات مس (۱٪)، ۱سی‌سی سدیم پتاسیم تارتارات (۲٪)، ۴۹ سی‌سی سود ۰/۱ نرمال و ۴۹ سی‌سی کربنات (۲٪) سدیم تهیه شدند. در زمان آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه با محلول A مخلوط شد و بلافاصله ورتکس و۱۰ دقیقه در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شدند. سپس محلول فولین رقیق شده (به نسبت ۱:۱ با آب) به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت ۲۰ دقیقه میزان جذب نور توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (PG Instruments، Merck آلمان) در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. مقدار پروتئین نمونه‌ها بر اساس منحنی استاندارد BSA (در غلظت‌های ۲۰۰- ۰ میلی‌گرم / میلی-لیتر، R^2= ۰/۹۹۵۸) و بر حسب میلی‌گرم / میلی‌لیتر گزارش شد (Lowry *et al.*, 1951).

- اندازه‌گیری میزان گروه‌های آمین آزاد به روش OPA

محلول ارتوفتال آلدئید از مخلوط ۲۵ سی‌سی سدیم تترا بورات (۱۰۰ میلی مولار)، ۲/۵ سی‌سی سدیم ۲ دسیل سولفات (۲۰٪)، ۴۰ میلی گرم ماده ارتوفتال آلدئید در متانول و ۱۰۰ میکرولیتر بتامرکاپتواتانول تهیه شد سپس با آب مقطر به حجم۵۰ سی‌سی رسانده شد. در زمان آزمایش، ۲۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با یک سی‌سی از محلول تهیه شده مخلوط شد و بلافاصله ورتکس و ۲ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی نگهداری شد. سپس ۱ سی-سی آب مقطر اضافه شد و جذب نمونه‌ها در ۳۴۰ نانومتر قرائت گردد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد لوسین (در غلظت‌های ۴-۱ میلی‌گرم / میلی‌لیتر، R^2= ۰/۹۹۶۹) مقدار گروه‌های آمین آزاد براساس میکرومول لوسین به ازاء میلی‌گرم پروتئین گزارش شد (Church *et al.*, 1983).

- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه (یا اتانول به عنوان کنترل) با ۱۸۰۰ میکرولیتر محلول ۰/۰۰۲ درصد DPPH در اتانول مخلوط شد. سپس مخلوط واکنش

در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد سپس کاهش جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH بر اساس رابطه زیر و به ازاء وزن مشخصی از پروتئین گزارش شد (Bondet *et al.*, 1997).

(رابطه ۱)

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال}\ (\%) = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

- فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

محلول ۷ میلی مولار از ABTS با پرسولفات پتاسیم ۲/۴۵ میلی مولار مخلوط و در دمای یخچال برای مدت ۱۷-۱۶ ساعت، نگهداری شد. محلول سبز آبی با بافر فسفات (۵ میلی مولار، pH=۷) تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. ۲۵ میکرولیتر از نمونه پروتئینی با ۱ سی‌سی معرف ABTS مخلوط شد و بعد از ۶ دقیقه نگهداری در دمای اتاق میزان جذب در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS بر اساس رابطه زیر و به ازاء وزن مشخصی از پروتئین گزارش شد (Re *et al.*, 1999).

(رابطه ۲)

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال}\ (\%) = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

- تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمون‌ها در سه تکرار، انجام شدند. رسم نمودارها و آنالیز آماری (با روش Two-way ANOVA) و مقایسه میانگین‌ها توسط تست Turkey multiple و به کمک نرم‌افزار graphpad prism 8 انجام شد. برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت بین میانگین‌ها از تجزیه واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده شد و میزان P-Value< 0.05 به عنوان سطح معنادار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- میزان پروتئین استخراج شده از دانه عدس

محتوای کل پروتئین عدس با روش کلدال ۲۴/۶ ٪ بر اساس وزن خشک پودر عدس و میزان پروتئین محلول پودر عدس (۲۰۰ گرم در ۱۰۰۰ میلی لیتر آب) با روش لوری به میزان پروتئین ۱/۰۶ میلی‌گرم/ میلی لیتر اندازه-گیری شد.

- اثر پیش تیمارهای حرارت و انجماد-یخ زدایی بر میزان گروه‌های آمین آزاد نمونه‌های پروتئینی قبل از آنزیم زنی

قبل از پرداختن به اثر پیش تیمار حرارتی (دماهای ۶۵، ۷۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) و انجماد- یخ زدایی (۲۰- درجه سانتی‌گراد در سه سیکل) بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی، اثر پیش تیمارها به تنهایی بر محتوای گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های پروتئینی قبل از آنزیم زنی مورد بررسی قرار گرفت.

همانگونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، میزان گروه-های آمین آزاد قبل از هیدرولیز آنزیمی در نمونه کنترل (بدون تیمار) ۳/۱۸ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد. اما میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های تحت پیش تیمار ۶۵، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد – یخ زدایی به ترتیب مقادیر ۳/۹۰، ۶/۲۳، ۶/۴۵ و ۶/۵۶ میکرومول لوسین / میلی‌گرم پروتئین اندازه‌گیری شد. نتایج تفاوت معناداری با نمونه کنترل نشان دادند ($p<0.05$).

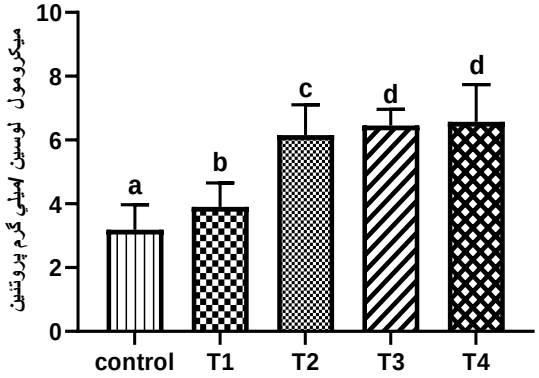
- اثر پیش تیمارهای حرارتی و انجماد-یخ زدایی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محلول پروتئین عدس قبل از آنزیم زنی

قبل از بررسی اثر پیش تیمارها بر روند هیدرولیز آنزیمی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محلول هیدرولیز پروتئین عدس، اثر پیش تیمارهای حرارتی و انجماد به تنهایی بر فعالیت آنتی-اکسیدانی (بر اساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS) نمونه مورد آزمایش بررسی شد. نتایج در شکل ۲ ارائه شده است.

همانگونه که در شکل A ۲ مشاهده می‌شود درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در محلول پروتئینی عدس (با غلظت پروتئین ۱/۰۶ میلی‌گرم / میلی‌لیتر پروتئین) قبل از هیدرولیز آنزیمی در نمونه کنترل (بدون تیمار) ۵۴/۷۶ درصد اندازه‌گیری شد. اما تیمارهای به کار رفته باعث افت نسبی فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌ها شد. بطوریکه درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH در نمونه‌های تحت پیش تیمار حرارت (۶۵ ، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی‌گراد) به ترتیب

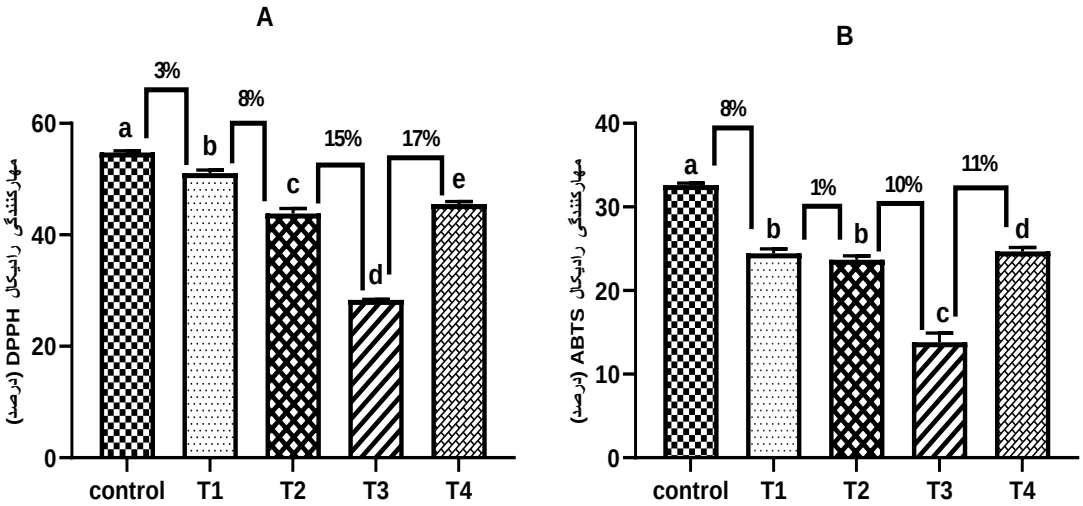
۵۱/۰۸، ۸۳ /۴۳، ۳۰ /۲۸ درصد اندازه‌گیری شدند و تفاوت نسبت به نمونه کنترل (بدون تیمار) معنی‌دار بود ($p<0.05$). مقدار فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در نمونه تحت پیش تیمار انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) ۴۵/۵۲ درصد می‌باشد که تفاوت معناداری با نمونه کنترل (بدون تیمار) مشاهده می‌شود ($p<0.05$).

مطابق شکل B ۲ درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS قبل از هیدرولیز آنزیمی در نمونه کنترل (بدون تیمار)، ۳۲/۰۵ درصد اندازه‌گیری شد و این مقدار در نمونه‌های تحت پیش تیمارهای حرارت (۶۵ ، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی-گراد) به ترتیب به مقادیر ۲۴/۴۳، ۶۷/ ۲۳، ۱۳/۸۰ درصد رسیدند وتفاوت معناداری را با نمونه کنترل (بدون تیمار) نشان دادند ($p<0.05$). درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS در نمونه تحت پیش تیمار انجماد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نیز ۲۴/۶۹ درصد اندازه‌گیری شد که تفاوت معناداری با نمونه کنترل (بدون تیمار) داشت ($p<0.05$).



شکل ۱- بررسی میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه‌های تحت پیش تیمار ٦٥ درجه سانتی‌گراد (T1)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T2)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد (T3) انجماد – یخ زدایی (T4) و مقایسه با نمونه کنترل (بدون تیمار) قبل از هیدرولیز آنزیمی. محتوای پروتئین همه نمونه‌ها یکسان است.

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده‌های هر تیمار در طی زمان می‌باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری ($p>0.05$) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌هاست.



شکل ۲- مقایسه مهار رادیکال‌های DPPH (A) و ABTS (B) در نمونه‌ی کنترل (بدون تیمار) و نمونه‌های پیش تیمار داده شده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد (T1)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T2)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد (T3) و انجماد –یخ زدایی (T4).

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده های هر تیمار در طی زمان می باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری ($p>0.05$) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌هاست.

- تولید محصول هیدرولیز پروتئین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز

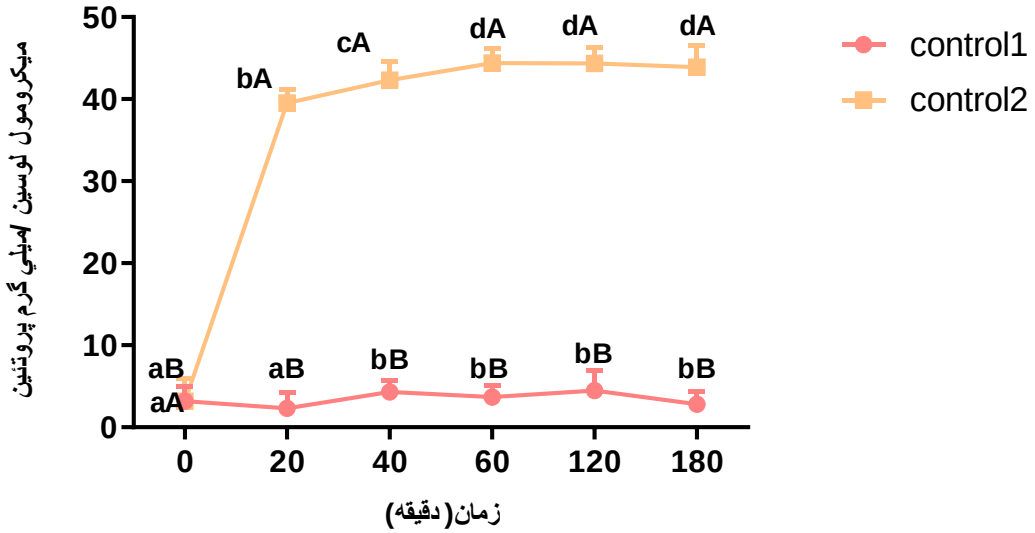
نتایج مربوط به تغییرات میزان گروه‌های آمین آزاد بعنوان معیاری از پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در طی زمان در نمونه فاقد آنزیم و نمونه هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز که بعدا به ترتیب تحت عنوان نمونه‌های کنترل ۱ و ۲ شناخته می‌شوند در شکل ۳ ارائه شده است.

همانگونه که در شکل ۳ مشاهده می‌گردد، با گذشت ۶۰ دقیقه از شروع واکنش آنزیمی، محتوای گروه آمین آزاد بعنوان معیاری از شدت هیدرولیز آنزیمی، افزایش یافته است. بیشترین میزان هیدرولیز در ۲۰ دقیقه اول اتفاق افتاده است. بطوری که میزان گروه‌های آمین آزاد از ۳/۱۸ به ۳۹/۵۲ میکرومول لوسین / میلی‌گرم پروتئین رسیده است و بعد از ۶۰ دقیقه تا پایان واکنش فرآیند هیدرولیز آنزیمی کند و یا متوقف شده است. علاوه برآن نتایج نشان می‌دهند که میزان هیدرولیز در نمونه هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز (کنترل ۲) به طور معنی‌داری بالاتر از نمونه فاقد آنزیم آلکالاز (کنترل ۱) است ($p<0.05$).

- اثر پیش تیمارهای حرارتی و انجماد -یخ زدایی بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز

در ادامه، پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در نمونه‌های قرار گرفته تحت پیش تیمارهای حرارتی و غیرحرارتی ارزیابی و با نمونه‌های کنترل ۱ و کنترل ۲ مقایسه شد.

همانگونه که نتایج ارائه شده در شکل ۴، نشان می‌دهند پیش تیمارهای حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی-گراد (شکل A ۴)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد (شکل B ۴) و انجماد-یخ زدایی (شکل ۴D) باعث افزایش میزان هیدرولیز آنزیمی و آزادسازی گروه‌های آمین آزاد در مقایسه با نمونه‌های کنترل شده‌اند. همانطور که در شکل ۴A مشاهده می‌گردد، میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه عدس تیمار داده شده در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد از همان ابتدای کار روند افزایشی داشته است به نحوی که در ۴۰ دقیقه اول از ۳/۹۰ به ۵۰/۴۸ میکرومول لوسین/ میلی گرم پروتئین رسیده است. سپس با توقف روند هیدرولیز همراه بوده است و در ۱۸۰ دقیقه دوباره روند افزایشی داشته و به ۵۰/۸۱ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسیده است. میزان هیدرولیز در نمونه تحت تیمار در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه کنترل۱ و کنترل۲ اختلاف معناداری را نشان داد ($p<0.05$).



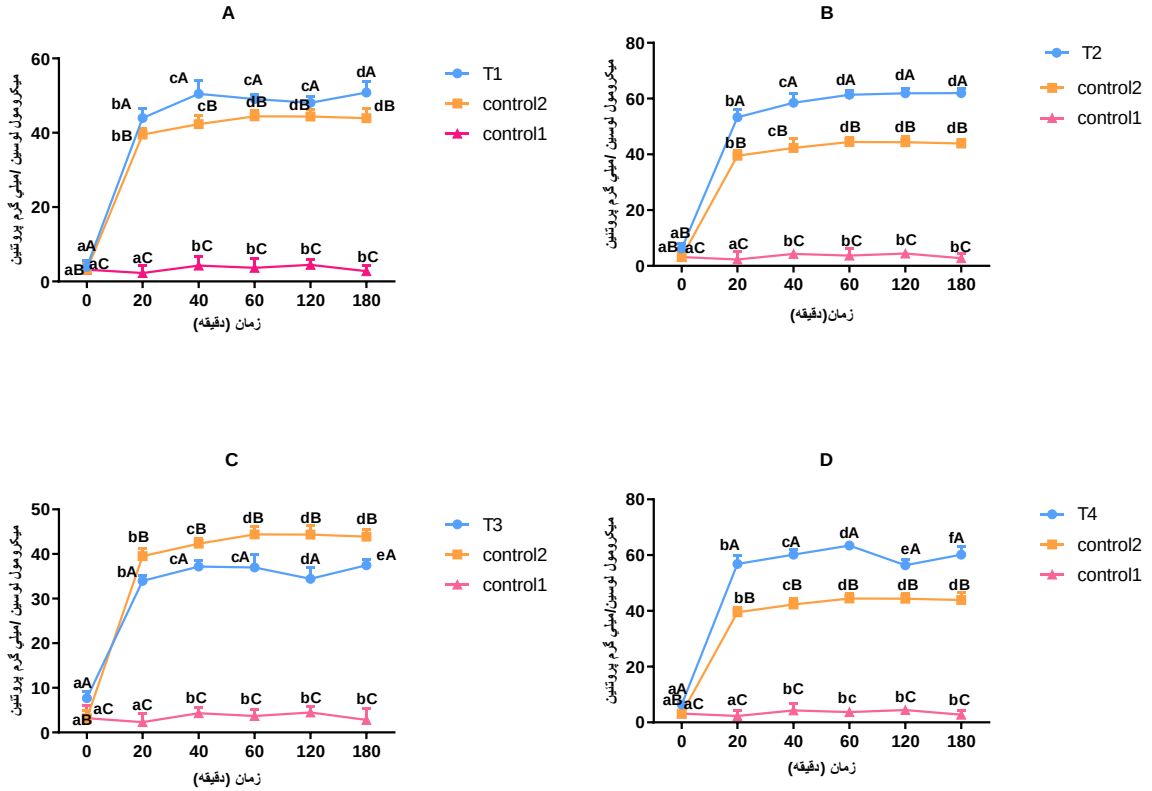
شکل ۳- بررسی هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم آلکالاز در طی ۳ ساعت (کنترل ۲) و مقایسه آن با نمونه کنترل فاقد آنزیم (کنترل ۱) اندازه‌گیری شده با روش OPA.

حروف کوچک متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه عدس تیمار داده شده در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به وسیله آنزیم آلکالاز (شکل B ۴) از همان ابتدای کار روند افزایشی داشته است به نحوی که در ۶۰ دقیقه ۳/۹۰ به ۶۱/۳۸ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسیده است. سپس با توقف روند هیدرولیز همراه بوده است. میزان هیدرولیز حاصل از تیمار نمونه با دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با نمونه کنترل۱ و کنترل۲ اختلاف معناداری را نشان داد ($p<0.05$).

در نمونه تیمار داده شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد، با وجود اینکه پیش تیمار حرارتی به تنهایی باعث افزایش میزان گروه‌های آمین آزاد شده بود (شکل C ۴) اما در جریان هیدرولیز آنزیمی بوسیله آلکالاز با وجود پیشرفت هیدرولیز آنزیمی، اما در تمام مراحل مقدار گروه‌های آمین اندازه‌گیری شده کمتر از مقدار آن در نمونه کنترل ۲ (هیدرولیز شده) بود.

مطابق شکل D ۴ میزان گروه‌های آمین آزاد در نمونه عدس پیش تیمار داده شده در شرایط انجماد – یخ زدایی و هیدرولیز شده به وسیله آنزیم آلکالاز، در ۶۰ دقیقه از میزان ۳/۹۰ به ۶۳/۴۴ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید. سپس با کاهش روند هیدرولیز به ۵۶/۳۹ میکرومول لوسین/ میلی‌گرم پروتئین رسید و دوباره تا دقیقه ۱۸۰ دقیقه روند افزایشی داشته و در نهایت به ۶۰/۱۶ میکرومول لوسین / میلی‌گرم پروتئین رسید. میزان هیدرولیز حاصل از تیمار نمونه به وسیله انجماد (در دمای ۲۰- درجه سانتی-گراد) در مقایسه با نمونه کنترل۱ و کنترل۲ اختلاف معناداری را نشان داد ($p<0.05$).



شکل ٤- مقایسه پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در نمونه‌های پیش تیمار داده شده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد T1 (نمودار A)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد T2 (نمودار B)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد T3 (نمودار C) و تحت شرایط انجماد-یخ زدایی T4 (نمودار D) و مقایسه با نمونه کنترل ۱ و کنترل ۲.

حروف کوچک متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین داده‌های هر تیمار در طی زمان و حروف بزرگ متفاوت نشاندهنده اختلاف آماری معنی دار بین تیمارها در هر زمان می‌باشد ($p<0.05$).

- اثر پیش تیمارهای حرارتی و انجماد-یخ زدایی بر روند تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان با خاصیت مهار رادیکال DPPH در جریان هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز

نتایج ارائه شده در شکل ۵ نشان می‌دهند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی محلول پروتئین عدس در نمونه کنترل ۱ تغییر معنی‌داری نداشته است ($p>0.05$). به عبارتی قرار گرفتن در شرایط هیدرولیز آنزیمی (از نظر دمایی و زمانی) تا زمان ۱۲۰ دقیقه باعث تغییری در این فعالیت نشده است. گرچه زمان طولانی‌تر تحت شرایط دمایی فوق، باعث افت معنی‌دار در میزان فعالیت شده است ($p<0.05$).

در نمونه کنترل ۲ هیدرولیز آنزیمی علیرغم اینکه باعث افزایش درجه هیدرولیز شد اما تاثیر معنی‌داری بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نداشت و باز هم در دقیقه ۱۸۰، افت ۱۶درصدی در میزان فعالیت مشاهده شد.

پیش تیمار حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (شکل C ۵)، باعث افت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در آغاز فرآیند شد. بطوریکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ابتدای فرآیند کمتر از نمونه‌های کنترل ارزیابی شد. اما نتایج نشان دادند تیمار حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد باعث تشدید هیدرولیز آنزیمی و افزایش میزان تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان می‌گردد. بطوریکه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، تا دقیقه ۴۰ افزایش یافته و به مقدار ۵۹/۸۴ درصد رسید و در نهایت در زمان ۱۸۰ دقیقه به مقدار ۶۳/۵۷ درصد رسید و بطور معنی‌داری بالاتر از نمونه‌ی کنترل ۲ (۱۶ درصد) می‌باشد. پیش تیمار حرارتی در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد و تحت شرایط انجماد-یخ زدایی نیز باعث شد، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، به مقادیر حداکثری به ترتیب ۵۹/۸۹ و ۵۰/۴۵ درصد در دقایق ۱۸۰ برسد. پیش تیمار در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد باعث افت شدید فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ابتدای فرآیند شد و با وجود تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در جریان هیدرولیز آنزیمی، اما میزان فعالیت از دست رفته جبران نشد. بطوریکه میزان فعالیت از ۲۸/۳۰ درصد در ابتدای فرآیند به ۳۲/۶۵ درصد بعد از ۱۸۰ دقیقه رسید.

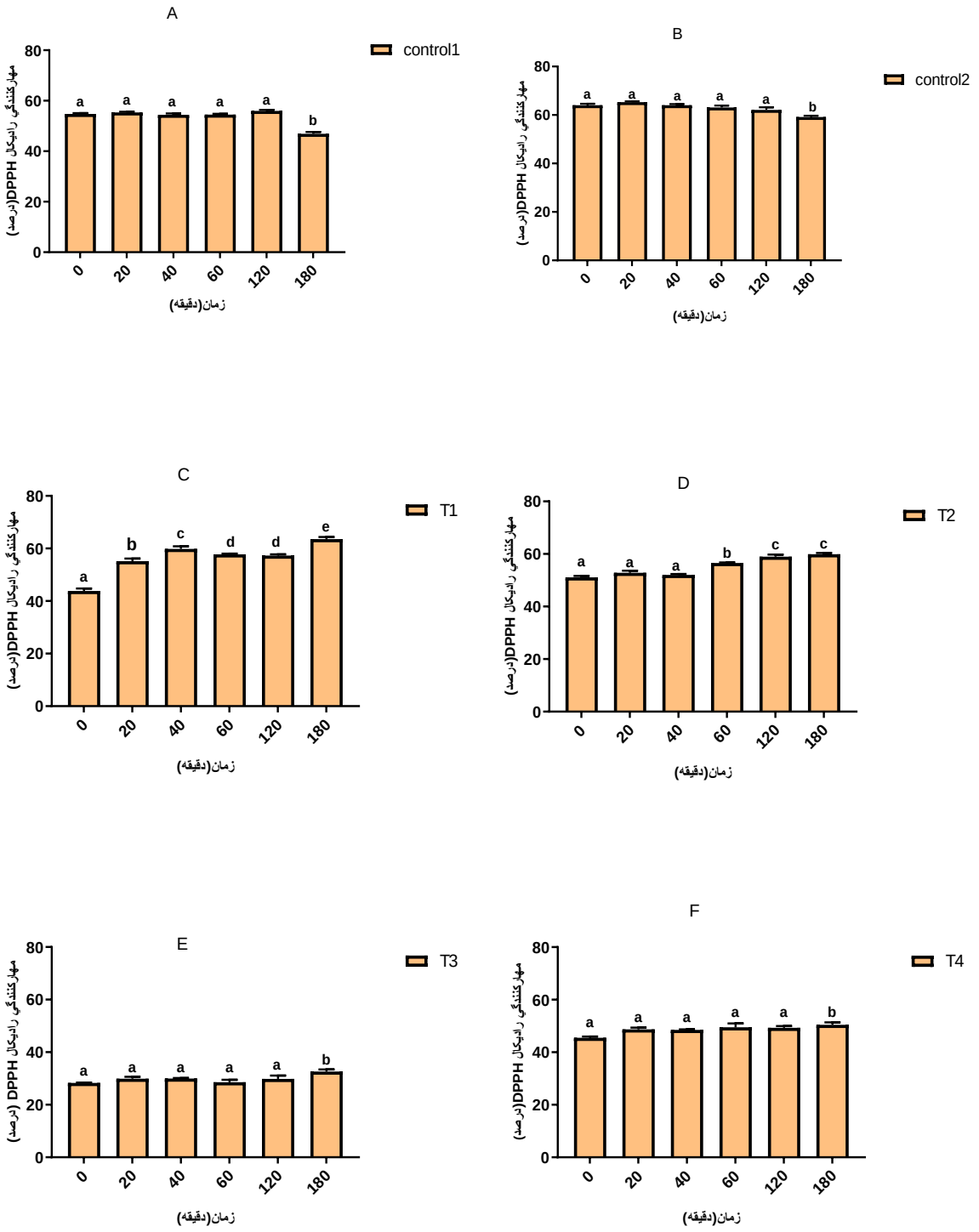
- اثر پیش تیمارهای حرارتی و انجماد-یخ زدایی بر روند تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان با خاصیت مهار رادیکال ABTS در جریان هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز

همانگونه که در شکل B ۶ مشاهده می‌شود هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس بوسیله آنزیم آلکالاز باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS شده است. بطوریکه میزان مهار رادیکال آزاد ABTS، تا دقیقه ۶۰ روند افزایشی را طی کرده است. سپس در دقیقه ۱۲۰ و ۱۸۰، بدون تغییر باقی مانده است ($P>0.05$).

پیش تیمار حرارتی در دمای ۶۵، ۷۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط انجماد-یخ زدایی با وجود اینکه باعث شدند فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یابد، اما تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان مهارکننده رادیکال ABTS را در مقایسه با نمونه کنترل ۲ (هیدرولیز شده) در طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی افزایش یافت. به طوریکه در نمونه‌ی کنترل ۲ (هیدرولیز شده) و نمونه‌های تحت پیش تیمارهای ۶۵، ۷۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد یخ زدایی به ترتیب ۳۶/۳۴، ۳۴/۹۶، ۳۵/۸۳، ۳۶/۲۴ درصد افزایش فعالیت مشاهده شد در حالیکه در نمونه‌های حرارت داده شده در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد، چنین اثری مشاهده نشد.

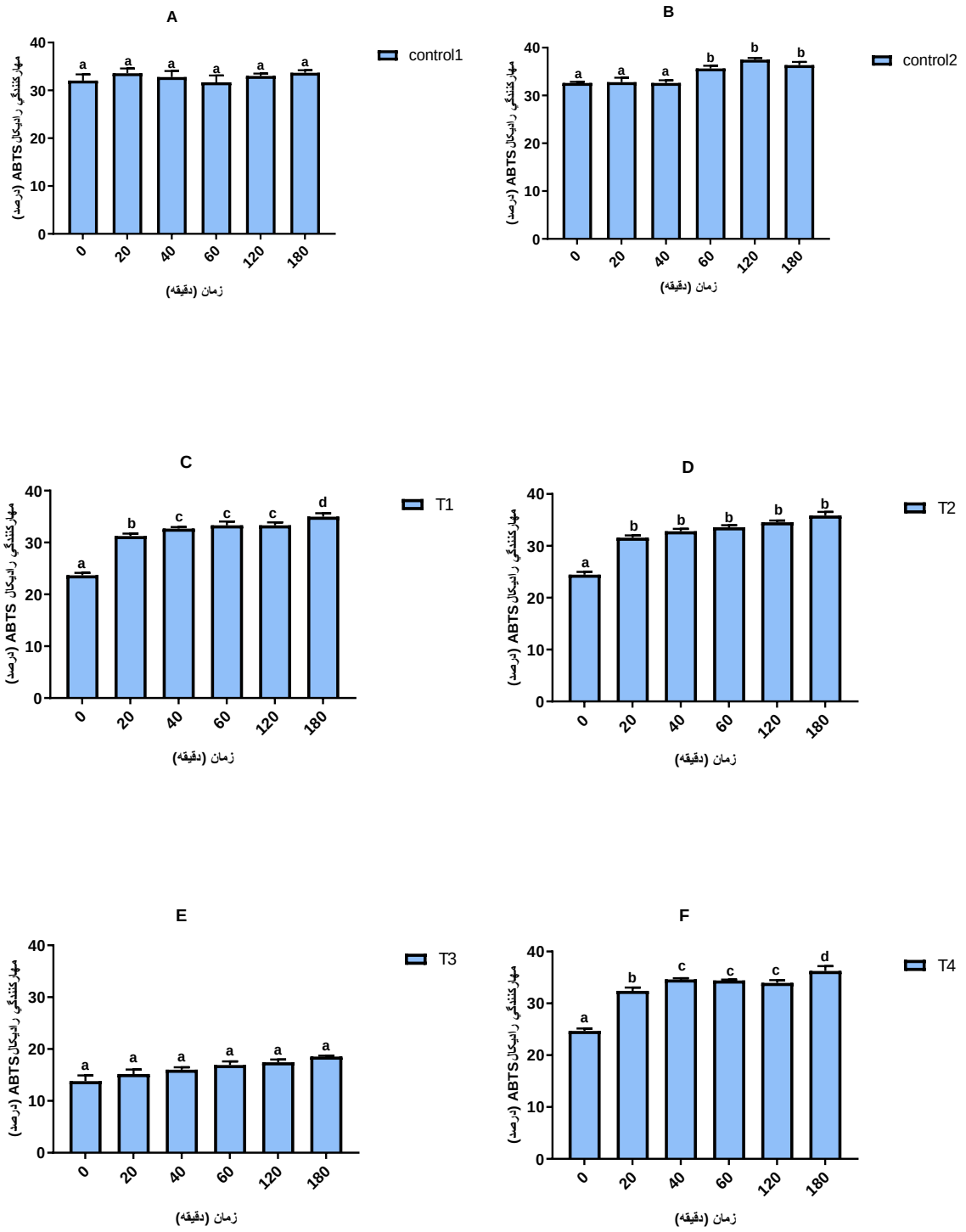
- مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها بر اساس دو مکانیسم مهار رادیکال های DPPH و ABTS

نتایج به دست آمده از مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های پیش‌تیمار شده در مقایسه با نمونه‌های کنترل (شکل ۷) نشان داد که پیش تیمار در دماهای ۶۵ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد بعد از ۱۸۰ دقیقه باعث افزایش تولید پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و پیش تیمار در دماهای ۶۵، ۷۵ درجه سانتی‌گراد و در شرایط انجماد-یخ زدایی بعد از ۱۸۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS در نمونه‌های هیدرولیز پروتئینی شده است. علاوه بر آن نتایج نشان دادند در تمام موارد محصول هیدرولیز پروتئین عدس فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بالاتری در مقایسه با رادیکال ABTS دارد.



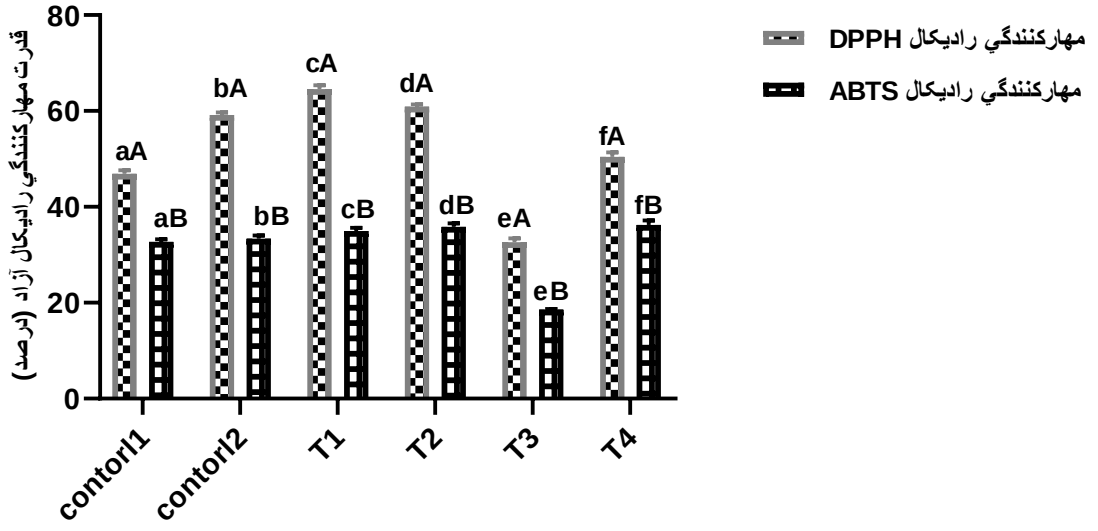
شکل ۵- مقایسه مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های پیش تیمار داده شده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد T1 (نمودار C)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد T2 (نمودار D)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد T3 (نمودار E) و تحت شرایط انجماد-یخ زدایی T4 (نمودار F) و مقایسه با نمونه کنترل۲ (نمودار B) ونمونه کنترل ۱ (نمودار A).

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده‌های هر تیمار در طی زمان می باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری ($p>0.05$) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌هاست.



شکل ٦- مقایسه مهار رادیکال آزاد ABTS در نمونه های پیش تیمار داده شده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد T1 (نمودار C)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد T2 (نمودار D)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد T3 (نمودار E)، تحت شرایط انجماد-یخ زدایی T4 (نمودار F) و مقایسه با نمونه کنترل۲ (نمودار B) ونمونه کنترل ۱ (نمودار A).

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده‌های هر تیمار در طی زمان می باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری ($p>0.05$) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌هاست.



شکل ۷- مقایسه مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در نمونه‌های کنترل ۱ و کنترل ۲ و نمونه‌های پیش تیمار داده شده در دمای ٦٥ درجه سانتی‌گراد (T1)، ۷۵ درجه سانتی‌گراد (T2)، ۸۵ درجه سانتی‌گراد (T3) و انجماد-یخ زدایی (T4) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

حروف کوچک لاتین برای نشان دادن اختلاف آماری بین داده‌های هر تیمار در طی زمان می باشد. حروف مشابه نشان دهنده عدم اختلاف آماری ($p>0.05$) و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنادار ($p<0.05$) بین داده‌هاست.

بحث

محتوای کل پروتئین عدس با روش کلدال ۲۴/۶ ٪ بر اساس وزن خشک پودر عدس اندازه‌گیری شد. این میزان با محتوای پروتئینی نمونه‌ی مورد آزمایش در مطالعات دیگر مطابقت داشت. Joshi و همکاران (۲۰۱۷) نیز مقدار پروتئین عدس را ۲۰/۶ -۳۱/۴ درصد به‌ازاء وزن خشک عدس گزارش کردند (Joshi *et al*., 2017).

از آنجاییکه ممکن است فرآیندهایی که بعنوان پیش تیمار هیدرولیز آنزیمی به کار رفته‌اند، به خودی خودی باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های پروتئین عدس شوند، قبل از آنکه اثر پیش تیمارهای حرارتی و غیر حرارتی بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در جریان هیدرولیز آنزیمی مورد بررسی قرار گیرد، در فاز اول تحقیق به این موضوع پرداخته شد که آیا پیش تیمارهای حرارتی اعمال شده به خودی خود بر محتوای گروه‌های آمین آزاد و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی که بصورت طبیعی در نمونه پروتئینی استخراج شده وجود دارند، تاثیرگذار هستند یا خیر.

نتایج ارائه شده در شکل ۱ نشان دادند که میزان گروه-های آمین آزاد در نمونه‌های تحت پیش تیمار ۶۵، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد – یخ زدایی تفاوت معناداری با نمونه کنترل دارد ($p<0.05$). بنابراین فرآیند پیش تیمار حرارتی و تیمار انجماد-یخ زدایی احتمالا از طریق باز کردن ساختار پروتئینی، باعث افزایش محتوای گروه‌های آمین آزاد شده‌اند. Chen و همکاران (۲۰۱۱) نیز باز شدن نسبی ساختار پروتئین و در معرض قرار گرفتن بیشتر گروه‌های آمین آزاد را در پی تیمار حرارتی گزارش کردند (Chen *et al*., 2011).

نتایج ارائه شده در شکل ۲ نشان دهنده فعالیت آنتی-اکسیدانی معادل ۵۴/۷۶ درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و معادل ۳۲/۰۵ درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS در محلول پروتئینی استخراج شده از دانه عدس می‌باشد. تیمارهای حرارت (۶۵، ۷۵، ۸۵ درجه سانتی‌گراد) و انجماد – یخ زدایی به کار رفته سبب افت فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال‌های آزاد DPPH وABTS شدند. که دلیل این امر می‌تواند وجود ترکیبات فنلی می‌باشد که بصورت طبیعی در دانه عدس وجود دارد. ترکیبات فنلی از جمله مواد طبیعی هستند که توسط گیاهان سنتز می‌شوند. این ترکیبات در ساختار خود

دارای یک حلقه آروماتیک و یک گروه هیدروکسیل هستند. این ترکیبات از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بشمار می‌روند و به نظر می‌رسد عمده فعالیت آنتی‌اکسیدانی عدس مربوط به حضور این نوع ترکیبات در نمونه باشد. اما از طرفی این ترکیبات بسیار ناپایدار بوده و در اثر عواملی مانند قلیا، اسید و حرارت و غیره از بین می‌روند (Mercado-Mercado *et al.*, 2020). بنابراین احتمالا ترکیبات فنلی موجود در نمونه عدس تا حدودی نسبت به تیمارهای اولیه به کار رفته ناپایدار بوده‌اند و بنابراین از بین رفتن نسبی آنها باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی اولیه در نمونه‌های پروتئینی تحت پیش تیمار حرارتی شده است. اما انتظار می‌رفت در طی فرآیند هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم آلکالاز پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شوند و پیش تیمارهای به کار رفته، علیرغم تاثیر منفیشان بر ترکیبات فنلی موجود، از طریق تاثیر بر ساختار پروتئین و بهبود فرآیند هیدرولیز آنزیمی، آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از ساختار پروتئین عدس را بهبود دهند. بنابراین در فاز دوم تحقیق، اثر پیش تیمارهای به کار رفته بر میزان تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان در طی زمان هیدرولیز آنزیمی مورد بررسی و مقایسه قرار گرفت.

براین اساس در ابتدا اثر آنزیم آلکالاز بر میزان پیشرفت هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج ارائه شده در شکل ۳، بیانگر نقش آنزیم آلکالاز بر هیدرولیز پروتئین عدس می‌باشد که با نمونه فاقد آنزیم مقایسه شده است. نتایج نشان دهنده نقش موثر آنزیم آلکالاز در هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس می‌باشد. ضمن اینکه نتایج نشان می‌دهند نمونه محلول پروتئین عدس آماده شده با روش فوق فاقد آنزیم‌های درونی است و یا آن‌ها نقشی در پیشرفت هیدرولیز آنزیمی در شرایط اعمال شده نداشته‌اند. آنزیم آلکالاز یک اندوپروتئاز اختصاصی می‌باشد. این آنزیم پیوندهای هیدروفوب انتهایی را در زنجیره پروتئینی هیدرولیز می‌کند. بنابراین توانایی بالایی در تولید پپتیدهای هیدروفوب با خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارد (Muzaifa *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2006). توانایی بالای آنزیم آلکالاز در استخراج و هیدرولیز پروتئین از منابع پروتئینی مختلف من جمله عدس در تحقیقات دیگری نیز گزارش شده است و نتایج ما، گزارشات دیگر محققین را تایید کرد (Muzaifa *et al.*, 2012; Maqsoudlou *et al.*, 2019). Elmalimadi و همکاران (۲۰۱۷)، در تحقیقی که بروی خواص آنتی‌اکسیدانی گلوتن گندم انجام دادند از آنزیم آلکالاز به منظور هیدرولیز استفاده کردند و گزارش کردند که میزان مهار رادیکال آزاد ABTS از ۶۱/۶۵ درصد به ۹۹/۵۳ درصد رسیده است. آن‌ها دریافتند که توالی و ترکیب پپتیدها عمدتا مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Elmalimadi *et al.*, 2017). در تحقیقی که Moslehishad و همکاران (۲۰۱۳)، بر روی پپتیدهای حاصل از شیر انجام دادند دریافتند که میزان مهار رادیکال ABTS با میزان هیدرولیز رابطه مستقیم دارد. آن‌ها بیان داشتند که افزایش میزان هیدرولیز به معنای افزایش گروه‌های آمینو می‌باشد (Moslehishad *et al.*, 2013). مطالعات محققین دیگر در میزان هیدرولیز آنزیمی پروتئین آب پنیر توسط آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزایم، نوتراز و پرتامکس نشان دهنده تاثیر آنزیم آلکالاز در پیشرفت هیدرولیز نسبت به سایر آنزیم‌ها بود. علاوه بر این، آن‌ها گزارش کردند هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز سبب افزایش ۴۸ درصدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس رادیکال ABTSشد. که دلیل این تفاوت را تغییر سوبسترای پروتئینی و تغییر در آبگریزی بیان داشتند (Dryáková *et al.*, 2010).

نتایج حاصل از اثر پیش تیمارها بر پیشرفت هیدرولیز ارائه شده در شکل ۴ نشان دادند که پیش تیمارهای حرارتی در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد، ۷۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد-یخ زدایی باعث افزایش میزان هیدرولیز آنزیمی و آزادسازی گروه‌های آمین آزاد در مقایسه با نمونه‌های کنترل شده‌اند. علاوه بر آن نتایج نشان دادند که در نمونه تیمار داده شده در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد (C ۴)، در تمام مراحل هیدرولیز آنزیمی، مقدار گروه‌های آمین اندازه‌گیری شده کمتر از مقدار آن در نمونه کنترل ۲ (هیدرولیز شده) بود. به نظر می‌رسد پیش تیمار در دمای ۸۵ درجه سانتی-گراد و سپس قرار گرفتن نمونه در دمای ۵۵ درجه سانتی-گراد برای هیدرولیز آنزیمی باعث شده است پروتئین‌ها آگلوتینه شوند و در نتیجه محتوای گروه‌های آمین آزاد کاهش یافته‌اند (Farrokhi *et al.*, 2019). درصورتی که Adjonu و همکاران (۲۰۱۳)، گزارش کردند که پیش تیمار حرارتی (دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه) باعث افزایش درجه هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده

بوسیله آنزیم پپسین و تریپسین نسبت به نمونه کنترل شده است (Adjonu *et al.*, 2013). تفاوت مشاهده شده می‌تواند مربوط به شرایط حرارت دهی نمونه و همچنین شرایط هیدرولیز آنزیمی باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین عدس بر اساس دو مکانیسم مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت که از جمله روش‌های مهم در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها هستند. نتایج حاصل از بررسی پیش تیمارها بر تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان با فعالیت مهار رادیکال DPPH و ABTS ارائه شده در شکل‌های B ۵ و B ۶ نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی بوسیله آنزیم آلکالاز باعث تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان در مقایسه با نمونه‌های کنترل بدون هیدرولیز شده است. علاوه بر آن تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان با خاصیت مهار رادیکال DPPH تا دقیقه ۱۲۰ از هیدرولیز روند افزایش داشته و سپس کاهش یافته است. علت کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طی زمان هیدرولیز می‌تواند به دلیل شکستن زنجیره برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی تشکیل شده در مراحل اولیه هیدرولیز باشد (Pezeshk *et al.*, 2017). بطوری که تغییر در اندازه، تعداد و ویژگی‌های ساختاریپپتیدها در طول زمان هیدرولیز می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار بدهد (Sarmadi and Ismail, 2010). Lassoued و همکاران (۲۰۱۵)، Kittiphattanabawon و همکاران (۲۰۱۲) و Arcan و Yemenicioğlu (۲۰۱۰) نیز گزارش کردند که هیدرولیز آنزیمی بیشتر، باعث کوتاهتر شدن زنجیره‌های پپتیدی و افزایش آبدوستی پپتیدها می‌شود و کارایی آنها را در مهار رادیکال DPPH کاهش می‌دهد (Arcan and Yemenicioglu, 2010; Kittiphattanabawon *et al.*, 2012; Lassoued *et al.*, 2015). Elmalimadi و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که میزان درجه هیدرولیز تا ۱۵ درصد باعث بهبود عملکرد مهار رادیکال آزاد DPPH شد، در حالی که هیدرولیز بیش از حد آن سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (Elmalimadi *et al.*, 2017).

در ادامه، نتایج مربوط به اثر هر کدام از پیش تیمارها بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در شرایط هیدرولیز آنزیمی (شکل‌های ۵ و ۶) نشان داد که پیش تیمارهای حرارتی و انجماد- یخ زدایی سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها براساس مهار رادیکال DPPH و ABTS در طی زمان شده‌اند. به نحوی که تغییر ایجاد شده در ساختار پروتئین‌ها به نوعی بر دسترسی بیشتر آنزیم به ساختار پروتئین و بنابراین تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان نقش مثبتی داشته است (Adjonu *et al.*, 2013). همانطور که چند سیکل مداوم انجماد- یخ زدایی نیز قبل از فرآیند هیدرولیز آنزیمی تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان را تقویت کرده است در تحقیقات دیگری نیز روش انجماد – یخ زدایی روشی موثر بر هیدرولیز آنزیمی شناخته شده بود به نحوی که بدون نیاز به مواد شیمیایی یا کاتالیزور خاص، باعث بهبود هیدرولیز آنزیمی می‌شود (Rooni *et al.*, 2017). بطور کلی هر دو پیش تیمار حرارت و انجماد- یخ زدایی قبل از هیدرولیز آنزیمی از طریق تغییر در خصوصیات مولکولی پروتئین، خواص ساختاری و عملکردی آن‌ها را دستخوش تغییر قرار می‌دهد (Chandrapala *et al.*, 2011). Alizadeh و Aliakbarlu (۲۰۲۰) نیز دلیل افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در اثر فرآیند پیش تیمار را آزاد شدن گروه‌های سولفیدریل و افزایش آبگریزی در سطح بیان کردند (Alizadeh and Aliakbarlu, 2020).

اما همانطور که نتایج ارائه شده در شکل‌های E ۵ و E ۶ نشان می‌دهند، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی براساس مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در نمونه‌هایی که تحت پیش تیمار در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفته بودند در مقایسه با نمونه کنترل کاهش یافته است. بر اساس نتایج به دست آمده احتمالا حرارت بالا باعث آگلوتینه شدن پروتئین‌ها و بنابراین کاهش میزان گروه‌های آمین آزاد از یک طرف و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طرف دیگر شده است. Farrokhi و همکاران (۲۰۱۹) در تحقیقی که انجام دادند بیان کردند که پروتئین‌ها در دمای۸۰ درجه سانتی‌گراد دناتوره و آگلوتینه (بهم چسبیدگی پروتئین) می-شوند در نتیجه بخشی از پروتئین‌ها در اثر رسوب کردن از بین می‌روند (Farrokhi *et al.*, 2019).

در مجموع در مقایسه بین انواع روش‌های پیش تیمار بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان، همانطور که نتایج (شکل ۷) نشان می‌دهند پیش تیمارهای ۶۵ و ۷۵ درجه سانتی‌گراد و انجماد – یخ زدایی بیشترین تاثیر را در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان در جریان هیدرولیز آنزیمی داشته‌اند. Zhang و

همکاران (۲۰۱۳) نیز دریافتند پیش تیمار حرارت قبل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، باعث هیدرولیز پیوندهای دی سولفید درونی و بین مولکولی وتغییرات احتمالی در ساختار اولیه پروتئین می‌شود. بنابراین می‌تواند بر تولید پپتیدها در جریان هیدرولیز موثر باشد (Zhang *et al*., 2013). Rooni و همکاران (۲۰۱۷)، نیز در تحقیقی بر روی مخمرساکارومایسس سرویزیه به وسیله آنزیم آلکالاز انجام دادند گزارش کردند که پیش تیمار انجماد، ساختار چهارم پروتئین را باز می‌کند و سطح دسترسی قابل توجهی از پروتئین را برای هیدرولیز آنزیمی افزایش می‌دهد و سبب افزایش تولید پپتیدها می‌گردد (Rooni *et al*., 2017).

علاوه بر آن نتایج نشان دادند در تمام موارد محصول هیدرولیز پروتئین عدس فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بالاتری در مقایسه با رادیکال ABTS دارد ($p<0.05$). Cotabarren و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که تفاوت در میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH و ABTS می‌تواند به دلیل تفاوت در هیدروفوبیستی پپتیدها و حلالیت و انتشار آن‌ها در محیط واکنش باشد (Cotabarren *et al*., 2019). بنابراین نتایج ما نشان دادند هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس توسط آنزیم آلکالاز در شرایطی که نمونه‌ها تحت پیش تیمار قرار داشتند و یا بدون پیش تیمار هیدرولیز شدند، منجر به تولید پپتیدهایی با خاصیت هیدروفوب بیشتر و با قابلیت بالاتر در مهار رادیکال‌های DPPH شده است.

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از بررسی اثر هیدرولیز آنزیمی بوسیله آنزیم آلکالاز نشان داد که آنزیم آلکالاز آنزیمی موثر در هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس می‌باشد و هیدرولیز آنزیمی در شرایط به کار رفته باعث تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان با خاصیت مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS از پروتئین عدس می‌شود. علاوه بر آن پیش تیمارهای به کار رفته قبل از انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی احتمالا از طریق تغییر ساختار پروتئینی و باز شدن ساختار پروتئین، دسترسی آنزیم به باندهای پپتیدی را افزایش داده است و بنابراین نقش موثری در پیشرفت هیدرولیز آنزیمی و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان داشته‌اند. گرچه حرارت دهی در دماهای ۶۵، ۷۵ درجه سانتی‌گراد و پیش تیمار انجماد –یخ زدایی به تنهایی باعث افت فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول پروتئین عدس احتمالا بواسطه تخریب ترکیبات فنلی شده‌اند اما در مجموع با تاثیر مثبتی که بر فرآیند هیدرولیز آنزیمی داشته‌اند، باعث شده‌اند محصول هیدرولیز آنزیمی پروتئین عدس فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری در مقایسه با نمونه کنترل نشان دهد. در مجموع نتایج نشان دادند که پیش تیمار ۶۵ درجه سانتی‌گراد و هیدرولیز آنزیمی بوسیله آنزیم آلکالاز به مدت ۱۸۰ دقیقه بیشترین تاثیر را در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان با خاصیت مهار رادیکال DPPH و پیش تیمار ۷۵ و ۸۵ درجه سانتی‌گراد و فرآیند انجماد–یخ زدایی و هیدرولیز آنزیمی به مدت ۱۸۰ دقیقه بیشترین تاثیر را در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان با فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS داشته‌اند.

سپاسگزاری

تحقیق حاضر در آزمایشگاه گیاهان دارویی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس انجام شده است. از جناب آقای دکتر مهدی ملک پور به خاطر کمک‌های ارزشمندشان در انجام این پایان نامه قدردانی می‌گردد.

منابع

Arcan, I. & Yemenicioğlu, A. (2010). Effects of controlled pepsin hydrolysis on antioxidant potential and fractional changes of chickpea proteins. Food Research International, 43(1), 140-147.

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. Food chemistry, 136(3-4), 1435-1443.

Arrutia, F., Puente, Á., Riera, F. A., Menéndez, C. & González, U. A. (2016). Influence of heat pre-treatment on BSA tryptic hydrolysis and peptide release. Food Chemistry, 202(1), 40-48.

Alizadeh, O. & Aliakbarlu, J. (2020). Effects of ultrasound and ohmic heating pretreatments on hydrolysis, antioxidant and antibacterial activities of whey protein concentrate and its fractions. LWT, 131, 109913.

Bondet, V., Brand-Williams, W. & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of

antioxidant activity using the DPPH. free radical method. LWT-Food Science and Technology, 30(6), 609-615.

Church, F. C., Swaisgood, H. E., Porter, D. H. & Catignani, G. L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phthaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. Journal of Dairy Science, 66(6), 1219-1227.

Chen, L., Chen, J., Ren, J. & Zhao, M. (2011). Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. Food Hydrocolloids, 25(5), 887-897.

Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein concentrate. Ultrasonics Sonochemistry, 18(5), 951-957.

Cotabarren, J., Rosso, A. M., Tellechea, M., García-Pardo, J., Rivera, J. L., Obregón, W. D. & Parisi, M. G. (2019). Adding value to the chia (Salvia hispanica L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain. Food Chemistry, 274, 848-856.

Dryáková, A., Pihlanto, A., Marnila, P., Čurda, L. & Korhonen, H.J. (2010). Antioxidant properties of whey protein hydrolysates as measured by three methods. European Food Research and Technology, 23(6), 865-874.

DE Castro, R. J. S., Cason, V. G. & Sato, H. H. (2017). Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (Phaseolus vulgaris L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 10, 291-297.

Elmalimadi, M.B., Jovanović, J.R., Stefanović, A.B., Tanasković, S.J., Djurović, S.B., Bugarski, B.M. & Knežević-Jugović, Z.D. (2017). Controlled enzymatic hydrolysis for improved exploitation of the antioxidant potential of wheat gluten. Industrial Crops and Products, 109, 548-557.

Farrokhi, F., Badii, F., Ehsani, M. R. &Hashemi, M. (2019). Functional and thermal properties of nanofibrillated whey protein isolate as functions of denaturation temperature and solution pH. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 583, 124002.

Hou, R. Z., Yang, Y., Li, G., Huang, Y. B., Wang, H., Liu, Y. J., Xu, L. & Zhang, X. Z. (2006). Synthesis of a precursor dipeptide of RGDS (Arg-Gly-Asp-Ser) catalysed by the industrial protease alcalase. Biotechnology and Applied Biochemistry, 44(2), 73-80.

Joshi, M., Timilsena, Y. & Adhikari, B. (2017). Global production, processing and utilization of lentil: A review. Journal of Integrative Agriculture, 16(12), 2898-2913.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. & Shahidi, F. (2012). Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems. Food Chemistry, 135(3), 1118-1126.

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). Total protein estimation by Lowry's method. The Journal of Biological Chemistry, 193(1), 265-275.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.-C., Barkia, A. & Nasri, M. (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (Raja clavata) muscle. Journal of Proteomics, 128, 458-468.

Morr, C., German, B., Kinsella, J., Regenstein, J., Buren, J.V., Kilara, A., Lewis, B. & Mangino, M. (1985). A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. Journal of Food Science, 50(6), 1715-1718.

Muzaifa, M., Safriani, N. & Zakaria, F. (2012). Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation, 5(1), 36-39.

Moslehishad, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Ezzatpanah, H. & Moosavi-Movahedi, A. A. (2013). The proteolytic activity of selected lactic acid bacteria in fermenting cow's and camel's milk and the resultant sensory characteristics of the products. International Journal of Dairy Technology, 66(2), 279-285.

Mirdamadi, S., Soliman Zadeh, N., Mirzaei, M. & Motahhari, P. (2017). Bioactive peptides: Production process, health effects and application as natural additives in the production of processed foods. Journal of Food Hygiene, 7(25), 1-20 [In Persian].

Maqsoudlou, A., Mahoonak, A.S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F. & Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalase

hydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. Food Research International, 116, 905-915.

Mercado-Mercado, G., Laura, A. & Alvarez-Parrilla, E. (2020). Effect of pectin on the interactions among phenolic compounds determined by antioxidant capacity. Journal of Molecular Structure, 1199, 126967.

Nourmohammadi, A., Sadeghi Mahonak, A., Shahrampour, D. & Khamiri, M. (2015). Optimization of Hydrolysis of Pumpkin Seed Meal Protein Protein to Achieve Maximum Antioxidant Properties. Electronic Journal of Food Processing and Preservation, 9(1), 1-12 [In Persian].

Pezeshk, S., Ojagh, M., Rezaei, M. & Shabanpour, B. (2017). Optimization of Hydrolyzed Protein with Antioxidant Activity from the Tuna and viscera of Apricot (Thunnus albacares) with Protamox Enzyme. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 12(3), 99-108 [In Persian].

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26(9), 1231-1237.

Rooni, V., Raud, M. & Kikas, T. (2017). The freezing pre-treatment of lignocellulosic material: A cheap alternative for Nordic countries. Energy, 139, 1-7.

Shekib, L. A., Zoueil, M., Youssef, M. & Mohamed, M. S. (1986). Amino acid composition and in vitro digestibility of lentil and rice proteins and their mixture (Koshary). Food Chemistry, 20(1), 61-67.

Shahidi, F. & Zong, Y. (2008). Bioactive peptides. Journal of AOAC International, 91(4), 914-931.

Sarmadi, B.H. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides 31(10), 1949-1956.

Singh, A. & Ramaswamy, H.S. (2014). Effect of high-pressure treatment on trypsin hydrolysis and antioxidant activity of egg white proteins. International Journal of Food Science & Technology, 49(1), 269-279.

Wang, X., Yu, H., Xing, R., Chen, X., Liu, S. & Li, P. (2017). Optimization of the extraction and stability of antioxidative peptides from mackerel (Pneumatophorus japonicus) protein. BioMed Research International.

Zhang, Y., Olsen, K., Grossi, A. & Otte, J. (2013). Effect of pretreatment on enzymatic hydrolysis of bovine collagen and formation of ACE-inhibitory peptides. Food Chemistry, 141(3), 2343-2354.

Food Technology & Nutrition / Summer 2021 / Vol. 18 / No.3

The Effect of Heat and Freeze-thaw Pretreatment on the Alcalase Enzymatic Hydrolysis of Lentil Protein and Production of Antioxidant Peptides

P. Ghasemi [a], M. Mirzaei [b*], S. Mirdamadi [c]

[a] M.Sc. Graduated of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor of the Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Professor of the Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

Received: 22 October 2020 Accepted: 8 November 2020

Abstract

Introduction: The biological activity of protein hydrolysis products is affected by the enzyme type, protein type and enzymatic hydrolysis conditions including temperature, time and enzyme/substrate ratio and pre-treatment process.The protein pretreatment process can cause improving the enzymatic hydrolysis and production of antioxidant peptides by affecting the spatial structure of the protein and increasing the enzyme access to the peptide bounds.

Materials and Methods: In this study, The protein extracted from lentils was first subjected to heat pretreatment (65,75, 85°C, for 15 min) and freeze-thaw (3 freezing cycles at -20 °C and thawing at room temperature). It was then exposed to hydrolysis for 3 hr by alcalase (with an E/S of 90 AU / kg protein, 55°C). Over time, the progress of enzymatic hydrolysis and antioxidant activity were investigated by O-phthaldialdehyde (OPA) assay and DPPH and ABTS radical scavenging methods and compared with the control sample (without pretreatment).

Results: Pre-treatment at 75°C causes the highest value of free amino groups .The maximum DPPH (63.57%) and ABTS (36.24%) radical scavenging activity were observed respectively, for samples pre-treated at 65°C and by freeze-thaw process.

Conclusion: Heat pretreatment and freezing-thawing before enzymatic hydrolysis have a positive effect on the development of enzymatic hydrolysis and production of antioxidant peptides. Based on the results of this study, the process of heat treatment of lentil protein at 65°C or freezing-thawing and enzymatic hydrolysis by enzyme alcalase was identified as an effective method in the production of lentil protein hydrolysis for use in the formulation of functional foods.

Keywords: *Antioxidant Peptides, Enzymatic Hydrolysis, Freeze- Thaw Pretreatment, Heat Pretreatment, Lentil Protein.*

* Corresponding Author: mahtam86@gmail.com

علوم غذایی و تغذیه / تابستان ۱۴۰۰ / سال هجدهم / شماره ۳