مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تاثیر زمان و نوع آنزیم بر ویژگی‌های ساختاری و آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از پروتئین لوبیا سفید (*Phaseolus vulgaris L.*)

نازیلا زینالی نامدار[1]، لیلا روفه‌گری‌نژاد[2*]، آیناز علیزاده[2]، سید مهدی جعفری[3]، نارملا آصفی[2]

1- دانشجوی دکتری تخصصی گروه علوم و صنایع غذایی،واحد تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران.

2- دانشیارگروه علوم و صنایع غذایی،واحد تبریز، دانشگاه آزاداسلامی، تبریز، ایران.

3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: **1400 /10/22**

تاریخ پذیرش: **1401/01/15**

کلمات کلیدی:

هیدرولیز آنزیمی،

لوبیا سفید،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی،

ویژگی‌هایساختاری،

ترکیب اسیدهای آمینه.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3

* مسئول مکاتبات:

l.roufegari@iaut.ac.ir

چکیده

در این تحقیق، تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز و پپسین) و زمان فرآیند (300-50 دقیقه) بر درجه هیدرولیز و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل مهارادیکال آزاد DPPH، ABTS، هیدروکسیل،قدرت احیاءکنندگی، و شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس پروتئین لوبیا سفید ارزیابی شدند. همچنین، ترکیب اسیدهای آمینه (انواع اسیدهای آمینه آبگریز، آنتی‌اکسیدان) و ویژگی‌های ساختاری (FTIR) پروتئین اولیه و هیدرولیزشده‌ها بررسی شدند. نتایج نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی موجب بهبود ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌شود. همچنین، ترکیب اسیدهای آمینه تاثیر قابل توجهی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌گذارد. از سوی دیگر، نوع آنزیم و زمان فرآیند هیدرولیز بر درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌ها تاثیر داشتند. بدین شکل که، بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH (82,4%)، ABTS(58,3%)، قدرت احیاءکنندگی (0,97)، مهار رادیکال هیدروکسیل (57,5%)، و شلاته‌کنندگی یون‌های آهن (53,7%) و مس (12,1%) تحت تاثیر نوع آنزیم و زمان فرآیند قرار گرفتند. در بین تیمارهای مختلف، بالاترین مقدار این شاخص‌ها (به جز شلاته کنندگی یون مس) مربوط به هیدرولیزشده با آنزیم آلکالاز بود. ویژگی‌های ساختاری پروتئین لوبیا سفید ارزیابی و هیدرولیز آنزیمی موجب تغییر در نواحی آمیدی (1 و 2) و همچنین در معرض قرار گرفتن برخی گروه‌های نهفته شد. نتایج این تحقیق حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز آنزیمی بر تولید هیدرولیزشده‌های با خاصیتآنتی‌اکسیدان با قابلیت استفاده در صنایع غذایی بودند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

1- مقدمه

در سالیان اخیر، رشد روز افزون بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، انواع سرطان‌ها و اختلالات ناشی از تغذیه نامناسب موجب شده تا محققان بیشتر بر اهمیت استفاده از منابع غذایی سالم و ترکیبات زیست فعال متمرکز شوند. در این بین، یکی از عوامل مهم و مخرب بر فساد محصولات غذایی و بروز انواع بیماری‌ها، رادیکال‌های آزاد هستند [1]. بنابراین با توجه به خطرات بالقوه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی، تحقیقات زیادی در خصوص استفاده از ترکیبات زیست فعال سلامتی‌بخش با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و از منابع طبیعی در حال انجام هستند. مواد زیست فعال به دو دسته مولکول‌ها (ویتامین‌ها، اسیدهای چرب، کاروتنوئیدها، استرول‌های گیاهی، پلی‌فنول‌ها، اسیدهای آمینه، پپتید و پروتئین‌ها) و سلول‌های زنده (پروبیوتیک‌ها1) تقسیم می‌شوند [2]. بخشی از این ترکیبات، مواد لیپیدی زیست فعال هستند. مهم‌ترین ترکیبات لیپیدی زیست فعال که بایستی به غذاها افزوده شوند شامل اسیدهای چرب، کاروتنوئیدها، استرول‌ها و ترکیبات آنتی اکسیدان (توکوفرول و پلی فنول‌ها) و ویتامین‌های محلول در چربی (نظیر A و D) هستند [3].

یکی از مهمترین منابع طبیعی تولید ترکیبات زیست فعال، پروتئین‌ها و پپتیدها هستند. اما این ترکیبات نیز به دلیل ناپایداری در شرایط مختلف حرارتی و اسیدی، دناتوراسیون و رسوب از کارایی چندانی بصورت طبیعی برخوردار نیستند[2]. بنابراین، تحقیقات متعددی بر اصلاح ساختاری پروتئین‌ها با استفاده از آنزیم‌ها و تولید پپتیدهای زیست فعال متمرکز شده‌اند. این پپتیدها، بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید شده دارای 20-2 آمینواسید و جرم مولکولیآن‌ها کمتر از 6000 دالتون می‌باشد، بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند [4]. از این مطالعات میتوان به تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از ژل رویال2 [5]، آرد هسته خرما[4]، کازئین [6]، بزرک [7]، پروتئین ماش [8] و بادام زمینی [9]، اشاره کرد. از مهمترین ویژگی‌های سلامتی‌بخش این پپتیدها می‌توان به هضم پذیری بالا و آلرژی‌زایی و سمیت پائین، ایمن‌سازی3، فعالیت‌های مخدر مانند4، آنتی‌باکتریال، ضد لخته‌شدن خون، کاهندگی فشار خون، کاهندگی کلسترول خون5، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی نام برد [2].

در بین منابع گیاهی مختلف، حبوبات بعنوان منبعی غنی از پروتئین، انرژی و کربوهیدرات، فیبر، ویتامین، ترکیبات فنولی و مواد معدنی در رژیم غذایی انسان شناخته می‌شوند. حبوبات با دارا بودن مقدار بالایی پروتئین (حدود 29-21%) از اهمیت بالایی برخوردارند [10]. در بین حبوبات مختلف، لوبیای سفید (*Phaseolus vulgaris*) از جایگاه ویژه‌ای در رژیم غذایی مردم دنیا برخوردار است. بطوریکه بر طبق آمار سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد، تولید جهانی سالانه این محصول به بیش از 26 میلیون تن بالغ گردید.لوبیا حاوی ترکیبات زیست فعال زیادی است که نقش‌های فیزیولوژیکی بسیاری ایفا می‌کنند. همچنین برخی ترکیبات بازدارنده‌های آنزیم‌های هضم کننده پروتئین‌ها و برخی الیگوساکاریدها و برخی دیگر از ترکیبات ضدتغذیه‌ای مانند فیتیک اسید، لکتین و تانین‌ها در ترکیب آن‌ها وجود دارند [11].

با در نظر گرفتن مزایا و اهمیت تولید پپتیدهای زیست فعال به ویژه از منابع پروتئینی گیاهی، اهداف این پژوهش: 1) استخراج پروتئین از لوبیا سفید، 2) هیدرولیز آنزیمی پروتئین استخراج شده با آنزیم‌های آلکالاز و پپسین، 3) ارزیابی ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین و هیدرولیزشده‌ها، 4) بررسی تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر درجه هیدرولیز، شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی شامل مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS، هیدروکسیل، قدرت احیاءکنندگی و شلاته کنندگی یون‌های آهن و مس، و در نهایت 4) ارزیابی ویژگی‌های ساختاری پروتئین اولیه و هیدرولیزشده‌های حاصل با روش طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR) بودند.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد مورد استفاده

لوبیا سفید از بازار محلی خریداری شد. کلیه مواد شیمیایی شامل، آلکالاز، پپسین، اسید تری‌کلرواستیک (TCA)، کوماسی بلو (G250)، DPPH، ABTS، پتاسیم‌پرسولفات، ترولوکس، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی

1. Probiotics
2. Royal jelly
3. Immunomodulatory
4. Opiate-like
5. Hypocholesterolemic

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

ریبوز، سولفات آهن، EDTA، پراکسید هیدروژن، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، توین 20، اسید اسکوربیک ، اسید تیوباربیتوریک (TBA)، سدیم دودسیل سولفات (SDS) (از شرکت سیگما خریداری شدند).اتانول، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم کلراید، پتاسیم دی هیدروژن فسفات واسید فسفریک (از شرکت مرک، آلمان) تهیه شدند.

2-2-استخراج پروتئین

دانه‌های لوبیا به وسیله آسیاب پودر شدند. سپس با هگزان در نسبت 1 به 5 وزنی-حجمی به‌مدت 3 ساعت چربی‌زدایی شدند. پس از حذف هگزان، پودر به نسبت 1:10 با محلول 0/33مولار کلرید سدیم، pH=9/25 مخلوط شده و به‌مدت 2 ساعت همزده شد و سپس محلول حاصل در 4500×g به مدت 30 دقیقه سانتریفوژشد. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در pH =4/5 (pH ایزوالکتریک‌پروتئین) تنظیم گردید. سپس در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در4500×g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژشد. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در 4500×g، بهمدت 5 دقیقه سانتریفوژگردید و با تنظیمpH =7/2 با افزودن هیدروکسید سدیم 1 مولار، دوباره به حالت محلول تبدیل شد. سپس ایزوله پروتئین حاصل با فریز درایر خشک شده و در دمای 4 درجه سانتی گرادنگهداریشد. تمامی فرآیندها در دمای اتاق انجام گردید[12].

3-2- هیدرولیز آنزیمی

پروتئین لوبیا سفید در غلظت (W/V) 5% در بافر فسفات 0/2M مولار (pH=8) به‌مدت 30 دقیقه حل شد. سپس آنزیم‌های آلکالاز و پپسین در نسبت آنزیم به سوبسترا (W/W) 2% به محلول اضافه شدند. دما و pH برای آلکالاز (50درجه سانتی گراد، pH= 8,5) و پپسین (30 درجه سانتی گراد، pH= 2) در شرایط بهینه عملکرد آن‌ها در نظر گرفته شدند. مدت زمان واکنش بین 50 تا 300 دقیقه متغیر و پس از اتمام فرآیند هیدرولیز در هر بازه زمانی، برای غیرفعال کردن واکنش و فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب 90 درجه سانتی گراد به مدت 15 min قرار داده شد. پس از آن، محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور 5000 rpm به مدت 10min سانتریفیوژ شد. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای 20-درجه سانتی گراد نگهداری گردید[6].

4-2- ترکیب اسیدهای آمینه

ترکیب آمینواسیدی هیدرولیزشده‌ها با استفاده از روش آلاشی و همکاران [23] و با دستگاه HPLC مجهز به ستون با فاز معکوس (Novapack C18, 4µm, Waters, Milford, MA) تعیین گردید. در ابتدا هر یک از هیدرولیزشده‌ها بمدت 24 ساعت در اسید کلریدریک 6 نرمال در دمای 110 درجه سانتی گراد هضم شد. تعیین اسیدهای آمینه آزاد نیز پس از انحلال هر یک از هیدرولیزشده‌ها در آب دوبار تقطیر انجام گرفت.

5-2- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون هیدرولیز شده و اسید تری کلرواستیک (0/5 مولار) در نسبت حجمی 1:1 مخلوط و به‌مدت 10 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گرادانکوبه شد. سپس، مخلوط در 4000rpm و به مدت 10 دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی اسید تری کلرواستیک 0/22 مولار با روش بردفورد [13] تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول شماره 1، در زیر تعیین شد:

(1)

$$DH\ (\%)= \text{Protein (TCA+Supernatant)/Protein (Casein hydrolysate suspension)} \times 100$$

6-2- ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی

1-6-2- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

درصد مهار رادیکال آزاد DPPHبا استفاده از روش وو و همکاران [14] با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (با غلظت 40 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) حل شدند. سپس، 1/5 میلی‌لیتر از هر نمونه با 1/5 میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH(0/15 میلی‌مولار) مخلوط و به‌مدت 20 ثانیه عمل ورتکس انجام شد. سپس، مخلوط حاصل در 2500rpm به‌مدت 10 دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت 20 دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول رویی در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPHبا استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I\ (\%) = [A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}] \times 100 \qquad (2)$$

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

در اینجا A_{blank}جذب کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای محلول نمونه با محلول DPPHمخلوط می‌شود) A_{sample}جذب نمونه می‌باشند.

2-6-2- فعالیت مهار رادیکال ABTS

فعالیت مهار رادیکال ABTSپودرهای هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط یو و همکاران [15] با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال $ABTS^+$ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت 7 میلی‌مولار و 2/45 میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به‌مدت 16-12 ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال $ABTS^+$ به‌وسیله پتاسیم پرسولفات انجام گرفت. قبل از آزمون، محلول $ABTS^+$ با استفاده از (pH , 0/27.4 مولار) PBS تا جذب 0/02 ± 0/7 در 734 نانومتر رقیق شد. سپس 40 میکرولیتر از هر نمونه (با غلظت4 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به 4 میلی‌لیتر محلول رقیق شده $ABTS^+$ افزوده شد. مخلوط برای 30 ثانیه به‌شدت هم‌زده شد و به‌مدت6 دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در 734 نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال $ABTS^+$ نمونه‌ها بر اساس معادله زیر محاسبه گردید.

$$AA\ (\%) = [A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}] \times 100 \quad (3)$$

در اینجا، A_{blank} (جذب نمونه کنترل فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کازئین هیدرولیز شده) هستند.

3-6-2- تعیین قدرت احیاءکنندگی

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، 0/5ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با 0/5 میلی‌لیتر بافرفسفات 0/2 مولار (pH 6.6) و 0/5 میلی‌لیترپتاسیم فری‌سیانید درصدوزنی-حجمی مخلوط و در دمای 50 درجه سانتی گرادبرای 20 دقیقه انکوبه شد. سپس، 0/5 میلی‌لیتر محلول اسید تری‌کلرو استیک 10درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت 10 دقیقه در 2500rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، 1 میلی‌لیتر سوپرناتانت با 1 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/2 میلی‌لیتر فریک کلراید 0/1 درصدوزنی-حجمی مخلوط گردید. جذب نمونه در 700 نانومتر پس از 10 دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، قرائت‌شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است[16].

4-6-2- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از اکسیداسیون 2-داکسی ریبوز برطبق روش جامدار و همکاران[9] تعیین شد. برای این آزمون، 0/2 میلی‌لیتر از مخلوط 10 میلی‌مولار ($FeSO_4$-EDTA)، 0/5 میلی‌لیتر (10 میلی‌مولار) آلفاداکسی ریبوز، 0/2 میلی‌لیتر نمونه هیدرولیز شده، 0/9 میلی‌لیتر سدیم فسفات بافر 0/2 مولار (pH 7.4) و 0/2 میلی‌لیتر پراکسید هیدروژن (10 میلی‌مولار) با هم مخلوط شدند. مخلوط در 37 درجه سانتی گراد برای 1 ساعت انکوبه شد. سپس، 1 میلی-لیتراسید تری کلرواستیک (TCA) 2/8 درصدو 1 میلی‌لیتر اسید تیوباربیتوریک 1 درصد برای توقف واکنش به مخلوط افزوده شد. مخلوط برای 15 دقیقه در حمام آب جوش قرار، سپس در یخ سرد شده، سپس جذب آن در 532 نانومتر با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. به جای نمونه برای تهیه کنترل،حجم یکسانی آب مقطر استفاده گردید.

5-6-2- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر طبق روش اکبربگلو و همکاران[7] اندازه‌گیری شد. ابتدا، 1 میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با 0/05 میلی‌لیتر محلول دی کلرید آهن (2 میلی‌مولار) و 1/85 میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، 0/1 میلی‌لیتر محلول فروزین (5 میلی‌مولار) افزوده و مخلوط به‌شدت هم‌زده شد. جذب پس از 10 دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در 562 نانومتر خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد.

6-6-2- فعالیت شلاته کنندگی یون مس

فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش کانگ و ژیانگ [17] اندازه‌گیری شد. در ابتدا، 1 میلی‌لیتر محلول 0/2 میلی‌مولار سولفات مس با 1 میلی‌لیتر هیدرولیز شده در فالکون 15 میلی‌لیتر مخلوط و برای 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سپس، 1 میلی‌لیتر محلول اسید تری کلرواستیک 11/3 درصد افزوده و نمونه‌ها در 2500rpm برای 10 دقیقه سانتریفوژ شدند. پس از آن، 2 میلی‌لیتر از سوپرناتانت به 1 میلی‌لیتر محلول 10% پیریدین و 20 میکرولیتر پیروکاتکول ویولت افزوده و مخلوط ورتکس و

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

برای 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در 632 نانومتر خوانده و فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس با استفاده از معادله 3 تعیین گردید.

2-7- طیف سنجی فروسرخ (FTIR)

ارزیابی ساختار شیمیایی پروتئین و هیدرولیزشده‌ها با دستگاه FTIR مدل Shimadzu 8400، انجامشد. پروتئین اولیه و هیدرولیزشده‌ها هر کدام جداگانه با نسبت 100:1 با بروميد پتاسیم (KBr) مخلوط شدند و با دستگاه پرس بشکل دیسک[1] در آمدند. در نهایت طیف سنجی FTIR از نمونه‌ها در فرکانس $4000 \text{ to } 400 \text{ cm}^{-1}$ انجام شد.

2-8- تجزیه و تحلیل آماری

در پژوهش حاضر، اثر نوع آنزیم (آلکالاز و پپسین) در زمان‌های مختلف (300، 200، 100 و 50 دقیقه) بر درجه هیدرولیز و شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مختلفبا کاربرد آنالیز واریانس و استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 19 مورد ارزیابی قرار گرفتند تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن اثر متغیرها در ($P< 0.05$) انجام گردید.

3- نتایج و بحث

3-1- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از مهمترین شاخص‌های تعیین کننده وزن مولکولی، ترکیب آمینواسیدی، فعالیت بیولوژیکی و ویژگی‌های طعمی پپتیدهاست [9].در این تحقیق، مقدار درجه هیدرولیز تحت تاثیر نوع آنزیم و به ویژه زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی قرار گرفت ($P< 0.05$). نتایج نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز از 50 به 300 دقیقه، درجه هیدرولیز نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز و پپسین به ترتیب از 10 به 28% و از 7 به 24% افزایش یافت. این نتایج همچنین حاکی از فعالیت بیشتر آلکالاز در شکست پیوندهای پپتیدی و افزایش مقدار این شاخص بودند.

1. disk

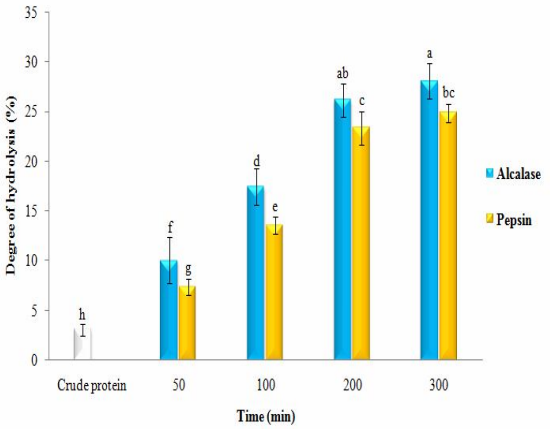

Fig 1 Effect of hydrolysis time and enzyme type on the degree of hydrolysis of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

این یافته را می‌توان به افزایش عملکرد آنزیم در دسترسی و فعالیت بیشتر بر سوبسترا در زمان ثابت و هیدرولیز پروتئین‌های اولیه،شکست بیشتر زنجیره‌ها، افزایش آمینواسیدها و تولید پپتیدهای کوچکتر نسبت داد [15].در تحقیقی، یو و همکاران [18] اثر زمان فرآیند هیدرولیز با آنزیم‌های پاپائین و پرتامکس را بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تیان[2] بررسی کردند. آن‌ها گزارش کردند که با افزایش زمان فرآیند از 2 به 4 و سپس 6 ساعت، درجه هیدرولیز نمونه‌ها به‌ترتیب از 18 درصد به 23 و 28 درصد افزایش یافت.

3-2- ترکیب اسیدهای آمینه

فعالیت‌های بیولوژیکی و عملکردی پپتیدهای زیست‌فعال تحت تاثیر درجه هیدرولیز، وزن مولکولی و ترکیب آمینواسیدی کل و آزاد (بویژه انواع آنتی‌اکسیدان) آنها قرار می‌گیرند [7]. جدول 1، ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین لوبیا سفید و هیدرولیزشده‌ها با آلکالاز و پپسین را نشان می‌دهد. اسیدهای آمینه گلوتامیک، آسپارتیک، آرژنین، گلیسین، سیستئین، پرولین، آلانین، والین و لوسین بیشترین ترکیب آمینواسیدی پروتئین و هیدرولیزشده‌ها را تشکیل می‌دهند.

از سوی دیگر، مقدار اسیدهای آمینه آبگریز و آنتی‌اکسیدان در هیدرولیزشده با آلکالاز بیش از نوع پپسین و پروتئین اولیه است. همچنین، مقداری بالای آمینواسیدهای لیزین و لوسین در هیدرولیزشده‌ها منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال‌های

2. Loach

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

سوپراکسید می‌شوند [19]. در تحقیق دیگری، ترکیب آمینواسیدهای آزاد و کل در فراکسیون‌های پپتیدی (کمتر از 5 کیلودالتون) هیدرولیزشده پروتئین کاد[1] بررسی شدند. در آن تحقیق بیشترین مقدار آمینواسیدهای آزاد و آنتی‌اکسیدان بویژه انواع قطبی (هیستدین، متیونین، آلانین) و غیرقطبی (لوسین و ایزولوسین) در فراکسیون با وزن مولکولی کمتر از 3KDa مشاهده شدند [20].

Table 1 Amino acid composition of navy bean protein and its hydrolysates with alcalase and pepsin (mg/g)

H-Pe	H-Al	Crude protein	Amino acid
89.1	86.9	85.3	Aspartic
108.4	106.3	104.5	Glutamic
22.1	23.7	21.2	Histidine
41.5	40.1	46.3	Serine
37.2	38.6	40.7	Arginine
28.4	29.7	28.1	Glycine
37.8	36.4	35.3	Threonine
29.9	31.2	30.2	Alanine
32.7	35.6	31.5	Tyrosine
9.1	9.2	8.9	Methionine
40.2	39.1	40.6	Valine
79.6	77.9	80.2	Cysteine
35.7	34.3	35.3	Proline
46.2	47.3	44.8	Phenylalanine
37.4	37.9	36.4	Isoleucine
67.2	65.2	64.9	Leucine
47.9	50.2	47.3	Lysine
6.8	8.9	6.3	Tryptophan
305.2	308.7	298.2	HAA
118.6	127.6	115.2	AAA
799.2	798.5	787.8	TAA

Hydrophobicamino acids (HAA) = Ala, Val, Ile, Leu, Tyr, Phe, Trp, Pro and Met; Antioxidant amino acids (AAA) = Trp, Met, His, Tyr and Lys; Total amino acids (TAA).

3-3- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

3-3-1- مهار رادیکال DPPH

با توجه به اهمیت این شاخص در مطالعات مختلف، رادیکال آزاد DPPH به طور گسترده برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات مختلف احیاءکننده به کار می‌رود[18]. نتایج حاصل از ارزیابی اثر زمان هیدرولیز آنزیمی بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت (شکل 2).

1. cod protein hydrolysates

این نتایج حاکی از تاثیر قابل ملاحظه هیدرولیز آنزیمی بر تولید پپتیدهایی با فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بودند. بطورمثال، تنها 50 دقیقه هیدرولیز پروتئین لوبیا با آلکالاز موجب افزایش مقدار این شاخص از حدود 50 به 76درصد گردید (P<0/05). روند افزایشی این شاخص تا 200 دقیقه هیدرولیز نیز ادامه یافت. اما هیدرولیز آنزیمی بیش از این مقدار، تاثیری بر فعالیت پپتیدها در مهار این رادیکال نداشت. عوامل مختلفی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH موثر هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به زمان فرآیند، درجه هیدرولیز و عملکرد هر آنزیم بر تولید پپتیدهای فعال و رهایش اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدان لیپوفیل اشاره کرد. در مورد اثر زمان فرآیند و در نتیجه درجه هیدرولیز، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌گردد [9].همچنین، نتایج دیگری در خصوص افزایش مهار رادیکال DPPH در نتیجه افزایش غلظت و تاثیر نوع آنزیم در هیدرولیزشده‌های دانه کاملیا [21] و پروتئین ماش [22] گزارش شدند.

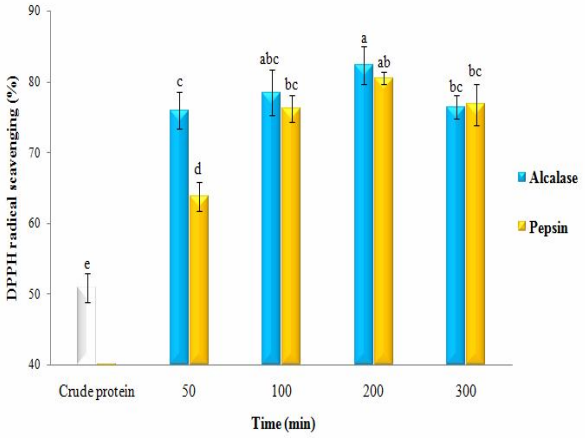

Fig 2 Effect of hydrolysis time and enzyme type on DPPH radical scavenging of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-2- مهار رادیکال ABTS

ارزیابی فعالیت مهاررادیکال کاتیونی ABTS با قابلیت استفاده در هر دو نوع ترکیبات هیدروفیل و لیپوفیل به‌طور گسترده به‌عنوان یک آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار می‌گیرد. نتایج این تحقیق نیز حاکی از تاثیر قابل ملاحظه نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر مقدار این شاخص بودند (شکل 3).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

بطور مثال، 300 دقیقه هیدرولیز آنزیمی پروتئین لوبیا با آلکالاز و پپسین منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال ABTS از حدود 36% به ترتیب به حدود 58% و 52% شد. در بین تیمارهای مختلف نیز نمونه هیدرولیزشده با آلکالاز از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بود (P<0/05).

با توجه به این‌که تفاوت کاملی از لحاظ نوع حلالیت بین رادیکال‌های DPPH (محلول در چربی) و ABTS (محلول در آب) وجود دارد؛ لذا نوع ترکیب اسیدآمینه‌ای بر مهار هر یک از این رادیکال‌ها موثر هستند. بنابراین علت این تغییرات را می‌توان به افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفوب و کاهش دسترسی آنتی‌اکسیدان‌های هیدروفیل برای واکنش با رادیکال ABTS نسبت داد [18].در تحقیق مشابهی، الاشی و همکاران [23] هیدرولیز پروتئین تفاله کانولارا انجام دادند. آن‌ها افزایش 6-4 برابری مهار رادیکال ABTS را پس از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کانولا گزارش کردند. در بین آنزیمهای مختلف، آلکالاز و کیموتریپسین فعالیت بیشتری در مهار رادیکال ABTS نسبت به پانکراتین، پپسین و تریپسین نشان دادند. آنها علت این یافته را به رهایش بیشتر ترکیبات آنتی‌اکسیدان واکنش‌پذیر با رادیکال‌های آزاد ABTS نسبت دادند [23].

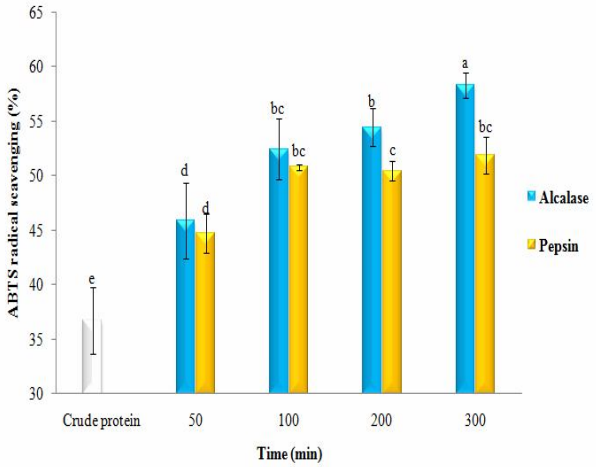

Fig 3 Effect of hydrolysis time and enzyme type on DPPH radical scavenging of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-3- قدرت احیاءکنندگی

یکی از مهمترین ویژگی‌هایآنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌های غذایی، احیاء کمپلکس فری‌سیانید (Fe^{3+}) به شکل فروس (Fe^{2+}) است [1]. قدرت احیاءکنندگی یکی از شاخص‌ها نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان است. شکل 4 تاثیر نوع آنزیم و زمان فرآیند بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین لوبیا سفید را نشان می‌دهد. همانطور که از این شکل مشخص است، مقدار این شاخص با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی افزایش یافت. بطور مثال، 300 دقیقه هیدرولیز با آلکالاز منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین از حدود 0,3 به 0,98 شد. همچنین مقدار این شاخص برای هیدرولیز شده با آلکالاز بیش از نمونه هیدرولیز شده با پپسین (0,83) بود.

افزایش قدرت احیاءکنندگی را میتوان به رهایش آمینواسیدهای آنتی‌اکسیدان آزاد (مانند تیروزین، تریپتوفان، هیستیدین، متیونین و لیزین) پس از هیدرولیز آنزیمی و افزایش غلظت آنها در فراکسیون‌های با وزن مولکولی پائین نسبت داد [7]. در پژوهش مشابهی، اثر هیدرولیز آنزیمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده تیان[1]بررسی گردید. بالاترین قدرت احیاءکنندگی (1,17) در نمونه‌های هیدرولیز شده با پانکراتین و با بالاترین درجه هیدرولیز (33%) مشاهده شد [18].

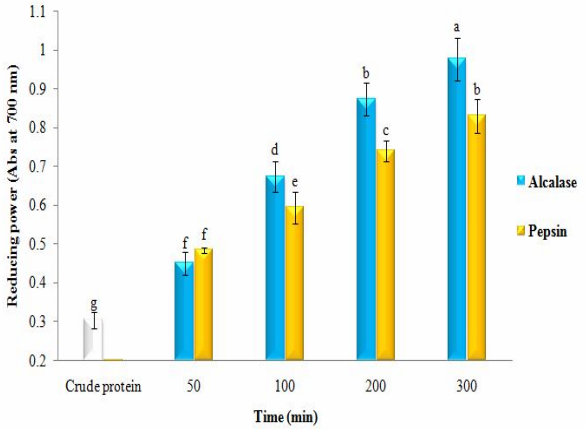

Fig 4 Effect of hydrolysis time and enzyme type on reducing power of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-4- مهار رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل، فعالترین رادیکال آزاد در سیستم بیولوژیکی (ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی از طریق واکنش با مولکول‌های زیستی مانند آمینواسیدها و DNA) و، اغازگر[2] پراکسیداسیون لیپیدهاست[1]. مقدار این شاخص نیز پس از هیدرولیز آنزیمی پروتئین لوبیا به شکل قابل توجهی بهبود

1. Loachprotein hydrolysates
2. initiator

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

یافت (شکل 5). در این تحقیق، افزایش زمان هیدرولیز تا 200 دقیقه منجر به افزایش مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین اولیه (29%) به حدود 57% (هیدرولیزشده با آلکالاز) و 54% (هیدرولیزشده با پپسین) شد. علت این یافته را میتوان به افزایش مقدار امینواسیدهای اروماتیک مانند هیستدین، تریپتوفان، فنیل آلانین و تیروزین در هیدرولیزشده‌ها نسبت داد. این آمینواسیدها با قابلیت الکترون‌دهندگی[1] و پروتون‌دهی منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به فرم پایدار می‌شوند [22]. علاوه بر ترکیب، مقدار آمینواسیدهای آزاد نیز در فعالیت آنتی-اکسیدانی پپتیدها نقش موثری ایفا می‌کنند. افزایش درجه هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی منجر به افزایش رهایش و مقدار آمینواسیدهای آزاد آروماتیک و آنتی‌اکسیدان در پپتیدها می‌شوند [6].

نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های یو و همکاران [18] است که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از 18 به 23%، مهار رادیکال هیدروکسیل از 45/5 به 65/1 درصد افزایش یافت، اما افزایش بیشتر درجه هیدرولیز از 23 به 33% موجب کاهش درصد فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل گردید[18].

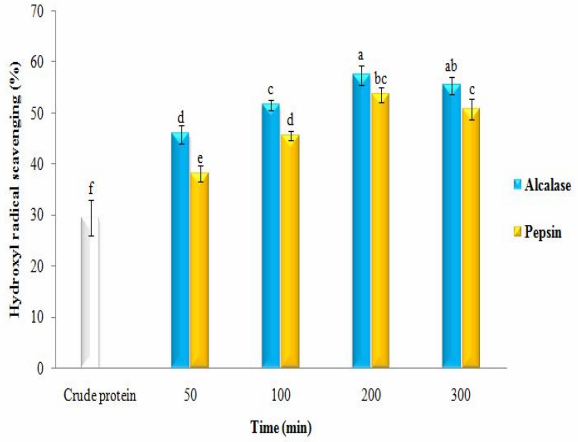

Fig. 5 Effect of hydrolysis time and enzyme type on hydroxyl radical scavenging of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-5- شلاته‌کنندگی یون آهن

آهن و دیگر فلزات به‌دلیل تسریع در روند شکست هیدروپروکسیدهای لیپیدی به رادیکال‌های آلکوکسیل بسیار واکنش‌پذیر به‌عنوان پروکسیدان در بسیاری از سیستم‌های غذایی عمل می‌کنند[24].نتایج این تحقیق حاکی از تاثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر تولید پپتیدهایی با قابلیت مهار یون آهن بودند (شکل 6). بدین شکل که فعالیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی آهن در پروتئین لوبیا پس از هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز و پپسین به ترتیب از حدود 20% به 54% و 39% پس از 300 دقیقه هیدرولیز افزایش یافت ($P<0/05$). در بین نمونه‌های مختلف، هیدرولیزشده‌های حاصل از فعالیت آنزیم آلکالاز از عملکرد بهتری در بهبود میزان این شاخص برخوردار بودند.

تفاوت در فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن را میتوان به تفاوت در عملکرد آنزیم‌ها در تولید پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی یا درجه هیدرولیز متفاوت نسبت داد. بطورمثال، فرآیند هیدرولیز آنزیمی با رهایش امینواسیدهای اسیدی و بازی و در نتیجه افزایش گروه‌های کربوکسیلیک و آمینو[2] موجب حذف[3] یون‌های فلزی از سیستم می‌شود. اگرچه، هیدرولیز آنزیمی از طریق افزایش حلالیت و واکنش‌پذیری پروتئین‌ها، در فعالیت آن‌ها را تحت تاثیر قرار می‌دهد [24].همچنین، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئین سیب زمینی (در غلظتهای 4-0,5 میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با آلکالاز بررسی شد و بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن (85%) در بالاترین غلظت هیدرولیزشده بدست آمد [25].

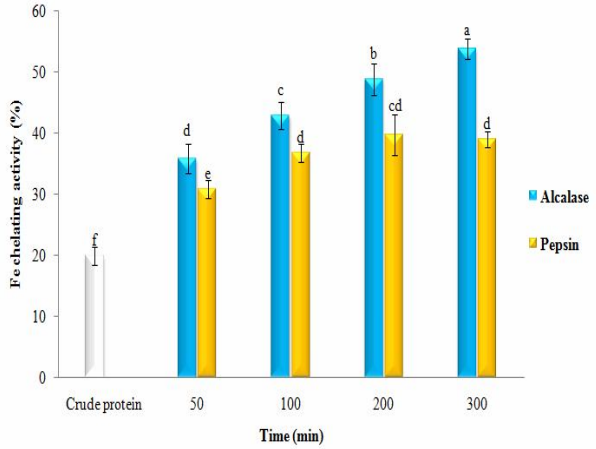

Fig. 6 Effect of hydrolysis time and enzyme type on Fe chelating activity of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-6- شلاته‌کنندگی یون مس

یون مس یکی دیگر از یون‌های فلزی است که نقش موثری در تشدید واکنشهای اکسیداتیو و تسریع در فساد محصولات

1. electron donating

2. carboxylic groups and amino groups
3. remove

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

غذایی به ویژه انواع با چربی بالا ایفا می‌کند. بنابراین استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان با فعالیت شلاته کنندگی میتواند نقش موثری در پیشگیری از تاثیرات مخرب این یون‌ها داشته باشند. در این تحقیق، شلاته‌کنندگی یون‌های مس تحت تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز قرار گرفت. با اینکه هیدرولیز آنزیمی منجر به بهبود این شاخص شد (شکل 7). اما هیدرولیز آنزیمی بیش از 200 دقیقه تاثیری بر مقدار این شاخص نشان نداد. همچنین مقدار این شاخص از حدود 3% برای پروتئین لوبیا به ترتیب به حدود 10% (هیدرولیز شده آلکالاز) و 12% (هیدرولیزشده با پپسین) در زمان 200 دقیقه افزایش یافت.

تفاوت در فعالیت شلاته‌کنندگی در بین هیدرولیزشده‌ها را میتوان به تفاوت ترکیب آمینواسیدی و درجه هیدرولیز پپتیدها نسبت داد. همچنین، تفاوت در قدرت شلاته‌کنندگی یون‌های آهن و مس را می‌توان به تفاوت در تعداد نواحی فعال[1] در شلاته کردن این یون‌های فلزی نسبت داد [21]. در تحقیق مشابهی، هیدرولیز آنزیمی پروتئین پلاسما موجب افزایش شلاته‌کنندگی یون مس از 15% به 44% شد [24]. گروه‌های ایمیدازول و کربوکسیل نیز موجب افزایش واکنش‌های الکترواستاتیک و یونی با یون‌های فلزی می‌شوند و از این طریق می‌توانند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در سیستم‌های امولسیونی و غذایی عمل کنند [7].

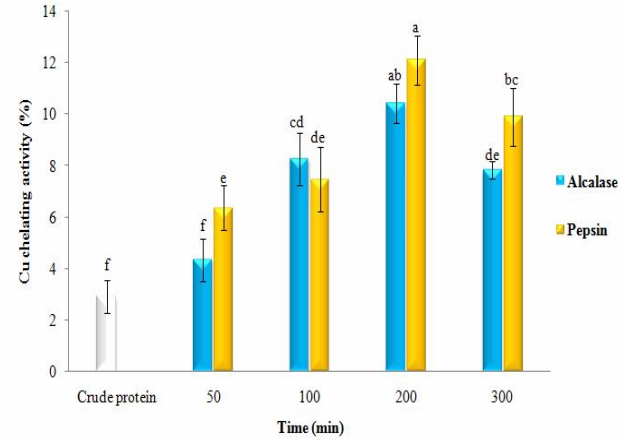

Fig 7 Effect of hydrolysis time and enzyme type on Cu chelating activity of navy bean protein. The values represents mean of three independent experiment ± S.D.

3-3-7- ویژگی‌های ساختاری (FTIR)

اسپکتروسکوپی FTIR روشی غیرمخرب و دقیق برای ارزیابی ترکیب شیمیایی، آرایش ساختاری و گروه‌های عاملی ترکیبات مختلف است. طیف‌های اصلی مربوط به پروتئین اولیه و پپتیدهای تولید شده با آلکالاز و پپسین عبارتند از (شکل 8): $3419\ cm^{-1}$ و 3415 (کشش N-H)، $2928\ cm^{-1}$ و $2926\ cm^{-1}$ (کشش O-H)، $1647\ cm^{-1}$ و 1639 (کشش C=O) مربوط به ناحیه آمید I، $1543\ cm^{-1}$ و 1539 مربوط به کشش N-H تغییرشکل C-N و در ارتعاشات آمید II، $1063\ cm^{-1}$ و 1052 (کشش C=O) و $617cm^{-1}$ و 621 (خمش N-H). فرکانس‌های مشابهی در پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی کازئین [6] و پروتئین و هیدرولیزشده کلاژن نوعیماهی [26] مشاهده شدند.

از نظر ارزیابی تغییرات در ساختارهای ثانویه پروتئین پس از هیدرولیز آنزیمی نیز نواحی آمیدی حائز اهمیت هستند. بررسی نواحی آمیدی 1 و 2 حاکی از بروز تغییرات در ساختار ثانویه پروتئین پس از هیدرولیز آنزیمی است. عمده این تغییرات به ساختارهای مارپیچ آلفا ($1650\text{-}1658\ cm^{-1}$) و رندوم کویل‌ها ($1640\text{-}1650\ cm^{-1}$) برمی‌گردد. همچنین تغییر و جابجایی در شدت پیکها پس از هیدرولیز قابل تشخیص است. کاهش شدت پیک در ناحیه $1539\text{-}1543cm^{-1}$ مربوط به (خمش N-H و کشش C-N در ناحیه آمید 2) در هیدرولیزشده‌ها بدلیل تغییرات در گروه‌های NH مدفون شده[2] درون نواحی هیدروفوب پروتئین‌هاست[27].

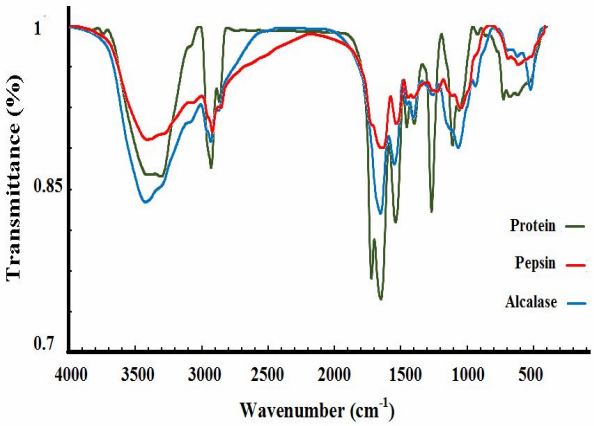

Fig 8 FTIR spectroscopy of navy bean protein and its hydrolysates.

4- نتیجه‌گیری کلی

نتایج حاصل از این مطالعه بیان کننده تاثیر و کارایی فرآیند هیدرولیز آنزیمی، زمان هیدرولیز و نوع آنزیم‌های پروتئاز بر

1. number of active sites

2. buried

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

ترکیب اسیدهای آمینه، درجه هیدرولیز، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و ساختاری بودند. عملکرد هر یک آنزیم‌ها متفاوت بوده و زمان فرآیند نیز تاثیر قابل توجهی دارد. افزایش زمان هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و در نتیجه کاهش وزن مولکولی پپتیدها و همچنین آزادسازی انواع اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدان و آبگریز نقش موثری در افزایش دسترسی ترکیبات زیست فعال نهفته درون ساختار اولیه پروتئین دارد. این تغییرات موجب افزایش واکنش پذیری پپتیدها با انواع رادیکال‌های آزاد و قدرت احیاءکنندگی بالاتر دارد. همچنین قابلیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی پراکسیدان پس از هیدرولیز آنزیمی به شکل قابل توجهی بهبود می‌یابد که این تغییرات بر افزایش نقش سلامتی بخش پروتئین لوبیا سفید پس از هیدرولیز آنزیمی دلالت دارند. در نهایت، بررسی ویژگی‌های ساختاری پروتئین پس از هیدرولیز آنزیمی بیان کننده تغییرات در ساختارهای ثانویه به ویژه در نواحی آمید A، و آمید 1 و 2 است.

5- منابع

[1] Shahidi, F., &Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, *18*, 757-781.

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

[3] McClements, D. J. (2015). Encapsulation, protection, and release of hydrophilic active components: Potential and limitations of colloidal delivery systems. *Advances in colloid and interface science*, *219*, 27-53.

[4] Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., &Shahidi, F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, *18*, 1125-1137.

[5] Maqsoudlou, A., Mahoonak, A. S., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., &Ghorbani, M. (2019). Peptide identification in alcalasehydrolysated pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*, *116*, 905-915.

[6] Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishekar, H., Ghorbani, M., &Jafari, S. M. (2018). Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of Food Engineering*, *237*, 86-95.

[7] Akbarbaglu, Z., Jafari, S. M., Sarabandi, K., Mohammadi, M., Heshmati, M. K., &Pezeshki, A. (2019). Influence of spray drying encapsulation on the retention of antioxidant properties and microstructure of flaxseed protein hydrolysates. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *178*, 421-429.

[8] Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (Vigna radiate). *Food chemistry*, *270*, 243-250.

[9] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry, 121(1), 178-184

[10] Torres, J., Rutherfurd, S. M., Muñoz, L. S., Peters, M., & Montoya, C. A. (2016). The impact of heating and soaking on the in vitro enzymatic hydrolysis of protein varies in different species of tropical legumes. *Food Chemistry*, *194*, 377-382.

[11] Wani, I. A., Sogi, D. S., Shivhare, U. S., & Gill, B. S. (2015). Physico-chemical and functional properties of native and hydrolyzed kidney bean (Phaseolus vulgaris L.) protein isolates. *Food Research International*, *76*, 11-18.

[12] Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F., &Varidi, M. J. (2015). Fenugreek (Trigonellafoenumgraecum) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *95*(15), 3165-3176.

[13] Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254

[14] Wu, H. C., Chen, H. M., &Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomberaustriasicus). Food research international, 36(9), 949-957

[15] You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., & Ren, J. (2010). Changes in the antioxidant activity of loach

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

[22] Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T., & Lin, L. (2019). Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (Vigna radiate). *Food chemistry*, *270*, 243-250.

[23] Alashi, A. M., Blanchard, C. L., Mailer, R. J., Agboola, S. O., Mawson, A. J., He, R., ... &Aluko, R. E. (2014). Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *146*, 500-50 .

[24] Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food chemistry*, *118*(2), 403-410.

[25] Zhang, M., Mu, T. H., & Sun, M. J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, *7*, 191-200.

[26] da Rosa Zavareze, E., Telles, A. C., El Halal, S. L. M., da Rocha, M., Colussi, R., de Assis, L. M., ... & Prentice-Hernández, C. (2014). Production and characterization of encapsulated antioxidative protein hydrolysates from Whitemouth croaker (Micropogoniasfurnieri) muscle and byproduct. *LWT-Food Science and Technology*, *59*(2), 841-848.

[27] Poulsen, N. A., Eskildsen, C. E., Akkerman, M., Johansen, L. B., Hansen, M. S., Hansen, P. W., ... & Larsen, L. B. (2016). Predicting hydrolysis of whey protein by mid-infrared spectroscopy. *International Dairy Journal*, *61*, 44-50.

(Misgurnusanguillicaudatus) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 120(3), 810-816

[16] Ahmadi, F., Kadivar, M., &Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of KelussiaodoratissimaMozaff. in model and food systems. Food chemistry, 105(1), 57-64

[17] Kong, B., &Xiong, Y. L. (2006). Antioxidant activity of zein hydrolysates in a liposome system and the possible mode of action. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(16), 6059-6068

[18] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnusanguillicaudatus) protein hydrolysates. *Innovative food science & emerging technologies*, *10*(2), 235-240.

[19] Udenigwe, C. C. (2014). Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science & Technology*, *36*(2), 137-143.

[20] Farvin, K. S., Andersen, L. L., Otte, J., Nielsen, H. H., Jessen, F., & Jacobsen, C. (2016). Antioxidant activity of cod (Gadusmorhua) protein hydrolysates: Fractionation and characterisation of peptide fractions. *Food Chemistry*, *204*, 409-419.

[21] Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. (2015). Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted Camellia oleifera seed cake. *Journal of food science and technology*, *52*(9), 5681-5690.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23]

Effect of time and enzyme type on the structural and antioxidant properties of bioactive peptides obtained from navy bean protein (*Phaseolusvulgari L.*)

Zeynali Namdar, N. [1], Roufegarinejad, L. [2*], Alizadeh, A. [3], Jafari, S. M. [3], Asefi, N. [2]

1. PhD, Department of Food Science and Technology, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
2. AssociatedProfessor, Department of Food Sciences, Tabriz branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.
3. Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 01/ 12
Accepted 2022/ 04/ 04

Keywords:

Enzymatic hydrolysis,
White bean,
Antioxidant activity,
Structural properties,
Amino acid composition.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.23
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.4.3

*Corresponding Author E-Mail:
l.roufegari@iaut.ac.ir

ABSTRACT

In this study, the effect of enzyme type (alcalase and pepsin) and process time (50-300 minutes) on the degree of hydrolysis and antioxidant indices including free radical scavenging of DPPH, ABTS, hydroxyl, reducing power, and chelating activity of Iron and copper ions were evaluated for navy bean protein(*Phaseolusvulgari L.*). Also, the composition of amino acids (hydrophobic and antioxidants types) and structural properties (FTIR) of primary protein and hydrolysates were investigated. The results showed that enzymatic hydrolysis improves antioxidant properties. Also, the composition of amino acids has a significant effect on antioxidant activities. On the other hand, the type of enzyme and the time of the hydrolysis process affected the degree of hydrolysis and the antioxidant activity of the hydrolysates. Thus, the highest percentage of free radicals scavenging of DPPH (82.4%), ABTS (58.3%), reducing power (0.97), hydroxyl radical scavenging (57.5%), and chelation of Fe (53.7%) and Cu ions (12.1%) were affected by the type of enzyme and process time.Among different treatments, the highest value of these indices (except copper ion chelating) was related to hydrolysates with alcalase. Structural properties of white bean protein were evaluated and enzymatic hydrolysis caused changes in the amide regions (I and II) as well as exposure to some hydrophobic-buried groups. The results of this study indicated the positive effect of enzymatic hydrolysis on the production of antioxidant hydrolysates that can be used in the food industry.