



ارزیابی خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی پروتئین جوانه کلم بروکلی هیدرولیز شده به روش هیدرولیز آنزیمی

امین جرجانی^۱، لیلا نجفیان*^۲، محمد فارسی^۳، سید احمد شهیدی^۴

- ۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی مواد غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
- ۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
- ۳- دانشیار گروه صنایع چوب و کاغذ، دانشکده صنایع چوب و کاغذ، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی، ساری، ایران
- ۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله امین، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

پپتیدهای زیست فعال جزء ترکیبات عملکردی محسوب می شوند که اخیراً در مواد غذایی شناخته شده اند. روش هیدرولیز آنزیمی به منظور بهبود ویژگی های عملکردی پروتئین های گیاهی مورد استفاده قرار گرفته است. هدف از این تحقیق هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه بروکلی و بررسی خصوصیات عملکردی و آنتی اکسیدانی هیدرولیزات های حاصله بود. برای این منظور از دو آنزیم های آلکالاز و فلاورزایم و زمان های مختلف هیدرولیز آنزیمی (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) استفاده گردید. نتایج نشان داد که هیدرولیزات های پروتئینی حاصله توسط آنزیم آلکالاز دارای طول زنجیره کوچکتر و مقادیر بالاتر اسیدهای آمینه هیدروفوب، درجه هیدرولیز آنزیمی، بازیافت پروتئینی، محتوای پروتئین هیدرولیز شده، حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت کف کنندگی، پایداری کف و فعالیت آنتی اکسیدانی در مقایسه با هیدرولیزات های تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند. افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، منجر به افزایش حلالیت و کاهش ظرفیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات های پروتئینی تولیدی گردید ($p < 0.05$). در کل، به دلیل فعالیت ضد اکسایشی پروتئین جوانه بروکلی و بهبود قابل توجه آن پس از فرایند هیدرولیز آنزیمی، به ویژه توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۹۰ دقیقه، هیدرولیزات های پروتئینی تهیه شده به عنوان آنتی اکسیدان های طبیعی جهت حفظ کیفیت و ایمنی محصولات غذایی پیشنهاد می گردند.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۱/۱۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۲/۲۸

کلمات کلیدی:

جوانه بروکلی،

هیدرولیز آنزیمی پروتئین،

فعالیت آنتی اکسیدانی،

ویژگی های عملکردی

DOI: 10.22034/FSCT.22.166.161.

* مسئول مکاتبات:

najafian_5828@yahoo.com

۱- مقدمه

پپتیدها و هیدرولیزهای پروتئین غذایی در دسته اجزای غذایی عمل گرا طبقه بندی می شوند که از آن ها می توان برای افزایش هلندگاری محصولات غذایی استفاده نمود [۱]. پپتیدهای زیست فعال دارای خصوصیات آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بوده و اثرات سلامت بخش نیز از خود نشان می دهند. فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای زیست فعال بستگی به فاکتورهای مختلفی نظیر طول زنجیره پپتیدی، حلالیت، ساختار و غیره دارد [۲]. یکی از متداول ترین روش ها برای تولید هیدرولیزهای پروتئینی غنی از پپتیدهای زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم های پروتئاز مختلف می باشد [۳]. در هیدرولیز آنزیمی، نوع آنزیم مورد استفاده اهمیت زیادی دارد، زیرا الگوهای شکست پیوندهای پپتیدی را تعیین می کند. آنزیم های آلکالاز و فلاورزایم جزو پرکاربردترین آنزیم های پروتولیتیک مورد استفاده برای تولید هیدرولیزهای پروتئینی می باشند زیرا پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی نشان دادند. [۴]. مزیت های هیدرولیزهای پروتئینی به عنوان نگه دارنده های طبیعی در مقایسه با نگه دارنده ها و آنتی اکسیدان های سنتزی، شامل مزایای سلامت بخش، نقش آن ها در کاهش بیماری ها، قیمت پایین تر تولید، هضم پذیری بالا، ایمنی، جذب آسان، آلرژی زایی پایین، پایداری بالاتر در شرایط مختلف، ارزش تغذیه ای بالا، حفظ فعالیت، خصوصیات عمل گرایی زیستی و غیره می باشد [۵]. ایزوله پروتئین های گیاهی و پروتئین هیدرولیز شده ی آن در فرمولاسیون گوشت، سوپ، محصولات لبنی و نانوائی مورد استفاده قرار می گیرند. بخش قابل توجهی از ویژگی های عملکردی مواد غذایی مربوط به پروتئین ها می باشد [۶]. هرگونه تغییر در آرایش ساختمانی پروتئین ها سبب تغییر در ویژگی های عملکردی پروتئین نیز می گردد [۷].

حلالیت یکی از مهم ترین و به طور کلی اولین ویژگی عملکردی است که در حین تولید اجزای پروتئینی جدید مورد بررسی قرار می گیرد زیرا دارای اثر قابل

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

شرایط قبل انجام گرفت و رسوب حاصله که همان کنسانتره پروتئین جوانه بروکلی است، توسط آون تحت خلاء (در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد) خشک گردید و پودر حاصله تا استفاده بعدی در فریزر نگهداری شد [۱۲].

۲-۲-۳- هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه بروکلی

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی گراد به منظور غیر فعال سازی آنزیم های داخلی قرار داده شد [۱۳]. در ادامه با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم ها (آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد در جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و پس از هر بار نمونه گیری (زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۹۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شد. پروتئین های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی به صورت پودر درآمد [۱۴].

۳-۲-۴- اندازه گیری درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز پروتئین جوانه بروکلی از طریق مخلوط کردن هیدرولیزات (۱ میلی لیتر) با تری کلرواستیک اسید ۰/۴۴ مولار (۱ میلی لیتر)، سانتریفیوژ کردن در دمای ۴ درجه سانتی گراد و $g \times 7800$ به مدت ۱۰ دقیقه تعیین شد.

دانه های بروکلی از فروشگاه محلی خریداری شد. آنزیم آلکالاز استخراج شده از *Bacillus licheniformis*^۱ و آنزیم فلاورزایم استخراج شده از *Aspergillus oryzae*^۲ از شرکت نووزایم دانمارک تهیه شدند. اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، اتانول، و دی هیدروژن پتاسیم فسفات از شرکت تیتراکم تهیه شدند. تمامی مواد دارای درجه ی آزمایشگاهی بودند.

۲-۲-۲- تهیه هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی

۲-۲-۲-۱- جوانه زنی دانه های بروکلی

استریل کردن دانه ها توسط غوطه ور کردن آن ها در ۵ g/L اتانول ۷۰ درصد به مدت ۶۰ ثانیه و سپس غوطه ور کردن به مدت ۱۵ دقیقه در محلول هیپوکلریت سدیم (۱/۵ درصد) انجام گرفت. دانه های استریل شده در نسبت ۱۰:۱ در آب در دمای اتاق به مدت ۱۲ ساعت (در تاریکی و به طور وارونه) خیسانده شدند. جوانه زنی دانه ها به مدت ۵ روز انجام گرفت و جوانه های حاصله پس از شستشو با آب دیونیزه، در آون به مدت یک شبانه روز در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد خشک شدند [۱۱].

۲-۲-۲-۲- استخراج پروتئین جوانه بروکلی

ابتدا پودر جوانه بروکلی به روش استخراج گرم با سوکسله و توسط حلال هگزان نرمال (نسبت حلال به پودر ۴ به ۱) به مدت ۹ ساعت چربی گیری شد. سپس جوانه بدون چربی در نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط گردید و مخلوط با استفاده از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به صورت قلیایی در آمده و pH آن به ۱۰ رسید. پس از همزدن به مدت یک ساعت در دمای اتاق، سانتریفیوژ در دمای ۴ درجه سانتی گراد و ۹۰۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. پس از جداسازی فاز جامد زیرین، به منظور رسوب دادن پروتئین های جوانه بروکلی، pH فاز مایع روبی توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۵ رسید و مجدداً سانتریفیوژ تحت

محتوای پروتئین محلول سوپرناتانت با استفاده از روش بردفورد اندازه‌گیری شده و از طریق رابطه ۱، درجه هیدرولیز پروتئین به دست آمد [۱۵]:

رابطه ۱:

$$100 \times \frac{\text{هیدرولیزات پروتئین محلول-TCA}}{\text{پروتئین کل سوسپانسیون اولیه}} = \text{درجه هیدرولیز (\%)}$$

۴-۲-۳- اندازه گیری میزان پروتئین هیدرولیز شده

جوانه بروکلی

بر اساس روش کلدال نمونه‌ها هضم شده و سپس با تیتراسیون مقدار (N×۶/۲۵) مقدار کل پروتئین رسوبی در فاز آبی محاسبه شد [۱۶].

۵-۲-۳- بررسی پروفایل اسیدهای آمینه

پروفایل اسیدهای آمینه هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و فاز معکوس (RP-HPLC) مجهز به آشکارساز فلورسنس و ستون RP-C18 با ابعاد $4/6 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$ و 150 mm بررسی شد. از بافر استات (۵۰ mM) دارای pH=۳/۴ و سرعت جریان $1/3 \text{ mL/min}$ به عنوان فاز متحرک استفاده گردید. در ابتدا تیمار هیدرولیزات‌های پروتئینی با هیدروکلریک اسید ۶ مولار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت و سپس نمونه تیمار شده با اورتوفتالالدید^۳ مشتق شده و به ستون RP-HPLC تزریق شد. مقادیر اسیدهای آمینه موجود در هیدرولیزات‌های پروتئینی به صورت $\text{mg}/100\text{g protein}$ گزارش گردید [۱۷].

۳-۲- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

۱-۳-۲- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی به روش DPPH

برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی به روش مهار رادیکال DPPH، هیدرولیز پروتئینی (۱ میلی‌لیتر) با محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار (۱ میلی‌لیتر) مخلوط شده و پس از انکوباسیون در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه، جذب آن در ۵۱۷ نانومتر ثبت گردید. درصد مهار رادیکال DPPH در نهایت از طریق رابطه ۲ به دست آمد [۱۷].

رابطه ۲:

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} = (\%) \text{ مهار رادیکال DPPH}$$

۲-۳-۲- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی به روش FRAP

برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات‌ها به روش قدرت احیاکنندگی آهن یا FRAP، ابتدا ۰/۵ میلی‌لیتر هیدرولیزات (با غلظت 40 mg/mL) با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار بافر فسفات (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم فری‌سیانید (۱ درصد وزنی/وزنی) مخلوط شد و محلول حاصله در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداشته شد و سپس به آن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید (۱۰ درصد) اضافه گردید. پس از آن، سانتریفیوژ کردن محلول در 3000 rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام گرفت و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت با ۲/۵ میلی‌لیتر کلریدفریک (۰/۱ درصد) و ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه نگهداشته شد و در نهایت جذب آن توسط اسپکتروفتومتر در طول موج 700 nm ثبت گردید [۱۸].

۴-۲- بررسی خواص عملکردی

۱-۴-۲- اندازه‌گیری حلالیت در آب

برای بررسی میزان حلالیت هیدرولیزات‌های پروتئینی در آب، ۲۰۰ میلی‌گرم هیدرولیزات پروتئینی با ۲۰ میلی‌لیتر آب

رقیق‌سازی ۱۰۰، Δt : ۱۰ دقیقه و ΔA : تفاضل بین جذب دو زمان صفر و ۱۰ دقیقه می‌باشد [۲۰].

رابطه ۴:

$$EAI (m^2/g) = \frac{(2)(2.303)(A_0)(\text{dilution factor})}{(0.17)(\text{protein concentration})(10000)}$$

رابطه ۵:

$$ESI (min) = A_0 \times \frac{\Delta t}{\Delta A}$$

۳-۴-۲- اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف‌کنندگی، ۲۰ میلی‌لیتر محلول‌های پروتئینی در استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با التراتورکس با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ هم‌زده شد. حجم مخلوط نهایی بر حسب میلی‌لیتر ثبت گردید. در نهایت با استفاده از روابط ۶ و ۷، به ترتیب ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئینی به دست آمد [۲۱].

رابطه ۶:

$$100 \times \frac{\text{حجم کف فوراً پس از همزدن}}{\text{حجم نمونه قبل تشکیل کف}} = \text{ظرفیت کف‌کنندگی (\%)}$$

رابطه ۷:

$$100 \times \frac{\text{حجم کف 20 دقیقه پس از همزدن}}{\text{حجم کف فوراً پس از همزدن}} = \text{پایداری کف (\%)}$$

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات حاصل از آزمایش از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. کلیه آزمایشات با ۳ بار تکرار انجام گرفتند و از نرم افزار SPSS 22.0 و تجزیه واریانس ANOVA برای تجزیه و تحلیل آماری داده‌های حاصله از آزمایشات استفاده شد. بیان اختلافات آماری معنی‌دار بین تیمارها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد انجام

مقطر در دمای محیط مخلوط شد و سپس توسط اسید هیدروکلریک یا هیدروکسید سدیم (۱ نرمال)، pH روی ۱، ۳، ۵، ۷، ۹ و ۱۱ تنظیم شد. مخلوط در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه بهم‌زده شد، سپس با سانتریفوژ با دور $10000 \times g$ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن دو فاز تشکیل شد و میزان پروتئین سوپرناتانت از طریق روش بیورت (۱۹۷۶) تعیین گردید و میزان پروتئین کل نمونه به روش کلدال تعیین گردید، میزان حلالیت بر حسب درصد براساس رابطه ۳ به دست آمد، سپس نمودار حلالیت در مقابل pH های مختلف رسم گردید. pH ای که پایین‌ترین میزان حلالیت را در نمودار نشان داد، به عنوان نقطه ایزوالکتریک در نظر گرفته شد [۱۹].

رابطه ۳:

$$100 \times \frac{\text{محتوای پروتئین در سوپرناتانت}}{\text{محتوای کل پروتئین نمونه}} = \text{حلالیت (\%)}$$

۲-۴-۲- اندازه‌گیری ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری

امولسیون

برای بررسی ظرفیت امولسیون‌کنندگی هیدرولیزات‌ها، به ۱۰ میلی‌لیتر محلول هیدرولیزات پروتئینی ۱ درصد دارای pH=۷، روغن سویا اضافه شد و مخلوط به مدت ۲ دقیقه در rpm ۱۰۰۰۰ هموژ گردید. سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه امولسیون در زمان‌های صفر و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از انتهای ظرف برداشته شده و به آن ۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دودسیل سولفات^۴ (۰/۱ درصد) اضافه گردید. در نهایت با استفاده از اسپکتروفتومتر، جذب محلول‌ها در ۵۰۰ nm ثبت گردید و ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون نمونه‌ها به ترتیب توسط روابط ۴ و ۵ به دست آمد، که در این رابطه: A_0 جذب امولسیون فوراً پی از هموژنیزاسیون، فاکتور

4 Sodium dodecyl sulphate (SDS)

گرفت. نتایج نهایی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار گزارش شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه هیدرولیز هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی

درجه هیدرولیز پارامتری مهم است که میزان هیدرولیز پروتئین را نشان داده و از آن می‌توان برای ارزیابی فعالیت‌های بیولوژیکی و خصوصیات عملگرایی هیدرولیزات‌های پروتئینی استفاده نمود [۱۹]. میانگین مقادیر درجه هیدرولیز هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی در شکل ۱ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی‌داری دارای درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، درجه هیدرولیز به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). به‌طور کلی، بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به هیدرولیز تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه بود (۱۳/۲۴ درصد) و کمترین میزان آن در هیدرولیز تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم و زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به دست آمد (۵/۹۶).

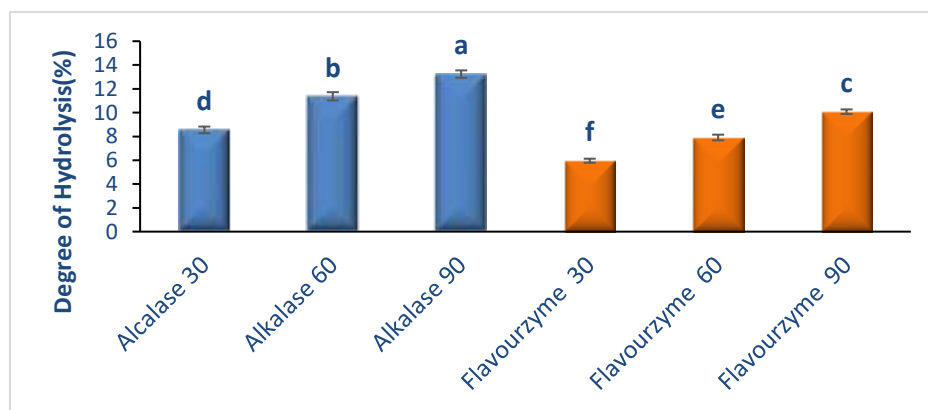


Fig 1. Comparison of degree of hydrolysis of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

هیدرولیز شده مربوط به هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه بود (۹۱/۴۴ درصد). در تحقیق قنبرنیا و همکاران (۲۰۲۲) نیز بازده پروتئینی هیدرولیزهای پروتئینی کنجد تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از آنزیم فلاورزایم بوده و با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی نیز میزان بازده پروتئینی به طور معنی داری افزایش یافت [۲۴]. نعمتی و همکاران (۱۳۹۸)، افزایش میزان بازیافت پروتئینی هیدرولیزهای پروتئینی ضایعات ماهی تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز در اثر افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی را گزارش کردند [۲۵]. تأثیر افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی بر افزایش بازیافت پروتئینی، در تحقیق اویسی پور و همکاران (۲۰۱۲) و رفعتی و رومیانی (۲۰۱۸) نیز مشاهده شده است [۲۶، ۲۷].

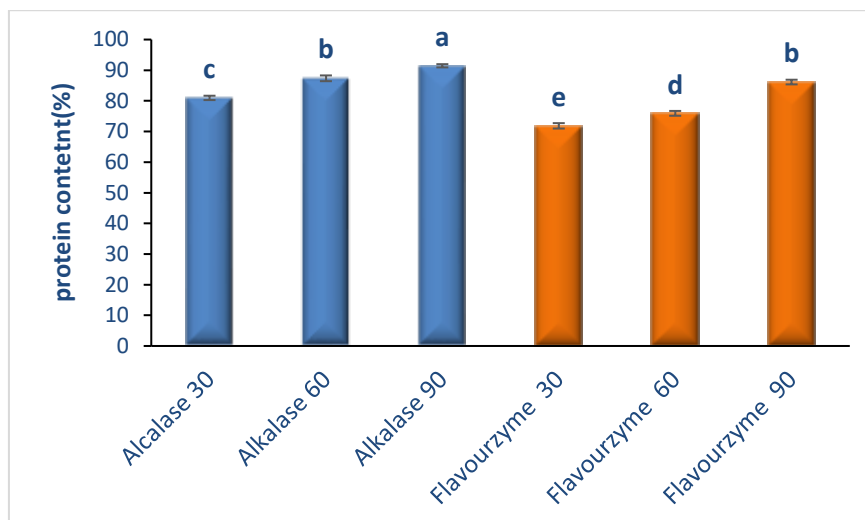


Fig 2. Comparison of protein content of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

زیادی وابسته به پروفایل اسیدهای آمینه آن‌ها دارد [۲۸]. پروفایل اسیدهای آمینه هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی در جدول ۱ آورده شده است و نشان می‌دهد که گلوتامین و به دنبال آن لوسین، اسیدهای آمینه غالب هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی بودند. نوع آنزیم مورد استفاده برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه بروکلی و زمان هیدرولیز آنزیمی بر پروفایل اسید آمینه هیدرولیزهای

۳-۲- محتوای پروتئین هیدرولیز شده‌ی هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی

میانگین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده‌ی هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی در شکل ۲ نشان داده شد. نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری دارای محتوای پروتئین هیدرولیز شده‌ی بالاتری نسبت به هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، محتوای پروتئین هیدرولیز شده به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). به طور کلی، بیشترین میزان پروتئین

۳-۳- پروفایل اسیدهای آمینه هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی

ترکیب اسیدهای آمینه هیدرولیزات‌های پروتئینی حائز اهمیت است، چرا که اسیدهای آمینه از ارزش تغذیه‌ای بالایی برخوردار بوده و ترکیب اسیدهای آمینه بر خصوصیات عملکردی هیدرولیزات‌ها نیز تأثیر دارد. فعالیت‌های فیزیولوژیکی هیدرولیزات‌های پروتئینی به طور

ضروری به غیرضروری و نسبت اسیدهای آمینه ضروری به مجموع اسیدهای آمینه به تدریج افزایش یافت ($p < 0.05$) و این نسبت‌ها در هیدرولیزهای تهیه شده با آنزیم آلکالاز بالاتر از انواع تهیه شده با آنزیم فلاورزایم بود. اسیدهای آمینه، ایزولوسین، والین، لوسین، هیستیدین، فنیل آلانین، تیروزین، پرولین و تریپتوفان، اسیدهای آمینه هیدروفوب و آروماتیک هستند که میزان آن‌ها در هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به طور قابل توجهی بالاتر از انواع تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بود، که این مشاهدات، خود دلیلی واضح برای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر هیدرولیزات‌های تولیدی توسط آنزیم آلکالاز می‌باشد. به دلیل آب‌گریزتر بودن این اسیدهای آمینه. قابلیت خوبی در اتصال به رادیکال‌های آب‌گریز نظیر رادیکال DPPH دارند و بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند [۳۰].

تولیدی تأثیر داشت. مقادیر اسیدهای آمینه آروماتیک و هیدروفوب هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز شامل هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، والین، فنیل آلانین، تیروزین و پرولین بالاتر از هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بود و با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی در هر دو آنزیم پروتئاز، افزایش در میزان این اسیدهای آمینه هیدروفوب مشاهده گردید ($p < 0.05$). مجموع کل این اسیدهای آمینه در هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب در محدوده $mg/100g$ ۲۵/۳۱-۶۶/۹۴ و $mg/100g$ ۳۴/۳۹-۴۹/۲۳ مقادیر اسیدهای آمینه ضروری هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از انواع تهیه شده با آنزیم فلاورزایم بود، ولی مقادیر اسیدهای آمینه غیرضروری کمتری داشتند. با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی افزایش در محتوای اسیدهای آمینه ضروری مشاهده شد. با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی همچنین نسبت اسیدهای آمینه

Table 1. Amino acid composition of the of broccoli sprout

Treatments	Flavourzyme 90	Flavourzyme 60	Flavourzyme 30	Alcalase 90	Alcalase 60	Alcalase 30
Asparagine	^b 0/04±10.41	^b 0.06 ±10.43	^a 0.07 ± 10.59	^d 0.09± 4.93	^d 0.02 ± 5.01	^c 0.06 ± 5.67
Serine	^d 0.07 ±4.43	^{abc} 0.12 ±4.65	^{bcd} 0.06 ± 4.53	^{cd} 0.03 ± 4.50	^{ab} 0.11 ± 6.69	^a 0.05 ± 4.73
Gluramine	^d 0.03±23.61	^c 0.07 ±22.72	^f 0.07 ± 21.20	^b 0.08± 24.72	^c 0.05 ± 24.31	^a 0.10 ± 24.92
Glycine	^c 0.04 ±2.86	^c 0.04 ±2.92	^d 0.10 ± 2.64	^b 0.01 ± 3.15	^a 0.05 ± 3.68	^d 0.11 ± 2.54
Histidine ^{ab}	^c 0.01 ±2.67	^d 0.05 ±2.46	^c 0.08 ± 2.11	^a 0.11 ± 3.40	^a 0.13 ± 3.38	^b 0.07 ± 3.09
Arginine ^a	^b 0.04 ±6.98	^b 0.04 ±3.99	^c 0.07 ± 5.83	^c 0.02 ± 6.71	^d 0.04 ± 6.32	^a 0.13 ± 7.95
Threonine ^a	^d 0.09 ±3.12	^{de} 0.03 ±3.02	^a 0.05 ± 3.77	^c 0.02 ± 3.28	^b 0.01 ± 3.42	^c 0.05 ± 2.96
Proline ^{ab}	^a 0.09 ±2.47	^b 0.09 ±1.86	^c 0.05 ± 1.70	^a 0.09 ± 2.64	^b 0.07 ± 2.02	^c 0.09 ± 1.57
Alanine	^c 0.03 ±6.58	^b 0.07 ±7.37	^c 0.03 ± 6.55	^d 0.05 ± 6.31	^b 0.09 ± 7.06	^a 0.08 ±8.50
Systeine	^c 0.02 ±1.43	^c 0.07 ±1.46	^b 0.09 ± 1.67	^a 0.09 ± 1.93	^b 0.03 ± 1.71	^a 0.14 ± 2.04
Tyrosine ^{ab}	^c 0.04 ±3.26	^d 0.06 ±3.02	^c 0.08 ± 2.16	^b 0.10 ± 3.87	^a 0.08 ± 4.09	^a 0.03 ± 4.03
Valine ^{ab}	^b 0.05 ±4.03	^b 0.02 ±4.02	^c 0.02 ± 3.85	^a 0.04 ± 2.24	^a 0.04 ± 4.30	^{bc} 0.09 ± 3.96
Methionine ^a	^b 0.08 ±2.42	^b 0.10 ±2.42	^c 0.04 ± 2.26	^c 0.07 ± 1.03	^d 0.11 ± 1.72	^a 0.02 ± 3.28
Lysine ^a	^a 0.11 ±4.70	^b 0.06 ±3.49	^b 0.08 ± 3.36	^c 0.06 ± 2.76	^d 0.08 ± 1.97	^c 0.05 ± 1.65
Isoleucine ^{ab}	^c 0.04 ±4.35	^c 0.07 ±3.99	^d 0.05 ± 3.14	^a 0.07 ± 5.47	^a 0.12 ± 5.39	^b 0.04 ± 4.83
Leucine ^{ab}	^d 0.09±10.60	^c 0.02 ±10.18	^f 0.06 ± 9.18	^a 0.11 ± 12.73	^b 0.08± 12.00	^c 0.07 ± 10.92
Phenilalanine ^{ab}	^d 0.08 ±4.56	^c 0.06 ±4.36	^f 0.12 ± 3.52	^a 0.01 ± 7.06	^b 0.03 ± 6.79	^c 0.01 ± 6.09
Total	^a 0.28± 98.48	^c 0.19± 95.35	^d 0.33 ± 88.06	^a 0.41 ± 98.55	^b 0.21± 97.86	^a 0.25 ± 98.73
Hydrophobice	^d 0.23± 31.94	^c 0.17 ± 29.89	^f 0.24 ± 25.66	^a 0.19 ± 39.23	^b 0.35± 37.97	^c 0.20 ± 34.49
E AA ^a	^c 0.15± 46.69	^d 0.21± 43.98	^c 0.18 ± 39.18	^a 0.10 ± 50.55	^b 0.16± 49.38	^b 0.13 ± 49.16
NEAA ^c	^a 0.21± 51.79	^b 0.14± 51.40	^d 0.15 ± 48.88	^f 0.17 ± 48.00	^c 0.11 ± 48.48	^c 0.025 ± 49.57
EAA/NEAA	^c 0.04 ± 0.90	^c 0.03 ± 0.86	^d 0.02 ± 0.80	^a 0.03 ±1.05	^{ab} 0.05 ± 1.02	^b 0.02 ± 0.99
EAA/Total (%)	^d 0.11 ± 47.41	^c 0.18± 46.09	^f 0.05 ± 44.49	^a 0.09 ± 51.29	^b 0.14± 50.45	^c 0.07 ± 49.79

protein hydrolysates (g/100g protein)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

^a Essential Amino Acids (EAA)

^b hydrophobic amino acids

^c Non Essential Amino Acid (NEAA)

هیدرولیز تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه بود (۷۳/۹۸ درصد) و کمترین میزان آن در هیدرولیز تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم و زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به دست آمد (۴۲/۲۰ درصد). بالاتر بودن فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز در روش مهار رادیکال DPPH احتمالاً در ارتباط با آب‌گریزتر بودن آن می‌باشد. زیرا تحقیقات نشان داده است که هیدرولیزهای تولیدی توسط آلکالاز هیدروفوب بوده و قابلیت اتصال به رادیکال‌های آب‌گریز DPPH را دارا هستند [۳۰]. در تحقیق ژنگ و همکاران (۲۰۱۹) هیدرولیزهای پروتئینی لوبیای سیاه تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز، بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH را در زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه نشان دادند. این محققین اظهار داشتند که شرایط استخراج و نوع آنزیم به کار رفته، تأثیر قابل توجهی بر فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی دارد [۲۳]. اکسو و همکاران (۲۰۲۰) رابطه مستقیم بین درجه هیدرولیز و فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیزهای پروتئینی نخود را گزارش کردند [۲۰]. رحیمی‌پناه و همکاران (۲۰۲۳) نشان دادند که افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی تا ۱۳۶ دقیقه موجب افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیزات پروتئین هسته انار گردید که افزایش بیشتر زمان هیدرولیز موجب کاهش فعالیت مهارکنندگی رادیکال گردید [۳۱].

۳-۴- فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی جوانه بروکلی

۳-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH به روش گسترده برای بررسی توانایی ترکیبات برای عمل به عنوان اهداکننده هیدروژن یا حذف رادیکال‌های آزاد بوده و پتانسیل آنتی اکسیدانی ترکیبات را نشان می‌دهد. وجود یک ماده دهنده پروتون به عنوان یک آنتی اکسیدان منجر به مهار رادیکال‌ها می‌گردد [۲۹]. میانگین مقادیر درصد مهار رادیکال DPPH هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی در شکل ۳ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین خام اولیه دارای کمترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بود (۱۰/۲۸ درصد) و فرایند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش معنی‌دار فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین جوانه بروکلی گردید ($p < 0.05$). هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی‌داری دارای درصد مهار رادیکال DPPH بالاتری نسبت به هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، درصد مهار رادیکال DPPH به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$). به‌طور کلی، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به

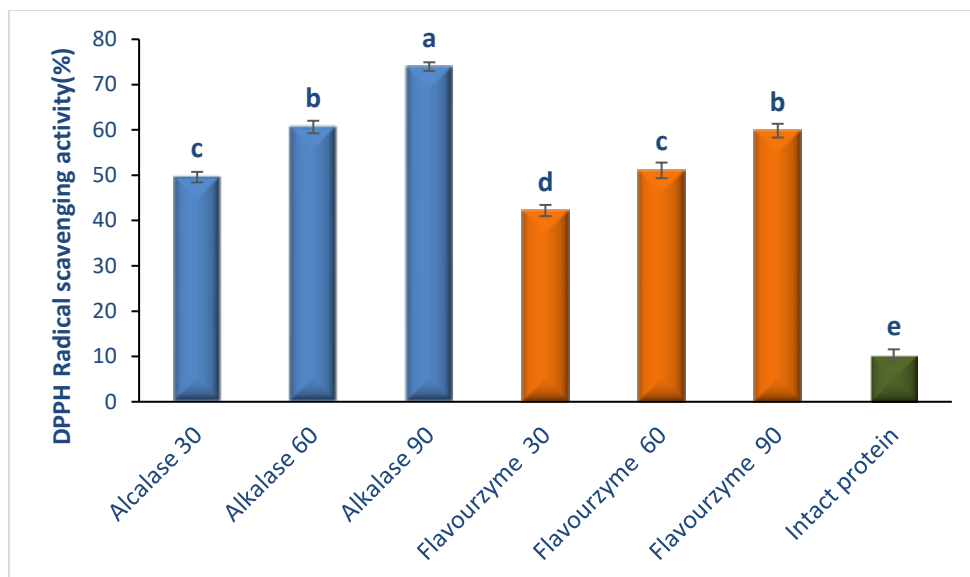


Fig 3. DPPH radical scavenging activity broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

FRAP به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). به طور کلی، بیشترین میزان FRAP مربوط به هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه بود (۰/۳۹۴) و کمترین میزان آن در هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم و زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به دست آمد (۰/۱۶۵). درجه هیدرولیز، کاهش در وزن مولکولی، وضعیت گروه‌های هیدروفوب و تعداد گروه‌های قابل یونیزه شدن، برخی از فاکتورهایی هستند که بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی تأثیر دارند [۳۲]. نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی در روش‌های مهار رادیکال DPPH و FRAP نشان داد که فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب بهبود قابل توجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین جوانه بروکلی گردید.

۲-۴-۳- ظرفیت احیاکنندگی آهن (FRAP)

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که تیمارهای مورد بررسی از لحاظ آماری تأثیر معنی داری بر میزان FRAP هیدرولیزهای پروتئین جوانه بروکلی داشتند ($p < 0.05$). میانگین مقادیر FRAP هیدرولیزات‌های پروتئین جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی در شکل ۴ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین خام اولیه دارای کمترین میزان FRAP بود (۰/۰۶۴) و فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش ظرفیت احیاکنندگی آهن پروتئین جوانه بروکلی گردید ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، میزان

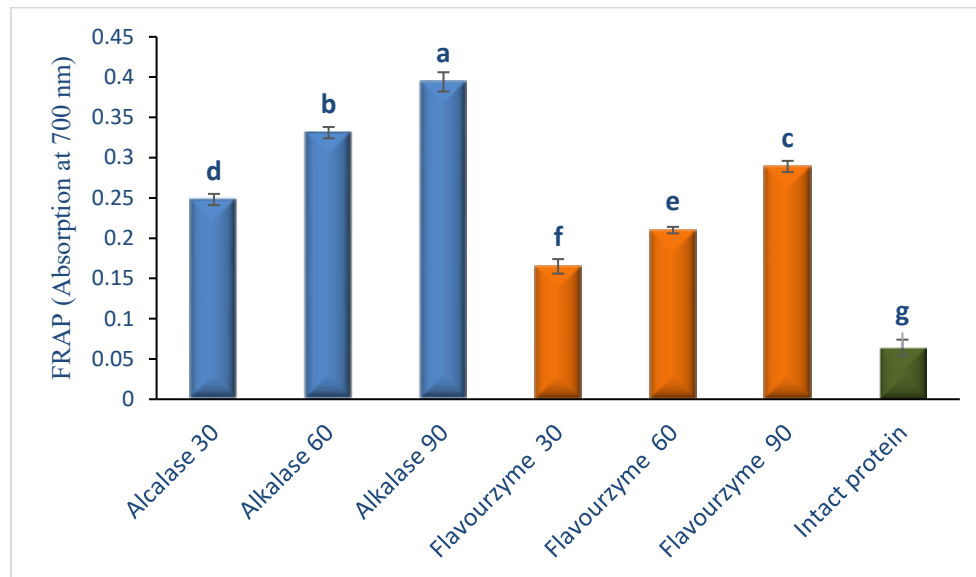


Fig 4. DPPH radical scavenging activity broccoli sprout protein hydrolysates (%)

*Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

۳-۵- خواص عملکردی هیدرولیزهای پروتئین جوانه بروکلی

۳-۵-۱- حلالیت

آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، درصد حلالیت هیدرولیزها به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$). با افزایش مقادیر pH در ابتدا میزان حلالیت پروتئین اولیه و هیدرولیزاتهای پروتئینی کاهش یافت و سپس افزایش پیدا کرد ($p < 0.05$). کمترین میزان حلالیت مربوط به $pH = 5$ بود که نقطه ایزوالکتریک پروتئین جوله بروکلی را نشان می دهد. این مشاهدات به درجه هیدرولیز بالاتر هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و تولید پپتیدهای کوتاه زنجیرتر با حلالیت بالاتر مربوط می باشد. با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی نیز در اثر افزایش درجه هیدرولیز، افزایش در حلالیت پذیری هیدرولیزاتهای پروتئینی مشاهده گردید. به طوری که این محققین، تأثیر افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی بر افزایش درجه هیدرولیز و حلالیت پذیری هیدرولیزهای پروتئینهای شیر را مشاهده کردند و دریافتند که آنزیم آلکالاز دارای درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیمهای فلاورزایم و پروتامکس بوده و هیدرولیزهای تهیه شده با آن حلالیت پذیری بالاتری نیز نشان دادند. این نتایج با یافته های نجفیان (۲۰۲۲) نیز مطابقت داشت و این محققین نیز رابطه مثبت بین درجه هیدرولیز و حلالیت پذیری هیدرولیزاتهای

حلالیت پروتئین یک خصوصیات عملکردی مهم و حیاتی برای کاربردهای غذایی است. این خصوصیات بر سایر مشخصات عملکردی پروتئین ها نظیر خصوصیات کف کنندگی و امولسیفیری نیز تأثیر دارد [۳۳]. میانگین مقادیر حلالیت هیدرولیزهای پروتئین جوانه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم های پروتئاز و زمان های مختلف هیدرولیز آنزیمی در pH های مختلف در شکل ۵ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می دهد که پروتئین خام اولیه در تمامی pH ای مورد بررسی دارای کمترین میزان حلالیت بود و فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش درصد حلالیت پروتئین جوانه بروکلی گردید ($p < 0.05$). هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز در pH های مختلف به طور معنی داری دارای حلالیت بالاتری نسبت به هیدرولیزاتهای تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز

نشان دادند که با افزایش درجه هیدرولیز آنزیمی، درصد حلالیت هیدرولیزات‌های پروتئینی افزایش یافت که با نتایج پژوهش همخوانی داشت [۲۱].

پروتئینی را گزارش نمود [۳۴]. بالاتر بودن حلالیت هیدرولیزات‌های پروتئین نخود تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز در مقایسه با آنزیم فلاورزایم نیز در تحقیق شوایی و همکاران (۲۰۲۲) نیز مشاهده گردید و این محققین همچنین

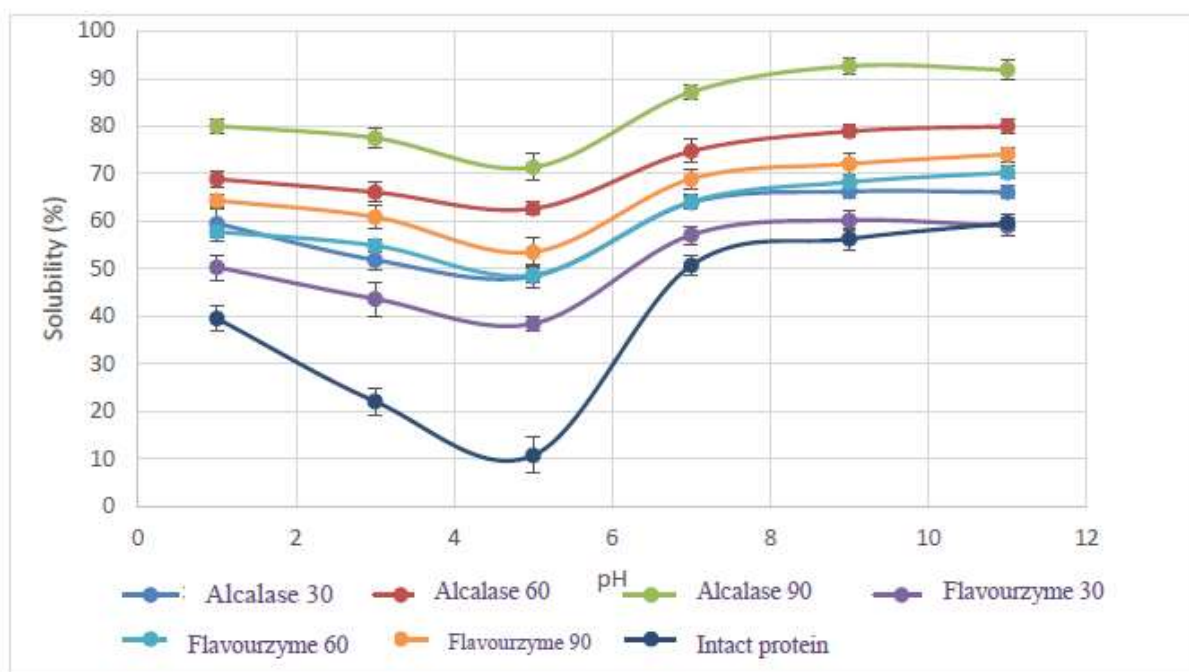


Fig 5. Comparison of solubility of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

آنزیم آلکالاز به‌طور معنی‌داری دارای ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون بالاتری نسبت به هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون هیدرولیزات‌های پروتئینی به تدریج کاهش یافت ($p < 0.05$). این کاهش احتمالاً در ارتباط با تولید پپتیدهای با طول زنجیره کوتاه‌تر می‌باشد که قابلیت کمتری در کاهش تنش سطحی دارند [۳۵]. به طور کلی در بین هیدرولیزهای پروتئینی، بیشترین ظرفیت امولسیون‌کنندگی ($194/23 \text{ m}^2/\text{g}$) و پایداری امولسیون ($50/81$ درصد) مربوط به هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بود و کمترین میزان این خصوصیات در هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به دست آمد (به

۲-۵-۳- ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که تیمارهای مورد بررسی از لحاظ آماری تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون هیدرولیزات‌های پروتئین جوله بروکلی داشتند ($p < 0.05$). میانگین مقادیر ظرفیت امولسیون‌کنندگی و پایداری امولسیون هیدرولیزات‌های پروتئین جوله بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی به ترتیب در شکل ۶ و ۷ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین خام اولیه دارای کمترین میزان ظرفیت امولسیون‌کنندگی ($97/19 \text{ m}^2/\text{g}$) و پایداری امولسیون ($38/24$ درصد) بود و فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش این خصوصیات عملکردی پروتئین جوله بروکلی گردید ($p < 0.05$). هیدرولیزهای تهیه شده توسط

گردید ($p < 0.05$)، که این افزایش را می‌توان به حضور پپتیدهای کوچک و باقیمانده‌های هیدروفوب نسبت داد که می‌توانند به سرعت منتشر شده و در طول همگن‌سازی فوراً به سطوح قطرات روغن تازه تشکیل شده جذب شوند [۳۶]. همچنین این بهبود در ظرفیت امولسیون‌کنندگی پس از هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوله در درجه هیدرولیز پایین را می‌توان به بهبود حالیت‌پذیری و انعطاف‌پذیری زنجیره‌های پپتیدی نسبت داد [۲۳]. تأثیر افزایش حالیت بر بهبود ظرفیت امولسیون‌کنندگی هیدرولیزات‌های پروتئینی نیز در تحقیق آبی و همکاران (۲۰۱۹) نشان داده شد [۳۷].

ترتیب $146/37 \text{ m}^2/\text{g}$ و $43/10$ درصد). محققین دریافته‌اند که هیدرولیزات‌های پروتئینی تهیه شده توسط آنزیم کاتالاز دارای قطرات کوچک و آب‌گریزی بالا می‌باشند که موجب برهمکنش بیشتر این قطرات در سطوح مشترک امولسیون‌های روغن-پروتئین شده و با ادغام کمتر قطرات با یکدیگر، پایداری بالاتری را ایجاد می‌کند [۳۰]. ژنگ و همکاران (۲۰۱۹) شاخص پایداری امولسیون هیدرولیزهای پروتئین لوبیای سیاه تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز را در زمان‌های مختلف هیدرولیز در محدوده $821/40$ – $138/37$ دقیقه گزارش کردند [۲۳]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های جوله‌های بروکلی موجب افزایش معنی‌دار ظرفیت امولسیون‌کنندگی این پروتئین‌ها

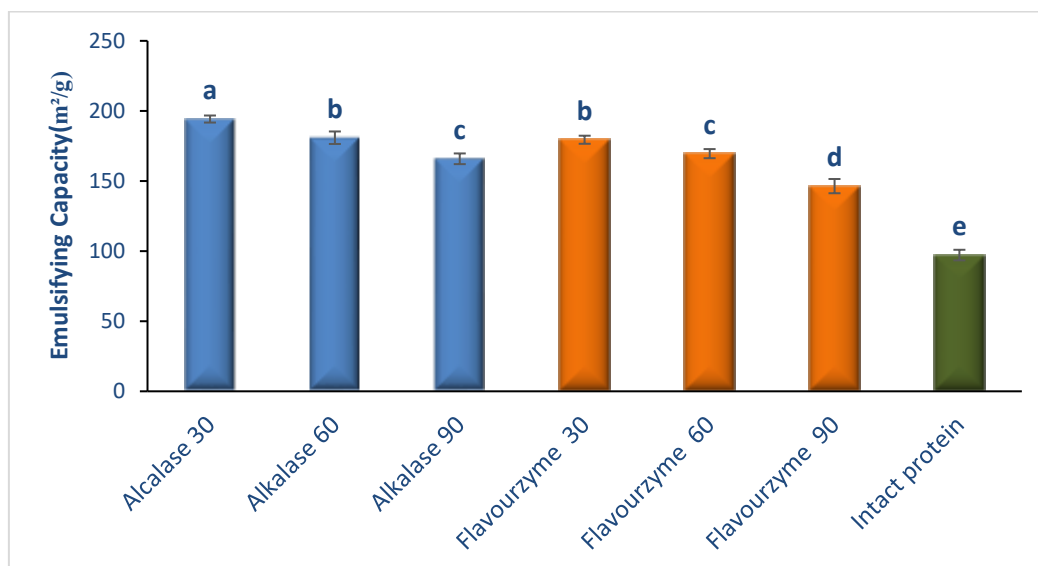


Fig 6. Comparison of emulsifying capacity of broccoli sprout protein hydrolysates (m^2/g)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

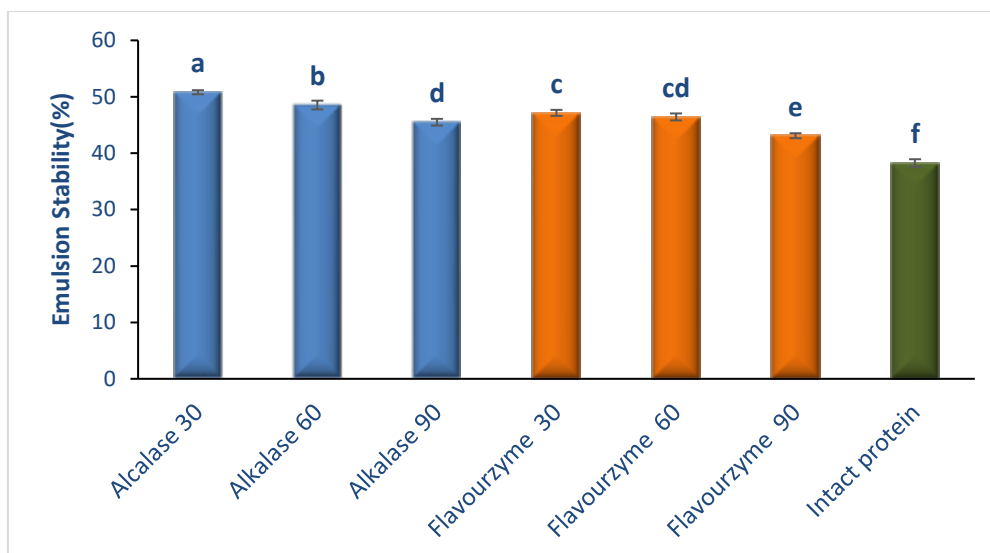


Fig 7. Comparison of emulsion stability of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

($p < 0.05$). به طور کلی در بین هیدرولیزات‌های پروتئینی، بیشترین ظرفیت کف‌کنندگی (به ترتیب ۶۵/۲۴ و ۶۴/۱۵ درصد) و پایداری کف (به ترتیب ۸۶/۹۷ و ۸۶/۱۰ درصد) مربوط به هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان‌های هیدرولیز ۳۰ و ۶۰ دقیقه بود (۱۳/۲۴ درصد) و بین این دو تیمار از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. کمترین میزان این خصوصیات در هیدرولیزات تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم و زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به دست آمد (به ترتیب ۴۷/۳۰ و ۷۵/۱۴ درصد). در راستای نتایج پژوهش حاضر، شوایی و همکاران (۲۰۲۲) نیز دریافتند که هیدرولیز آنزیمی پروتئین نخود موجب افزایش ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئین نخود گردید. با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین نخود، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف در ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت. این محققین اظهار داشتند که در اثر افزایش درجه هیدرولیز تا حد مطلوب، افزایش حلالیت می‌تواند موجب افزایش ظرفیت کف‌کنندگی هیدرولیزات گردد، ولی افزایش بالاتر درجه هیدرولیز می‌تواند با تخریب ساختار کروی پروتئین موجب کاهش ظرفیت کف‌کنندگی گردد. تعادل بین هیدروفیل و هیدروفوب پروتئین نیز موجب ایجاد ظرفیت‌کنندگی مطلوب می‌گردد، که هیدرولیز

۳-۵-۳- ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف

نتایج آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که تیمارهای مورد بررسی از لحاظ آماری تأثیر معنی‌داری بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئین جولنه بروکلی داشتند ($p < 0.05$). میانگین مقادیر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئین جولنه بروکلی تهیه شده توسط آنزیم‌های پروتئاز و زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی به ترتیب در شکل‌های ۸ و ۹ با یکدیگر مقایسه شده است. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین خام اولیه دارای کمترین میزان ظرفیت کف‌کنندگی (۴۴/۸۲ درصد) و پایداری کف (۷۳/۵۹ درصد) بود و فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش این خصوصیات عملکردی پروتئین جولنه بروکلی گردید ($p < 0.05$). هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی‌داری دارای ظرفیت ظرفیت‌کنندگی و پایداری کف بالاتری نسبت به هیدرولیزات‌های تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند ($p < 0.05$). در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئینی به تدریج کاهش یافت

را گزارش کردند و تنها افزایش جزئی در ظرفیت امولسیون‌کنندگی هیدرولیزات‌های تولیدی توسط آنزیم‌های آلکالاز و نووزیم و کاهش پایداری کف در هیدرولیزات‌ها در مقایسه با پروتئین خام اولیه مشاهده شد [۳۸].

بیش از حد موجب کاهش این تعادل می‌گردد [۲۱]. با این حال، ووگل‌سانگ-اودویر و همکاران (۲۰۲۳) عدم تأثیر معنی‌دار فرآیند هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های پروتئاز مختلف (آلکالاز، نووزیم و فلاورزایم) بر ظرفیت کف‌کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات‌های پروتئین عدس

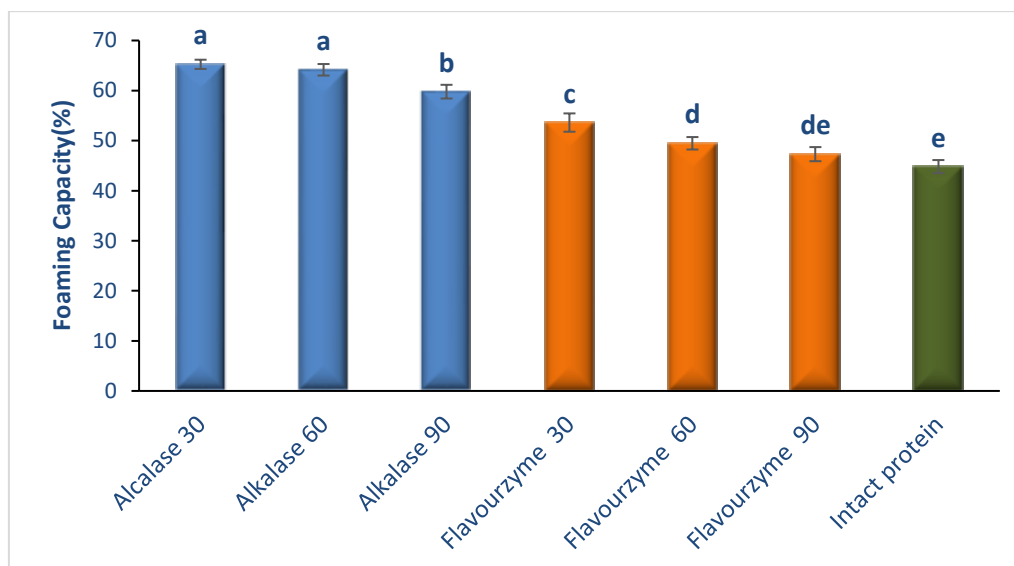


Fig 8. Comparison of foaming capacity of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

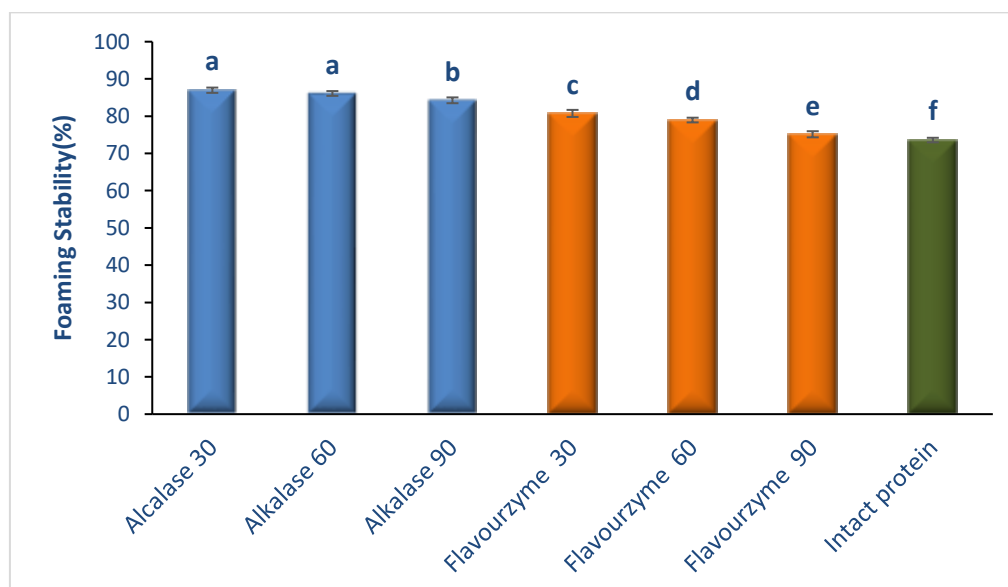


Fig 9. Comparison of foaming stability of broccoli sprout protein hydrolysates (%)

Values represent mean $\pm$ SD. Different letters indicate significant difference among samples at 5% probability level.

۴- نتیجه گیری

هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری دارای حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف بالاتری نسبت به هیدرولیزات های تهیه شده توسط آنزیم فلاورزایم بودند. در مورد هر دو آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی از ۳۰ تا ۹۰ دقیقه، حلالیت افزایش، ولی ظرفیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف هیدرولیزات های پروتئینی به تدریج کاهش یافت. محتوای اسیدهای آمینه هیدروفوب هیدرولیزات های تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود. هیدرولیزات های تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز آنزیمی ۹۰ دقیقه به عنوان تیمار برتر انتخاب شدند.

در این تحقیق، هیدرولیزهای پروتئین جوانه بروکلی با استفاده از دو آنزیم پروتئاز آلکالاز و فلاورزایم و سه زمان هیدرولیز آنزیمی (۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه) تهیه شدند و خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی هیدرولیزهای پروتئینی بررسی شدند. نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز آنزیمی، محتوای پروتئین هیدرولیز شده، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، FRAP هیدرولیزهای تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود. پروتئین خام اولیه دارای کمترین میزان حلالیت، ظرفیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف بود و فرآیند هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش این خصوصیات عملکردی پروتئین جوانه بروکلی گردید.

۵- منابع

- 1] Tkaczewska J. Peptides and protein hydrolysates [as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings-A review. Trends in Food Science & Technology. 2020;106:298-311
- [2] Kulawik P, Jamróz E, Janik M, Tkaczewska J, Krzyściak P, Skóra M, et al. Biological activity of biopolymer edible furcellaran-chitosan coatings enhanced with bioactive peptides. Food Control. 2022;137:108933.
- [3] da Costa de Quadros C, Lima KO, Bueno CHL, dos Santos Fogaça FH, da Rocha M, Prentice C. Effect of the edible coating with protein hydrolysate on cherry tomatoes shelf life. Journal of Food Processing and Preservation. 2020;44(10):e14760.
- [4] Kaveh S, Mahoonak AS, Ghorbani M, Jafari SM. Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. Industrial Crops and Products. 2022; 182:114908.
- [5] Sarabandi K, Gharehbeglou P, Jafari SM. Spray-drying encapsulation of protein hydrolysates and bioactive peptides: Opportunities and challenges. Drying Technology. 2020;38(5-6):577-95.
- [6] Assadpour E, Jafari SM, Mahoonak A, Ghorbani M. Evaluation of emulsifying and foaming capacity of the legume flours and the influence of pH and ionic strength on these properties. Iranian Journal of Food Science and Technology. 2011;7(1):80-91.
- [7] Aluko R, Yada R. Structure-function relationships of cowpea (*Vigna unguiculata*) globulin isolate: influence of pH and NaCl on physicochemical and functional properties. Food chemistry. 1995; 53(3): 259-265.
- [8] Kinsella JE, Melachouris N. Functional properties of proteins in foods: a survey. Critical Reviews in Food Science & Nutrition. 1976;7(3):219-80.
- [9] Molina Ortiz SE, Cristina An M. Analysis of products, mechanisms of reaction, and some functional properties of soy protein hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2000;77(12):1293-301.
- [10] Mosavy S, Najafi A, Baghaei H. Evaluation of antioxidant activity of broccoli (*Brassica oleracea*) sprout extract on oxidative stability of soybean oil under accelerated storage at 60° C. Journal of food science and technology (Iran). 2022;19(131):211-22.
- [11] Tarasevičienė Ž, Danilčenko H, Jariene E, Paulauskienė A, Gajewski M. Changes in some chemical components during germination of broccoli seeds. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca. 2009;37(2):173-6.
- [12] Pezeshky A, Daliri H, Mohammadi M, Hamishehkar H, Beyrami H. Study of amino acid profile, solubility and antioxidant properties of quinoa protein hydrolysates. Journal of Food Research. 2022;32(1):123-35.
- [13] Kang K-H, Qian Z-J, Ryu B, Kim S-K. Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. Food Science and Biotechnology. 2011;20:183-91.
- [14] Irvani Mohajeri R, Mirzaei M, Ofoghi H. Effects of enzyme types and hydrolysis time on the

production of antioxidant peptides from *Spirulina platensis*. *Innovative Food Technologies*. 2019;6(4):583-99.

[15] Daliri H, Ahmadi R, Pezeshki A, Hamishehkar H, Mohammadi M, Beyrami H, et al. Quinoa bioactive protein hydrolysate produced by pancreatin enzyme-functional and antioxidant properties. *Lwt*. 2021;150:111853.

[16] AOAC. Official Methods of Analysis. 16th Edn., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC., USA (Vol. 222): Association of Official Analytical Chemists Washington, DC. 2000.

[17] Mohammadi M, Hamishehkar H, Ghorbani M, Shahvalizadeh R, Pateiro M, Lorenzo JM. Engineering of liposome structure to enhance physicochemical properties of *Spirulina platensis* protein hydrolysate: Stability during spray-drying. *Antioxidants*. 2021;10(12):1953.

[18] Shah Hosseini SR, Javadian SR, Safari R. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. *Journal of Innovation in Food Science and Technology* 2023;15(1):143-55.

[19] Jamdar S, Rajalakshmi V, Pednekar M, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*. 2010;121(1):178-84.

[20] Xu Y, Galanopoulos M, Sismour E, Ren S, Mersha Z, Lynch P, et al. Effect of enzymatic hydrolysis using endo-and exo-proteases on secondary structure, functional, and antioxidant properties of chickpea protein hydrolysates. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2020;14(1):343-52.

[21] Shuai X, Gao L, Geng Q, Li T, He X, Chen J, et al. Effects of moderate enzymatic hydrolysis on structure and functional properties of pea protein. *Foods*. 2022;11(15):2368.

[22] Cui Q, Sun Y, Zhou Z, Cheng J, Guo M. Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties and solubility and bitterness of milk protein hydrolysates. *Foods*. 2021;10(10):2462.

[23] Zheng Z, Li J, Li J, Sun H, Liu Y. Physicochemical and antioxidative characteristics of black bean protein hydrolysates obtained from different enzymes. *Food Hydrocolloids*. 2019;97:105222.

[24] Ghanbarinia S, Ariaii P, Safari R, Najafian L. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. *Animal Science Journal*. 2022;93(1):e13729.

[25] Nemati M, Javadian SR, Keshavarz M. Production of protein hydrolysates from Caspian shad (*Alosa caspia*) by-products using Alcalase enzyme. *Journal of Marine Biology*. 2019;11(3):87-95.

[26] Ovissipour M, Safari R, Motamedzadegan A, Shabanpour B. Chemical and biochemical hydrolysis

of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5:460-465.

[27] Rafatinia A, Roomiani L. The Effect of Enzyme, Time and Temperature on the Properties of Hydrolyzed Protein of Viscera Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Research and Innovation in Food Science and Technology*. 2018;7(3):269-80.

[28] Karami Z, Peighambari SH, Hesari J, Akbari-Adergani B, Andreu D. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*. 2019;32:100450.

[29] Noman A, Qixing J, Xu Y, Abed SM, Obadi M, Ali AH, et al. Effects of ultrasonic, microwave, and combined ultrasonic-microwave pretreatments on the enzymatic hydrolysis process and protein hydrolysate properties obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Food Biochemistry*. 2020;44:(^):e13292.

[30] do Evangelho JA, Vanier NL, Pinto VZ, De Berrios JJ, Dias ARG, da Rosa Zavareze E. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chemistry*. 2017;214:460-7.

[31] Rahimipana M, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Shahiri Tabarestani H, Nabimeybodi M. Optimization of Antioxidant Peptides Production from Tryptic Hydrolysis of Pomegranate Seed Protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 2023;19(1):181-94.

[32] Zhao G, Liu Y, Zhao M, Ren J, Yang B. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*. 2011;127(4):1438-43.

[33] Jain S, Anal AK. Optimization of extraction of functional protein hydrolysates from chicken egg shell membrane (ESM) by ultrasonic assisted extraction (UAE) and enzymatic hydrolysis. *LWT-Food Science and Technology*. 2016;69:295-302.

[34] Najafian L. Comparative Study on Physicochemical Properties of Catfish Sarcoplasmic and Myofibrillar Protein Hydrolysates Produced by Enzymatic Hydrolysis. *Journal of food science and technology (Iran)*. 2022;19(130):213-26.

[35] Tong LM, Sasaki S, McClements DJ, Decker EA. Mechanisms of the antioxidant activity of a high molecular weight fraction of whey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2000;48(5):1473-8.

[36] Zheng Z, Wei X, Shang T, Huang Y, Hu C, Zhang R. Bioconversion of duck blood cell: process optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *BMC biotechnology*. 2018;18:1-12.

[37] Ai M, Tang T, Zhou L, Ling Z, Guo S, Jiang A. Effects of different proteases on the emulsifying capacity, rheological and structure characteristics of

preserved egg white hydrolysates. Food Hydrocolloids. 2019;87:933-42.

[38] Vogelsang-O'Dwyer M, Sahin AW, Bot F, O'Mahony JA, Bez J, Arendt EK, et al. Enzymatic hydrolysis of lentil protein concentrate for

modification of physicochemical and techno-functional properties. European Food Research and Technology. 2023;249(3):573-86.



Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation of Antioxidant and Functional Properties of broccoli sprout Protein Hydrolysates using enzymatic Hydrolysis

Amin Jorjania, Leila Najafianb*, Mohammad Farsic, Seyed Ahmad Shahidid

- 1- PhD Student, Department of Food Science and Technology, Sar.C., Islamic Azad University, Sari, Iran.
- 2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sar.C., Islamic Azad University, Sari, Iran.
- 3- Associate Professor, Department of Wood and Paper Science and Technology, Sar.C., Islamic Azad University, Sari, Iran.
- 4- Professor, Department of Food Science and Technology, AM.C., Islamic Azad University, Amol, Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received:2025/1/31 Accepted:2025/5/18 Keywords: Broccoli sprout, Enzymatic protein hydrolysis, Antioxidant activity, Functional properties DOI: 10.22034/FSCT.22.166.161. *Corresponding Author E- najafian_5828@yahoo.com	Bioactive peptides are among the functional compounds that have recently been recognized in food products. Enzymatic hydrolysis has been used to improve the functional properties of plant proteins. The aim of this study was to enzymatically hydrolyze broccoli sprout protein and investigate the functional and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. For this purpose, two enzymes, Alcalase and Flavourzyme, and different enzymatic hydrolysis times (30, 60, and 90 min) were used. The results showed that the protein hydrolysates obtained by Alcalase have smaller chain length and higher amounts of hydrophobic amino acids, degree of enzymatic hydrolysis, protein recovery, hydrolyzed protein content, solubility, emulsifying capacity, emulsion stability, foaming capacity, foam stability and antioxidant activity compared to the hydrolysates prepared by Flavourzyme. Increasing the enzymatic hydrolysis time from 30 to 90 min resulted in increased solubility and decreased emulsifying capacity, emulsion stability, foaming capacity, and foam stability of the produced protein hydrolysates ($p < 0.05$). In general, due to the antioxidant activity of broccoli sprout protein and its significant improvement after enzymatic hydrolysis, especially by Alcalase enzyme at 90 min, the prepared protein hydrolysates are recommended as natural antioxidants to maintain the quality and safety of food products.