# مقایسه اثر تریپسین ماهی سفید (*Rutilus frisii* kutum) با آنزیم‌های تجاری بر خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سویا

زهره حاسبی[۱]، علی معتمدزادگان[۲*]، رسول مدنی[۳]، عباس زمانی[۴]

۱- دانشجوی مقطع دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران
۲- دانشیار، دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران. ایران.
۳- استاد، دکتری، گروه بیوتکنولوژی مؤسسهٔ تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی، البرز، کرج، ایران
٤- استادیار، دکتری، گروه شیلات،دانشکدهٔ منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، همدان، ایران.

**(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۲/۳۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۰/۲۹)**

## چکیده

امروزه اصلاح خواص عملکردی پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیکی به منظور کاربرد هیدرولیزهای حاصل به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و یا عوامل امولسیفایر و کف‌زا، متداول گشته است. در این پژوهش پروتئین بافت‌دار سویا با استفاده از آنزیم‌های تریپسین تجاری (با منشا خوک)، تریپسین استخراج شده از ماهی سفید، پپسین، آلکالاز و پاپائین هیدرولیز شده و نتایج نشان داد بیشترین درجه هیدرولیز به ترتیب مربوط به تریپسین تجاری خوک ۱۹/۳٤ ٪، آلکالاز ۱٦/۰٤ ٪و تریپسین ماهی سفید ۱٤/۲۹ ٪ است.در مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده، بیشترین افزایش ظرفیت امولسیفایری (معنی دار $p < 0.05$ )توسط آنزیم تریپسینتجاری و ماهی سفیدایجاد شدهو بیشترین پایداری امولسیون نیز مربوط به هیدرولیزهای تریپسین ماهی سفید و آلکالاز بود. در مقایسه خواص کف‌زایی هیدرولیزها نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده، بیشترین افزایش ظرفیت کف توسط تریپسین تجاری و پس از آن تریپسین ماهی سفید مشاهده شد و کمترین افزایش مربوط به آنزیم آلکالاز بود و بیشترین پایداری کف را هیدرولیز تریپسین تجاری داشته و آنزیم تریپسین ماهی سفید به رغم کارایی کمتر در مقایسه با تریپسین تجاری، در مقایسه با سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشته و در مقام دوم قرار گرفت.هیدرولیزهای تهیه شده با تریپسین ماهی سفید بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH و بیشترین قدرت احیا را داشته اما کمترین قدرت مهار رادیکال $OH^-$ را داشتند. نتایج این مطالعه نشان داد که تریپسین ماهی سفید قادر است هیدرولیزی با ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی خوب و قابل مقایسه با سایر آنزیم‌های تجاری تولید کند.

**کلید واژگان:** تریپسین، پاپائین، پروتئین سویا، ویژگیکف‌زایی، ظرفیت امولسیفایری

* مسئول مکاتبات: amotgan@yahoo.com



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

## ۱- مقدمه

اصلاح خواص بیوشیمیایی و عملکردی پروتئین‌ها از طریق به کارگیری آنزیم‌های پروتئولیتیکی خارجی که قادرند یک پیوند پپتیدی خاص را شکسته و بدون هیچ اثر سوئیروی ارزش غذایی و قابلیت جذب آنها، هیدرولیزی با ویژگی‌های خاص و معین را تولید کنند، به وفور در صنعت غذا مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱]. از طرفی هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها منجر به تولید پپتیدهای زیست‌فعال (Bioactive peptides) می‌شود. این پپتیدها را می‌توان به صورت توالی‌های به خصوصی از اسیدهای آمینه تعریف کرد که فعالیت‌های بیولوژیک مفید را ترغیب می‌کنند. پروتئازهای تجاری متداول برای هیدرولیز پروتئین‌هامی‌توانند از آنزیم‌های گوارشی حیوانی نظیر پپسین، کیموتریپسینو تریپسین، آنزیم‌های میکروبی نظیر آلکالاز و یا آنزیم‌های گیاهی نظیر پاپائینباشند. پروتئولیز کنترل شده و محدود پروتئین‌ها منجر به باز شدن زنجیره‌های پروتئینی و از بین رفتن ساختار پروتئین شده و در نتیجه همراه با کاهش وزن مولکولی باعث تغییر خواص عملکردی و کاهش فاکتورهای آلرژن شده و پپتیدهای ریز با خواص زیست‌فعال تولید می‌کند[۲و ۳].

در سال‌های اخیر کارهای زیادی بر روی خواصاین پپتیدها و به ویژه خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای هیدرولیز شده از منابع حیوانی و گیاهی مختلف صورت گرفته است نظیر لوبیای سویا(٤)، سبوس برنج[٥]، زرده تخم مرغ[٦]. این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می توانند جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی نظیر بوتیلات هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیلات هیدروکسی تولوئن (BHT)که نگرانی‌هایی در زمینه ایمنی آن‌ها از لحاظ سلامتی وجود دارد باشند [۷]. مکانیسم عمل پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مربوط است به غیرفعال کردن گونه‌های واکنش‌گر اکسیژن (ROS[1])، گرفتن (مهار) رادیکال‌های آزاد، شلاته کردن فلزات انتقال دهنده پروکسیداتیو و احیای هیدروپروکسیدها[۸].

پروتئین‌های سویا به عنوان اجزای عملکردی، تغذیه ای و همچنین جایگزین پروتئین حیوانی در غذاهایی نظیر همبرگرها، سوسیس‌ها و سسهای گوشتی؛ نان‌ها، بیسکوئیت‌ها، کراکرها و پاستاها؛ غذای کودک، سوپ‌ها؛ غذاهای دریایی نظیر سوریمی؛ نوشیدنی‌هابه‌کارمی‌روند [۹]. مطالعات مختلف نشان داده که هیدرولیز پروتئولیتیک محدود شده می‌تواند باعث بهبود خواص عملکردی پروتئین سویا از جمله ویژگی انحلال‌پذیری، امولسیفایری و کف‌زایی شود[۱۰و ۱۱]. آنزیم‌هایی نظیر پپسین، پاپائین و تریپسین برای افزایش انحلال‌پذیری و امولسیفایری ایزوله پروتئین سویا (SPI[2]) به‌کاررفته اند[۱۲و۱۳]. دیر زمانیست مشخص شده است که برخی از این پروتئین‌های هیدرولیز شده از سویا فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارنداما فقط اخیراً به دلیل گسترش تمایل به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، تلاش‌هاییبرای تهیه پروتئین‌های آنتی اکسیداتیو از پروتئین سویا صورت گرفته است[١٦-١٤].

هدف این پژوهش نشان دادن بهبود خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین سویا در اثر هیدرولیز با پروتئازها بوده، همچنین از امعا و احشا ماهی سفید به عنوان ماهی بومی منطقه شمال ایران برای استخراج آنزیم تریپسین استفاده شده و این آنزیم نیز پس از خالص‌سازی برای هیدرولیز پروتئین سویا به‌کاررفت. ماهی سفید در منطقه شمال صید و مصرف بالایی داشته و روزانه مقادیر زیادی امعا و احشا غیر قابل مصرف آن دور ریخته میشوند که می‌توان از آن‌ها برای استخراج آنزیم با ارزش تریپسین استفاده کرد. هدف دوم این پژوهش نشان دادن این امر بود که تریپسین استخراج شده از ماهی سفید برای هیدرولیز پروتئین سویا قابل استفاده بوده و نسبت به آنزیم‌های تجاری مورد استفاده، عملکرد بهتر و قابل مقایسه ای دارد.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه‌ی نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده

**تهیه‌ی آنزیم تریپسین ماهی:** امعا و احشا ماهی سفید بعد از جداسازی و چربی‌زدایی با استون، به مدت یک شب در دمای اتاق خشک شده وبرای تهیه عصاره، پودر امعا و احشا خشک شده درون بافر HCl–Tris ۵۰ میلی مولار حاوی ۱۰ میلی مولار $CaCl_2$ با pH ۷/۵ به نسبت ۱ به ۵۰ (وزنی / حجمی) سوسپانسه شد و در دمای ٤ $C^{\circ}$ به مدت ۳ ساعت همزده شده و

1. Reactive Oxygen Species

2. Soy Protein Isolate



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

سپس به مدت ۴۵ دقیقه در ۱۴۰۰۰g سانتریفیوژ شد تا مایع رویی[3] آن جدا گردد. عصاره خام آنزیمی به مدت ۲ ساعت با سولفات آمونیوم ٪ ۳۰ (w/v) اشباع ترسیب شده و به مدت ۴۵ دقیقه در سانتریفیوژ با دور g ۱۰۰۰۰ و دمای $C^{\circ}$ ۴ سانتریفیوژ شده و قسمت رسوب یافته جمع‌آوری شد. این رسوب پس از یک شب دیالیز شدن، با ستون کروماتوگرافی غربالی[4] نوع Sephadex G-75 (۲cm× ۸۵) جداسازی شده و قسمت پروتئینی دارای فعالیت آنزیمی پس از جمع‌آوری و خشک شدن انجمادی، به عنوان آنزیم ماهی سفید برای هیدرولیز پروتئین سویا به‌کار رفت.

**تهیه‌ی هیدرولیز سویا:** ابتدا ۱۰ گرم پودر پروتئین سویای بافت داده شده (TSP[5]) در ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۱ میلی مولار با pH مناسب حل شده و آنزیم با نسبت تقریبی ۱:۱۰۰ (با توجه به مقدار پروتئین اولیه و فعالیت آنزیم) افزوده شده و هیدرولیز به مدت ۳ ساعت در دمای مناسب و بر روی انکوباتور شیکردار با دورrpm ۱۵۰ انجام شد. سپس مخلوط ۱۰ دقیقه در حمام آب داغ °Cجوشانده شده (برای غیرفعال کردن آنزیم‌ها) و در g ۱۰۰۰۰ و دمای °Cبه مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گشت. مایع رویی آن پس از بررسی درجه هیدرولیز به روش انجمادی خشک شده و در فریزر نگهداری شد [۱۶] . شرایط هیدرولیز به کار رفته عبارتند از:تریپسین تجاری خوک و تریپسین استخراج شده از ماهی سفید دریای خزر: pH برابر ۸ و دمای هیدرولیز °C ۳۷. پپسین : pH برابر ۲ و دمای هیدرولیز °C ۳۷. آلکالاز: pH برابر ۹ و دمای هیدرولیز °C. پاپائین : pH برابر ۶ و دمای هیدرولیز °C ۵۰.

**آزمون اندازه‌گیری درجه هیدرولیز:** برای اندازه‌گیری درجه هیدرولیز یا DH[6] از روشOPA[7] استفاده شد[۱۷]. این روش دقیق‌تر، سریعتر، آسانتر و کم خطرتر از سایر روش‌های موجود نظیر روش TNBS است[۱۷]. ۳ میلی لیتر از محلول OPA درون هر لوله آزمایش ریخته و پس از مخلوط شدن با ۴۰۰ میکرولیتر از نمونه یا استاندارد دقیقاً ۲ دقیقه مانده و سپس جذب در ۳۴۰ نانومتر خوانده شد. ۵۰ میلی گرم سرین در ۵۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه (۰/۹۵۱۶ میلی اکی والان در لیتر) به عنوان محلول استاندارد سرین استفاده شد و شاهد نیز از ۴۰۰ میکرولیتر آب مقطر درون ۳ میلی لیتر OPA تهیه شد.با استفاده از فرمول ۲-۱ محاسبات انجام شد.

$$OD_{unk})/(OD_{standard}-OD_{unk})\times 0.9516\times 0.1\times 100/L\times P\text{-serine-NH2}=(OD_{sample}$$

فرمول ۲-۱

$$h= (\text{serine NH2} - \beta)/ \alpha$$

فرمول ۲-۲

در فرمول ۲-۱ جذب نوری نمونه و شاهد و استاندارد از طریق قرائت نوری اسپکتروفتومتر در ۳۴۰ نانومتر تعیین شده و ۰/۹۵۱۶ میلی اکیوالان بر لیتر استاندارد سرین است. ۰/۱ حجم نمونه و X مقدار گرمی نمونه و P مقدار ٪ پروتئین موجود در نمونه است و در فرمول ۲-۲ مقدار $\alpha$ و $\beta$ برای سویا به ترتیب ۰/۹۷۰ و ۰/۳۴۲ است. مقدار درجه هیدرولیز از فرمول۲-۳ محاسبه می‌شودکه در آن $h_{tot}$ برای سویا ۷/۸ است.

$$DH\%= h/(h_{tot}) \times 100$$

فرمول ۲-۳

## ۲-۲- آزمون‌های انجام گرفته برای سنجش ویژگی‌های تکنولوژیکی و عملکردی

**فعالیت و پایداری امولسیفایری: سنجش** فعالیت امولسیفایری طبق روشPearce و Kinsella(۱۹۷۸) انجام شد(۱۸). ۰/۵ میلی لیتر روغن ذرت با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئین ٪۱ به مدت ۱ دقیقه توسط هموژنایزر ( Heidolph Diax 900, Sigma Co.) با دورrpm ۲۰۰۰۰ هموژن شده و در زمان‌های صفر و ۱۰ دقیقه پس از همزدن، ۵۰ میکرولیتر از ته ظرف امولسیون با ۴/۹۵ میلی لیتر از محلول SDS با غلظت ۱mg/ml مخلوط شده و جذب نوری آن در ۵۰۰ نانومتر قرائت شد. اندیس فعالیت امولسیفایری (EAI) از فرمول ۲-۴ و اندیس پایداری امولسیونESI از فرمول ۲-۵ محاسبه شد:

$$EAI(m2/g)=(2\times 2.303\times A500)/(0.25\ \text{protein weight(g)})$$

فرمول ۲-۴

$$ESI(min) = (A0 \times \Delta t) / \Delta A$$

فرمول ۲-۵

3. Supernatant
4. Gel filtration
5. Textured Soy Protein
6. Degree of Hydrolysis
7. O-phthaldialdehyde



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

که در آن $\Delta t$ برابر ۱۰ دقیقه و $\Delta A = A_{10} - A_0$

**ظرفیت کف‌زایی، دانسیته کف و پایداری کف:** سنجش فعالیت کف‌زایی بر اساس روش Sathe و Salunkhe (۱۹۸۱) انجام گرفت[۱۹]. ۱۰ میلی لیتر از محلول ۱٪ پروتئین در یک ظرف مدرج با استفاده از هموژنایزر بر روی pH۸ تنظیم شده و در دور rpm ۱۸۰۰۰ به مدت ۱ دقیقه در دمای اتاق همزده شده و بلافاصله حجم آن خوانده شد. ظرفیت کف از فرمول ۲-۶ محاسبه شد:

$$\text{Foaming capacity \%} = (A-B)/B \times 100$$

فرمول ۲-۶

که در آن A حجم پس از همزدن و B حجم اولیه قبل از همزدن است. دانسیته کف با استفاده از اندازه‌گیری وزن حجم مشخصی از کف محاسبه شد و نسبت حجم کف به وزن آن بر حسب گرم بر لیتر می‌باشد. نمونه‌های همزده سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شده و حجم آن‌ها مجدداً خوانده شد. پایداری کف از فرمول ۲-۷ محاسبه شد:

$$\text{Foaming stability\%} = (A-B)/B \times 100$$

فرمول ۲-۷

که در آن A حجم همزده پس از ۶۰ دقیقه و B حجم اولیه قبل از همزدن است.

## ۲-۳- آزمون‌های انجام شده برای سنجش خاصیت آنتی‌اکسیدانی

**فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH:** فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH ( ۲و۲- دی فنیل -۱ پیکریل هیدرازیل) توسط متد Shimada و همکاران (۱۹۹۲)اندازه‌گیری شد[۲۰]. برای این کار حجم دو میلی‌لیتری از نمونه‌هایی با غلظت‌های متفاوتی از پروتئین هیدرولیز شده (۱/۲۵، ۲/۵ ، ۵، ۷/۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ٤ میلی‌لیتر از DPPH ۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵٪ افزوده شده و مخلوط با ورتکس هموژنیزه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریک نگهداری شده و جذب آن در ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفتومتر مرئی- فرابنفش اندازه‌گیری شد. از محلول DPPHو آب مقطر به عنوان بلنک و از اسید اسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد و درصد مهار از معادله ۲-۸ محاسبه شد:

$$\text{DPPH scavenging effect\%} = (\text{Ablank} - \text{Asample})/(\text{Ablank}) \times 100$$

فرمول ۲-۸

**آزمون قدرت احیا:** این آزمون توسط روش Yen و Chen(۱۹۹۵) انجام گرفت[۲۱]. ۱ میلی لیتر از نمونه (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) پس از اختلاط با ۲/۵ میلی لیتر از بافر ۰/۲ مولار فسفات و ۲/۵ میلی لیتر پتاسیم فریک سیانید ۱٪ ، ۲۰ دقیقه در $^{\circ}C$ نگهداری شده و ۲/۵ میلی لیتر از تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به آن افزوده شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دور rpm ۳۵۰۰ سانتریفیوژ شده و ۲/۵ میلی لیتر از مایع رویی با ۲/۵ میلی لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر از فریک کلرید ۰/۱ ٪ مخلوط شده و جذب در ۷۰۰ نانومتر با بلنک آب مقطر و کنترل مثبت اسید اسکوربیک (به عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با جذب نوری بالا) اندازه‌گیری شد. عدد جذب نوری بزرگتر نشانه قدرت احیا بیشتر است.

**قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل:** این آزمون با روش Zia-Ul-Haq و همکاران (۲۰۱۳)انجام شد[۲۲]. ۱ میلی لیتر از نمونه (۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با سایر محلول‌های شیمیایی آزمون مخلوط شده و به مدت یک ساعت در دمای $^{\circ}C$ انکوبه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از مخلوط فوق با ۱ میلی‌لیتر از تری‌کلرواستیک ۱۰ ٪ و ۱ میلی لیتر از تیوباربیتوریک اسید ۰/۵ ٪ مخلوط شده و ۱۰ دقیقه در $^{\circ}C$ انکوبه گشت. مخلوط تا دمای اتاق خنک شده و جذب در ۵۳۲ نانومتر با بلنک بافر فسفات و کنترل مثبت اسید استیک اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال هیدروکسیل از فرمول ۲-۹ محاسبه شد:

$$\text{Hydroxyl radical scavenging activity\%} = (A_{cntrl} - A_{sample})/A_{cntrl} \times 100$$

فرمول ۲-۹

## ۲-٤- آنالیز آماری

تمام ارزیابی‌ها حداقل در ۳ تکرارانجام گرفته و برای مقایسه اثر آنزیم‌های مختلف در درجه هیدرولیز، ویژگی‌های امولسیفایری، ویژگی‌های کف‌زایی، خاصیت مهار DPPH، قدرت احیا و قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل از طرح کاملاً تصادفی و آزمون تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) تحت نرم افزار SPSS17 استفاده شد.



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- درجه هیدرولیز

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز پروتئین سویا توسط آنزیم‌های تریپسین تجاری، تریپسین استخراج و خالص شده از ماهی سفید، آلکالاز، پپسین و پاپائین در جدول ۱ آمده است. درجه هیدرولیز یا همان DH نشانگر ابتدایی از تغییر در یکپارچگی مولکولی است که منجر به کاهش خواص آلرژنیک پروتئین‌ها نیز میگردد[۲۳]. در طی هیدرولیز پروتئین‌ها، مولکول‌های درشت پروتئین با ساختار کمپلکس به پپتیدهای سایز کوچکتر و اسیدهای آمینه ویژه تبدیل میشوند. عوامل زیادی بر درجه هیدرولیز پروتئین‌ها اثر دارند که از جمله مهم‌ترین و بارزترین این عوامل، نوع آنزیم به کار رفته است. pH و دمای هیدرولیز ، نسبت آنزیم افزوده شده به سوبسترا، زمان هیدرولیز و ... نیز از فاکتورهای کنترل کننده درجه هیدرولیز هستند[۲۴و ۲۵]. تحقیقات نشان داده که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز نیز تا حد مشخصی افزایش یافته و پس از آن متوقف می‌شود و همواره یک ساعت اول به ویژه ۲۰ دقیقه اول هیدرولیز، بیشترین سرعت هیدرولیز را داراست[۲۶]. همانطور که پیداست بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به تریپسین تجاری و در درجه بعدی آلکالاز است. نتایج نشان داد که تریپسین حاصل از ماهی سفید در مقایسه با پپسین و پاپائین عملکرد هیدرولیزی بالاتری داشته اما نسبت به تریپسین تجاری خوک و آلکالاز درجه‌ی هیدرولیز کمتری ایجاد کرده است.

**Table 1** The degree of hydrolysis of soy protein hydrolysatesobtained by various enzymes

| Enzyme treatment | DH % |
|---|---|
| Pepsin | $5.443 \pm 0.763^{e}$ |
| Kutum trypsin | $14.291 \pm 0.799^{c}$ |
| Porcine trypsin | $19.344 \pm 1.124^{a}$ |
| papain | $7.839 \pm 1.134^{d}$ |
| Alcalase | $16.047 \pm 1.102^{b}$ |

The significant differences are indicated through different letters in the same column ($p < 0.05$).

رستم میری و همکاران (۲۰۱۷) هیدرولیز سویا با دو آنزیم تریپسین و آلکالاز را برای بیشینه کردن درجه هیدرولیز با روش RSM بررسی کردند و بیشترین درجه هیدرولیز گزارش شدهعبارت بود از: تریپسین ۲۰/٤۷۱ ٪ و آلکالاز ۱۵/۹۷۸٪[۲۵]. Meinlschmidt و همکاران (۲۰۱٦) بالاترین درجه هیدرولیز برای ایزوله پروتئین سویا در مدت دو ساعت را ۱۳٪ و توسط آلکالاز به دست آوردند و مقدار DH% را برای سایر آنزیم‌ها به شرح زیر گزارش کردند: پپسین ۱۰/٦ ٪ ، Flavourzyme ۸/۵ ٪، کلراز ۲TS ۷/۸ ٪و کلراز ۷۰۸۹ ٦/۸ ٪. کمترین مقدار هیدرولیز ۲/۸ ٪ بوده و مربوط به تریپسین پانکراس بود. آن‌ها علت این هیدرولیز کم توسط تریپسین را به وجود مهار کننده تریپسین Kunitz نسبت دادند[۲۷].

Hrckova و همکاران (۲۰۰۲) آرد سویای چربی‌زدایی شده را توسط ۳ آنزیم Flavourzyme، Novozym و آلکالاز در زمان‌های مختلف هیدرولیز کردند و بیشترین درجه هیدرولیز را ۳۹/۵ ٪ مربوط به آنزیم Flavourzymeو پس از ۸ ساعت هیدرولیز گزارش کردند. درجه هیدرولیز دو آنزیم دیگر در همین زمان ۳۵/۱ ٪ (آلکالاز) و ۳۳/۳ ٪ (Novozym) بود[۲۸].

### ۳-۲- ویژگی‌های تکنولوژیکی

ویژگی‌های تکنولوژیکی نظیر قدرت امولسیفایری و کف‌زایی تحت کنترل خواص فیزیکوشیمیایی پروتئین‌ها هستند که تعیین می‌کنند هر پروتئین در هر ماتریکس غذایی چه رفتاری از خود نشان می‌دهد. هیدرولیز آنزیمی، وزن مولکولی پروتئین را کاهش داده و گروه‌های قابل یونیزه شدن را در آن افزایش می‌دهد و همچنین با باز کردن زنجیره‌ی پروتئین، گروه‌های هیدروفوبیک آن را بیشتر در معرض تماس با محیط می‌گذارد که همگی این عوامل خواص فیزیکی و شیمیایی پروتئین را تغییر می‌دهند[۲۹]. دو پروتئین گلیسنین و بتاکان گلیسینین در سویا نقش اصلی را در ویژگی‌های عملکردی SPI ایفا می‌کنند که به دلیل ساختار پیچیده مولکولی، با ایجاد اندک تغییر در این دو پروتئین، تفاوت چشمگیری در ویژگی‌های عملکردی آن ظاهر می‌شود[۳۰].



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

**آزمون فعالیت و پایداری امولسیفایری:** نتایج حاصل از آزمون اندازه‌گیری فعالیت امولسیفایری در جدول ۲ آمده است. همانطور که پیداست، هیدرولیز پروتئین سویا در همه‌ی موارد منجر به افزایش فعالیت و پایداری امولسیفایری شده است که در اغلب این موارد نیز اختلاف معنی‌دار است. بیشترین افزایش فعالیت امولسیفایری در مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده در مورد آنزیم تریپسین (خوک و ماهی سفید) مشاهده شد و کمترین افزایش مربوط به آنزیم پپسین بود و در مورد پایداری امولسیون نیز، بیشترین پایداری مربوط به هیدرولیزهای تریپسین ماهی سفید و آلکالاز بود. تریپسین ماهی سفید در مقایسه با تریپسین تجاری، فعالیت امولسیفایری اندکی کمتر داشت اما پایداری امولسیون حاصل بسیار بیشتر بود.

Zhao و Hou (2009) کنسانتره و ایزوله پروتئین سویا را با استفاده از دو آنزیم تریپسین و neutrase به صورت جزئی هیدرولیز کرده و نشان دادند که مقدار EAIی هیدرولیزهای تریپسین در هر دو نوع پروتئین (کنسانتره و ایزوله) بیشتر از مقدار EAIی هیدرولیزهای حاصل از neutrase است[۳۱]. de la Barca و همکاران (۲۰۰۰) و Jung و همکاران (۲۰۰٤) گزارش کرده‌اند که هیدرولیز آنزیمی منجر به افزایش ویژگی‌های امولسیفایری پروتئین‌های سویا میگردد [۳۲و ۳۳]. Meinlschmidt و همکاران (۲۰۱٦) نیز پس از هیدرولیز پروتئین سویا توسط آنزیم‌های آلکالاز، Flavourzyme، پپسین، پاپائین و کلراز گزارش کرد که تمامی هیدرولیزهای تولید شده از سویا به غیر از هیدرولیزهای آلکالاز و پپسین، در مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده قدرت امولسیفایری بالاتری داشتند[۲۷]. این افزایش می‌تواند به دلیل شکست مولکول‌های پروتئینی بزرگ و در معرض قرار گرفتن گروه‌های هیدروفوبیک و افزایش انحلال‌پذیری پروتئین باشد که همگی منجر به افزایش فعالیت سطحی پروتئین شده و قدرت امولسیفایری را بهبود می‌دهند[۳٤].

**Table 2** Emulsifying properties (emulsifying activity index and stability index) of Soy protein and soy protein hydrolysates

| Enzyme treatment | EAI($m^2$/g) | ESI(min) |
|---|---|---|
| Unhydrolyzed soy protein | 32.56 ±2.946$^{e}$ | 65.599 ±4.149$^{c}$ |
| Pepsin | 45.937 ±4.266$^{d}$ | 159.194 ±7.017$^{b}$ |
| Kutum trypsin | 116.378 ±7.743$^{a}$ | 273.027 ±2.559$^{a}$ |
| Porcine trypsin | 123.502 ±3.276$^{a}$ | 127.901 ±2.089$^{b,c}$ |
| papain | 89.786 ±5.727$^{b}$ | 90.901 ±4.888$^{c}$ |
| Alcalase | 59.018 ±1.226$^{c}$ | 276.615 ±5.799$^{a}$ |

The significant differences are indicated through different letters in the same column ($p < 0.05$).

**آزمون ظرفیت، پایداری و دانسیته کف**

نتایج حاصل از آزمون اندازه‌گیری ظرفیت کف‌زایی در جدول ۳ آمده است. همانطور که پیداست، هیدرولیز پروتئین سویا در همه‌ی موارد منجر به افزایش ظرفیت، پایداری کفو کاهش دانسیته آن شده است که در اغلب این موارد نیز اختلاف معنی‌دار است. بیشترین افزایش ظرفیت کف‌زاییدر مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده در مورد آنزیم تریپسین تجاری مشاهده شد و کمترین افزایش مربوط به آنزیم آلکالاز بود. در مورد پایداری کف نیز بیشترین پایداری را هیدرولیز تریپسین تجاری و کمترین را هیدرولیز پاپائین و آلکالاز داشت. آنزیم تریپسین ماهی سفید به رغم کارایی کمتر در مقایسه با تریپسین تجاری، در مقایسه با سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشته در مقام دوم از لحاظ فعالیت قرار داشت.

Meinlschmidt و همکاران (۲۰۱٦) نیز نشان دادند که هیدرولیز منجر به افزایش ظرفیت کف و کاهش دانسیته کف شده است و بیشترین فعالیت را در بین آنزیم‌های آلکالاز، Flavourzyme، پپسین، پاپائین و کلراز برای پپسین و کمترین را برایFlavourzyme گزارش کردند [۲۷]. آن‌ها همچنیندر تمام نمونه های هیدرولیز شده، کاهش در پایداری کف گزارش کرده و علت آن را کاهش در تعداد پروتئین‌های بزرگ مولکول بیان کرده بودند که منجر به استحکام کف می‌شوند اما در این تحقیق کاهشی در پایداری کف مشاهده نشد و تمامی نمونه‌های



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

هیدرولیز شده، در مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده،کف پایدارتری داشته و هیدرولیز حاصل از تریپسین تجاری و پس از آن تریپسین ماهی سفید بیشترین پایداری کف را دارا بود.

Hrckova و همکاران (۲۰۰۲) ارتفاع و پایداری کف هیدرولیزهای آرد سویای تهیه شده توسط ۳ آنزیم Flavourzyme، Novozym و آلکالاز را بررسی کرده و گزارش کردند که هیدرولیزهای حاصل از آلکالاز بیشترین ارتفاع کف را داشته و هیدرولیزهای Flavourzyme کمترین ارتفاع کف اما بیشترین پایداری کف را داشتند[۲۸].

پروتئین سویای هیدرولیز نشده به دلیل وجود ساختار سوم و چهارم قدرت کف محدودی دارد اما پپتیدهای هیدرولیز شده به دلیل از دست دادن این ساختارها، به سهولت در سطح بین مایع و هوا قرار گرفته و ساختار کف را استحکام میبخشند[۳۵].

**Table 3** Foaming properties (foaming activity, density, and stability) of Soy protein and soy protein hydrolysates

| Enzyme treatment | Foam capacity (%) | Foam density (g/l) | Foam stability (%) |
|---|---|---|---|
| Unhydrolyzed soy protein | $27.00 \pm 0.600^{d}$ | $778.700 \pm 1.296^{a}$ | $15.666 \pm 0.305^{d}$ |
| Pepsin | $118.333 \pm 0.7637^{b}$ | $452.414 \pm 1.847^{c}$ | $90.00 \pm 1.00^{a}$ |
| Kutum trypsin | $123.00 \pm 0.721^{b}$ | $444.007 \pm 1.469^{c}$ | $68.333 \pm 0.763^{b}$ |
| Porcine trypsin | $151.666 \pm 0.763^{a}$ | $394.461 \pm 1.169^{d}$ | $100.00 \pm 0.500^{a}$ |
| papain | $142.105 \pm 1.052^{a}$ | $428.922 \pm 1.815^{c,d}$ | $39.473 \pm 0.789^{c}$ |
| Alcalase | $55.666 \pm 0.643^{c}$ | $635.169 \pm 1.617^{b}$ | $28.00 \pm 0.264^{c}$ |

The significant differences are indicated through different letters in the same column ($p < 0.05$).

## ۳-۳- نتایج آزمون‌های سنجش قدرت آنتی‌اکسیدانی

**نتایج آزمون DPPH**: نتایج مربوط به فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH ( ۲و۲- دی فنیل -۱ پیکریل هیدرازیل) در مورد هیدرولیزهای حاصل از پروتئین سویا توسط آنزیم‌های تریپسین تجاری، تریپسین استخراج و خالص شده از ماهی سفید، آلکالاز، پپسین و پاپائین در شکل ۱ آمده است. همانطور که مشاهده می‌شود نتایج مربوط به آنزیم‌های مختلف و غلظت‌های مختلف با هم مقایسه شده‌اند.

از لحاظ قدرت مهار DPPH ، آنزیم تریپسین استخراج شده از ماهی سفید، تریپسین تجاری و آلکالاز در مقام اول قرار دارند و نمودار آن‌ها تقریباً بر هم منطبق است. ضعیف‌ترین درصد مهار نیز مربوط به آنزیم پپسین می‌باشد. همچنین قدرت مهار DPPH وابسته به غلظت پروتئین هیدرولیز شده نیز بوده و با افزایش غلظت، قدرت مهار نیز افزایش یافته است اما شیب افزایش در غلظت های پایین بیشتر بوده و پس از غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، میزان قدرت مهار رادیکال DPPH تقریباً ثابت است.

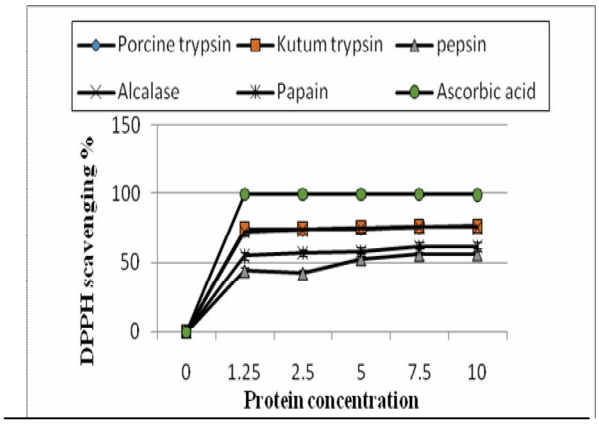


**Fig 1** DPPH scavenging activity of various soy protein hydrolysates in different concentrations

de Castro و Sato(۲۰۱٤) ایزوله پروتئین سویا را با استفاده از آلکالاز و Flavourzyme هیدرولیز کرده و مشاهده کردند که قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیز حاصل از Flavourzyme بالاتر از هیدرولیز حاصل از آلکالاز است، آن‌ها همچنین نشان دادند در اثر هیدرولیز با Flavourzyme قدرت مهار رادیکال DPPH از ۲۷ ٪ به ۵۱/۵۵ ٪ رسید(۱۵).Oliveira و همکاران (۲۰۱٤) پروتئین سویا را با



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

آنزیم پروتئاز میکروبی هیدرولیز کرده، وجود قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH را برای هیدرولیزهای حاصل گزارش کرده و نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت مهار ابتدا افزایش یافته و سپس ثابت می‌ماند[۱۶]. Abu-Salemو همکاران (۲۰۱۳) پروتئین سویا را با آنزیم پاپائین هیدرولیز کرده و بیان کردند که فراکسیون ۲۵ هیدرولیز حاصل در غلظت ۱/۴۵ میلی گرم بر میلی لیتر قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشت (۷۰ ٪) و در کل فراکسیون‌های دارای وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشتند[۳۶]. Jimenez-Ruiz و همکاران (۲۰۱۳) ایزوله پروتئین سویا را با آنزیم‌های Flavourzyme و کیموتریپسین هیدرولیز کرده و درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی را برای ایزوله هیدرولیز نشده ۱۷/۷۴ ٪، برای هیدرولیز Flavourzyme ۲۳/۳۳ ٪ و برای هیدرولیز کیموتریپسین ۲۵/۹۴ ٪ گزارش کردند[۳۷].

**نتایج آزمون قدرت احیا و مهار رادیکال هیدروکسیل:** نتایج مربوط به قدرت احیا و قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل در مورد هیدرولیز های حاصل از پروتئین سویا توسط آنزیم‌های تریپسین تجاری، تریپسین استخراج و خالص شده از ماهی سفید، آلکالاز، پپسین و پاپائین در جدول ٤ آمده است. درنهایت نتایج مربوط به آنزیم‌های مختلف در هر ستون با هم و با کنترل مثبت (اسید اسکوربیک) مقایسه شده اند.

**Table 4** Antioxidant activities of soy protein hydrolysates

| treatment | Reducing power | hydroxyl scavenging % |
|---|---|---|
| Positive control (Ascorbic acid | $0.816 \pm 0.008^{a}$ | $95.454 \pm 1.62^{a}$ |
| Soy protein hydrolysates prepared by: | | |
| Pepsin | $0.125 \pm 0.004^{e}$ | $80.844 \pm 0.32^{b}$ |
| Kutum trypsin | $0.259 \pm 0.010^{b}$ | $51.623 \pm 0.97^{f}$ |
| Porcine trypsin | $0.238 \pm 0.005^{c}$ | $54.221 \pm 0.85^{e}$ |
| papain | $0.217 \pm 0.003^{d}$ | $67.532 \pm 1.17^{d}$ |
| Alcalase | $0.210 \pm 0.005^{d}$ | $74.675 \pm 2.57^{c}$ |

The significant differences are indicated through different letters in the same column ($p < 0.05$.

از لحاظ قدرت احیا، تریپسین ماهی سفید و تریپسین تجاری به ترتیب در درجه اول و دوم قرار دارند. کمترین قدرت احیا نیز مربوط به پپسین میباشد و از لحاظ درصد مهار رادیکال هیدروکسیل، اسید اسکوربیک که به عنوان کنترل مثبت بود در درجه اول بوده و پس از آن به ترتیب پپسین و آلکالاز قرار دارند. کمترین درصد مهار نیز مربوط به تریپسین ماهی سفید میباشد.

Oliveira و همکاران (۲۰۱٤) پروتئین سویا را با آنزیم پروتئاز میکروبی هیدرولیز کرده، وجود قدرت احیا ($OD_{700}$= ۰/۳۷۹) برای ٦ ساعت هیدرولیز) را برای هیدرولیز حاصل گزارش کرده و نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت احیا همواره افزایش می‌یابد [۱٦]. Moure و همکاران (۲۰۰٦) سویا را با آنزیم Flavourzyme هیدرولیز کرده و با اولترافیلتر به سه فرکسیون فراکسینه کردند. در این پژوهش مشخص شد که در بین فرکسیون های حاصل، فرکسیون زیر ۱۰ کیلودالتون بیشترین قدرت احیا ($OD_{700}$=۰/۳۲۱) و بیشترین قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل ٦۹٪ را داشت[۳۸]. Sefatie و همکاران (۲۰۱۳) پروتئین سویای سیاه را با آنزیم‌های پپسین و پانکراتین هیدرولیز کرده و نشان دادند همه ی هیدرولیزها خاصیت مهار رادیکال هیدروکسیل خوبی داشتند (بین ۸۸/٥٦ تا ۹۷/٤۷ ٪ در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر) و هیدرولیزهای تهیه شده در ۲٤ ساعت بیشترین قدرت احیا را داشتند[۳۹]. Cumby و همکاران (۲۰۰۸) پروتئین کانولا را با دو آنزیم آلکالاز و Flavourzyme هیدرولیز کرده و نشان دادند که هیدرولیزهای حاصل از Flavourzyme در مقایسه با آلکالاز قدرت احیا بالاتری داشتند[٤۰].

## ٤- نتیجه گیری کلی

بر اساس نتایج این پژوهش هیدرولیزهای پروتئینی به دست آمده از تریپسین ماهی سفید خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی در مقایسه با هیدرولیزهای پروتئینی سایر آنزیم‌های به‌کاررفته داشته



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

و خواص عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده با تریپسین ماهی سفید نظیرخواص امولسیون‌کنندگی و کف‌زایی نیز بطور موثری نسبت به سایر هیدرولیزها و پروتئین هیدرولیز نشده بهبود یافته است. پروتئین‌های هیدرولیز شده از این نظر که آنتی‌اکسیدانی طبیعی بوده و همزمان دارای خواص عملکردی نیز می‌باشند، می‌توانند در فرمولاسیون مواد غذایی نقش مطلوبی ایفا کنند. نتایج نشان می‌دهند که تریپسین ماهی سفید قدرت رقابت با بسیاری از آنزیم‌های تجاری را داشته و می‌تواند در فرآیند هیدرولیز، جایگزین مناسبی برای آن‌ها تلقی گردد. جداسازی و تخلیص آنزیم از امعا و احشا ماهی سفید در فصل صید، بررسی سایر آنزیم‌های پروتئولیتیک و لیپولیتیک گوارشی ماهی سفید و امکان تولید تجاری این آنزیم با استفاده از مهندسی ژنتیک از موارد قابل پیشنهاد برای پژوهش‌های آتی می‌باشند.

## ۵- منابع


[1] Mullally, M.M., O'Callaghan, D.M., FitzGerald, R.J., Donnelly, WJ., Dalton, J.P., 1994, Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatic protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolyzatecharacteristics. Journal of Agricultural and Food Chemistry,. 42(12): p. 2973-2981.

[2] Korhonen, H., 2009, Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. Journal of Functional Foods, 1(2): p. 177-187.

[3] Liu, J., Yu, Z.,Zhao, W., Lin, S., et al., 2010, Isolation and identification of angiotensin-converting enzyme inhibitory peptides from egg white protein hydrolysates. Food Chemistry, 122(4): p. 1159-1163.

[4] Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C.,2004, Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food research international, 37(2): p. 123-131.

[5] Parrado, J., Miramontes, E., Jover, M., Gutierrez, J.F.,et al. , 2006, Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food. Food Chemistry, 98(4): p. 742-748.

[6] Zambrowicz, A., Pokora, M., Senter, B., Dabrowska, A., et al., 2015, Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: isolation and characterization. Amino Acids, 47: p. 369-380.

[7] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., et al., 1989, Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. Food and Chemical Toxicology, 24(10-11): p. 1071-1082.

[8] Zhou, D.-Y., Zhu, B.W., Qiao, L., Wu, H.T., et al., 2012, In vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates prepared from abalone (Haliotis discus hannai Ino) viscera. Food and Bioproducts Processing, 90(2): p. 148-154.

[9] Singh, P., Kumar, R., Sabapathy, S.N., Bawa, A.S., 2008, Functional and Edible Uses of Soy Protein Products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 7(1): p. 14-28.

[10] Martínez, K.D., Carrera Sanchez, C., Rodriguez Patino, J.M., Pilosof, M.R.,2009, Interfacial and foaming properties of soy protein and their hydrolysates. Food Hydrocolloids, 23(8): p. 2149-2157.

[11] Zhang, L., Li, J., Zhou, K., 2010, Chelatingand radical scavenging activities of soy protein hydrolysates prepared from microbial proteases and their effect on meat lipid peroxidation. Bioresource Technology, 101(7): p. 2084-2089.

[12] Don, L.B., Pilosof, A., Bartholomai, G., 1991, Enzymatic modification of soy protein concentrates by fungal and bacterial proteases. Journal of the American Oil Chemists Society, 68(2): p. 102-105.

[13] Kim, S.Y., Park,P.S., Rhee,K.C., 1990, Functional properties of proteolytic enzyme modified soy protein isolate .Journal of Agricultural and Food Chemistry, 38(3): p. 651-656.

[14] Bishov, S. and Henick, A., 1972, Antioxidant effect of protein hydrolyzates in a freeze-dried model system. Journal of Food Science, 37(6): p. 873-875.

[15] de Castro, R.J.S. andSato, H.H., 2014, Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. Food and Bioproducts Processing, 92(1): p. 80-88.




[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

Biotechnology Research Asia, 14(1): p. 193-200.
[26] Modanlow, M., Rafiee, G.R., Motamedzadegan, A., Moeeni, S., et al., 2011, Effect of Different Ratio of Trypsin Enzyme, Times and Temperatures on Protein Recovery of Viscera Yellow Fin Tuna (Thunus albacores). Iranian Food Science and Technology Research Journal; Vol 7, Issue 2.
[27] Meinlschmidt, P., Sussmann, D., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., 2016 , Enzymatic treatment of soy protein isolates: effects on the potential allergenicity, technofunctionality, and sensory properties. Food science & nutrition, 4(1): p. 11-23.
[28] Hrckova, M., Rusnakova, M., and Zemanovic, J., 2002, Enzymatic hydrolysis of defatted soy flour by three different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. Vol. 20. 2002. 7-14.
[29] Creusot, N., Gruppen, H., van Koningsveld, G., De Kruif, C.G., et al., 2006,Peptide–peptide and protein–peptide interactions in mixtures of whey protein isolate and whey protein isolate hydrolysates. Vol. 16. 840-849.
[30] Utsumi, S. and Kinsella, J.E., 1985, Structure-function relationships in food proteins: subunit interactions in heat-induced gelation of 7S, 11S, and soy isolate proteins. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 33(2): p. 297-303
[31] Zhao, X. and Hou, Y., 2009,Limited hydrolysis of soybean protein concentrate and isolate with two proteases and the impact on emulsifying activity index ofhydrolysates, imag. Vol. 8. 2009. 3314-3319
[32] de la Barca, A.M.C., Ruiz-Salazar, R.A., Jara-Marini, M.E., 2000, Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Soy Protein to Improve its Amino Acid Composition and Functional Properties. Journal of Food Science, 65(2): p. 246-253.
[33] Jung, S., Roussel- Philippe, C., Briggs, J.L., Murphy, P.A., et al., 2004, Limited hydrolysis of soy proteins with endo- and exoproteases. Journal of the American Oil Chemists' Society, 81 : (10) p. 953.
[34] Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S., Qi, M. , 1998, Hydrophobicity, solubility, and
[16] Oliveira, C., Coletto, D., Correa, A.P.F., Daroit, D.J., et al., 2014, Antioxidant activity and inhibition of meat lipid oxidation by soy protein hydrolysates obtained with a microbial protease. International Food Research Journal, 21(2): p. 775-781.
[17] Nielsen, P., Petersen,D., Dambmann, C., 2001, Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. Journal of food science, 66(5): p. 642-646.
[18] Pearce, K.N. and Kinsella, J.E., 1978, Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. Journal of Agricultural andFood Chemistry, 26(3): p. 716-723.
[19] Sathe, S.K., Salunkhe, D.K., 1981, Functional Properties of the Great Northern Bean (Phaseolus vulgaris L.) Proteins: Emulsion, Foaming, Viscosity, and Gelation Properties. Journal of Food Science, 46(1): p . 71-81.
[20] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T.,1992, Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of agricultural and food chemistry, 40(6): p. 945-948.
[21] Yen, G.-C. and Chen, H.-Y., 1995, Antioxidant activity of various tea extracts in relation to their antimutagenicity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(1): p. 27-32.
[22] Zia-Ul-Haq, M., Ahmad, S., Amarowicz, R., De Feo, V., 2013, Antioxidant activity of the extracts of some cowpea (Vigna unguiculata (L) Walp.) cultivars commonly consumed in Pakistan. Molecules, 2013. 18(2): p. 2005-2017.
[23] Tavano, O.L., 2013, Protein hydrolysis using proteases: an important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 90: p. 1-11.
[24] Ma, Y., Sun, X., Wang, L., 2015, Study on Optimal Conditions of Alcalase Enzymatic Hydrolysis of Soybean Protein Isolate. Vol. 9:p.154-158.
[25] Rostammiry, L., Saeidiasl, M.R., Safari, R., Javadian, R.,2017, Optimization of the Enzymatic Hydrolysis of Soy Protein Isolate by Alcalase and Trypsin. Biosciences



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. Journal of the American Oil Chemists' Society, 75(7): p. 845-850.

[35] Yu, M.A. and Damodaran, S., 1991, Kinetics of destabilization of soy protein foams. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 39(9): p. 1563-1567.

[36] Abu-Salem, F.M., Mahmoud, M.H., El-Kalyoub, M.H., Gibriel, A.Y., et al., 2013, Characterization of antioxidant peptides of soybean protein hydrolysate .in Proceedings of World Academy of Science, Engineering and Technology. World Academy of Science, Engineering and Technology (WASET).

[37] Jimenez-Ruiz, E.I., Calderon de la Barca, A.M., Sotelo-Mundo, R.R., Arteaga-Mackinney, G.E.,et al., 2013, Partial characterization of ultrafiltrated soy protein hydrolysates with antioxidant and free radical scavenging activities. J Food Sci, 78(8): p. C1152-8.

[38] Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006, Antioxidant properties of ultrafiltration-recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry, 41(2): p. 447-456.

[39] Sefatie, S.R., Tounkara, F., Karangwa, E.,Young, H.S., et al., 2013, In Vitro Antioxidant Activities of Protein Hydrolysate from Germinated Black Soybean (Glycine max L.). Vol. 5, p. 453-459.

[40] Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., & Shahidi, F., 2008, Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry, *109*(1), 144-148.



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]

# Comparison of the Effect of Caspian kutum trypsin (*Rutilus frisii* kutum) with commercial enzymes on the functional and antioxidant properties of soy protein hydrolysates

**Hasebi, Z. [1], Motamedzadegan, A. [2*], Madani, R. [3], Zamani, A. [4]**

1. PhD student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural ResourcesUniversity, Sari, Mazandaran, Iran
2.Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran
3. Professor, Department of Biotechnology, Razi Vaccine and Serum Research institute, Agricultural Research Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran
4. Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Malayer, Hamedan, Iran

**(Received: 2018/04/20 Accepted:2019/01/18)**

Nowadays, modifying of the functional properties of proteins by proteolytic enzymes is a novel way in order to use the hydrolysates as a natural antioxidant, emulsifier or foaming agent. In this study, TSP was hydrolyzed by commercial trypsin (porcine), trypsin extracted from Caspian Kutum, pepsin, alcalase and papain. The results showed that the highest degree of hydrolysis (DH%) was related to commercial trypsin (19.34 %), Alcalase (16.04%) and Kutum trypsin (14.29%), respectively.The highest emulsifying capacity was obtained by commercial and Kutum trypsin, compared to non-hydrolyzed protein, and Alcalase hydrolysates had the highest emulsion stability ($p < 0.05$).Higherfoaming capacity was observed in hydrolysates by commercial trypsin, followed by Kutum trypsin, compared to non-hydrolyzed protein.However, the lowest value was related toAlcalase. In the case of foam stability, the commercial trypsin hydrolysate had the most stable foam, while Kutum trypsin, despite its lower efficiency compared to commercial trypsin, had the second place. Hydrolysates prepared with Kutum trypsin had the highest DPPH-scavenging ability and reducing power but the lowest OH-radical scavenging power. The results of this study show that kutum trypsin can produce soy protein hydrolysates with good functional and antioxidant properties, which are comparable to commercial enzymes.

**Key words:** Trypsin, Papain, Soy protein, Foaming properties, Emulsion activity index

* Corresponding Author E-Mail Addess: amotgan@yahoo.com



[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-23 ]