مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۲ شماره ۱/ سال ۱۴۰۱/ صفحات ۱۲۳ تا ۱۳۵
DOI: 10.22034/FR.2021.41561.1759

بررسی پروفایل اسیدآمینه، حل‌شوندگی وخواص آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات حاصله از پروتئین کینوا

حسام دلیری[۱]، اکرم پزشکی نجف‌آبادی[*۲]، حامد هیشه‌کار[۳]، مریم محمدی[۴] و حسین بیرامی[۵]

تاریخ دریافت: ۹۹/٦/۱۲ تاریخ پذیرش: ٤۰۰/۳/۱۷

[۱] دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
[۳] استاد مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
[٤] استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کردستان، سنندج
[۵] استادیار مرکز ملی تحقیقات شوری، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی یزد
[*] مسئول مکاتبه: Email: akram.pezeshki@tabrizu.ac.ir

چکیده

زمینه مطالعاتی: گیاه کینوا با دارا بودن درصد بالایی از پروتئین، مواد مغذی و اسیدآمینه‌های ضروری دارای خواص فیزیکو شیمایی، عملکردی و آنتی¬اکسیدانی مطلوب بوده و هیدرولیزات پروتئینی حاصل از آن می توانند به عنوان منابع غذایی زیست فعال در محصولات عملگرا استفاده شوند. **هدف**: هدف از پژوهش حاضر، بررسی خواص فیزیکوشیمیایی کینوا به عنوان یک منبع پروتئینی مهم به عنوان جایگزین گندم جهت غلبه بر مشکلات بیماران سلیاک است. **روش کار**: در این مطالعه به استخراج پروتئین دانه کینوا، بررسی پروفایل اسیدآمینه کنسانتره پروتئینی و پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آن با آنزیم پانکراتین، حل‌شوندگی و خواص آنتی‌اکسیدانی پرداخته شده است. **نتایج**: نتایج در قالب طرح کاملا تصادفی در سطح معنی‌داری ۵٪ میزان رطوبت را ۹/۳٦، خاکستر ۲/۲۹، فیبر خام ٤/٦، پروتئین ۱۲/۵۱، چربی ۵/۳٦ و کربوهیدرات ۷۱/٤۸ درصد نشان داد. بیشترین درصد اسیدآمینه کینوا را اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید و لیزین تشکیل داد ولی از نظر آمینواسیدهای گوگردی کمبود وجود داشت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز معادل ۱۹/۱۷ درصد پس از گذشت ۱۸۰ دقیقه بود. پپتیدهای کینوا در محدوده pH ایزوالکتریک دارای کمترین میزان حل‌شوندگی بودند . پپتید های زیست فعال کینوا موجب احیای رادیکال DPPH شدند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا داشتند (٦۷/۸ درصد پس از ٦ ساعت هیدرولیز و پس از۸ ساعت به ۵۹/۸ درصد کاهش یافت). **نتیجه‌گیری نهایی**: در کل می‌توان نتیجه‌گیری کرد گیاه کینوا با دارا بودن درصد بالایی از پروتئین دارای خواص فیزیکو شیمایی، عملکردی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب بوده و پپتید های حاصل از آن می‌تواند به عنوان منابع غذایی زیست فعال در محصولات عملگرا استفاده شود.

واژگان کلیدی: کینوا، پانکراتین، پپتید زیست‌فعال، طیف‌سنجی فروسرخ، فعالیت آنتـی اکسیدانی

مقدمه

امروزه تقاضا برای موادغذایی سالم با خواص عملکردیِ بالا موجب جست‌وجو برای یافتن راهکارهایی در جهت افزایش ویژگی‌های مفید مواد غذایی شده است. کینوا[1] با نام علمی "*Chenopodium quinoa Willd*" برخلاف دانه-های غلات حقیقی که به خانواده *Poaceae* مربوط هستند، یک شبه غله است و به خانواده *Amaranthaceae* و دو-لپه‌ای‌ها یا دو برگی‌ها تعلق دارد و خاستگاه آن در آمریکای جنوبی است کینوا یکی از منابع پروتئین گیاهی با ارزش تغذیه‌ای بالاست و می‌تواند جایگزین گندم در بیماران مبتلا به سلیاک شود (گلگر و همکاران ۲۰۰٤). دانه‌های کینوا اجزای زیست‌فعال متنوعی مانند پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها و اسید اولئیک دارند که همگی این موارد برای سلامتی انسان مفید هستند (دورن و همکاران ۲۰۱۸؛ ویکاکندو و همکاران ۲۰۱۸). کینوا با دارابودن آمینواسیدهای ضروروی، میزان پروتئین با دسترسی زیستی بالا می‌تواند جایگزین خوبی برای پروتئین‌های گیاهی مانند گندم در بیماران مبتلا به سلیاک و پروتئین-های جانوری باشد و به علت ارزش تغذیه‌ایِ بالا توجه ویژه‌ای به گیاه کینوا شده است (برتی و همکاران ۲۰۰٤). از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی، انواع پپتیدهای زیست فعال با فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، فعالیت سطحی، ضد فشارخونی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی و... بوجود می‌آید (میردامادی و همکاران ۱۳۹٦؛ وو و همکاران ۲۰۱٤). در سال‌های اخیر توجه زیادی به استفاده از پپتیدهای زیست فعال درزمینه تولید غذاهای فراسودمند شده است. پپتیدهای زیست‌فعال وزن مولکولی پائین دارند و پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند . پپتیدهای زیست‌فعال هیچ تجمعی در ارگانیسم‌ها ندارند و زیست تخریب‌پذیرند. فعالیت این ترکیبات تحت تاثیر ترکیب آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده، موقعیت مکانی اسیدهای آمینه در ساختار پپتید، شکل و ساختمان ویژه پپتیدها، شرایط واکنش و نوع پروتئاز مورد استفاده است. یکی از مزایای تولید این ترکیبات عملکرد آنها به عنوان یک منبع آنتی‌اکسیدان طبیعی است. با این وجود مکانیسم دقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها به درستی مشخص نیست (ویوک و همکاران ۲۰۰۱؛ دی‌کاسترو و ساتو ۲۰۱۵ ؛ مرندی و همکاران ۲۰۱۸). پپتیدهای با وزن مولکولی پایین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به انواع با وزن مولکولی بالا دارند. این اثر با واکنش بهتر رادیکال-های آزاد فعال با پپتیدهای کوچک مرتبط است (آلشی و همکاران ۲۰۱٤؛ بامداد و همکاران ۲۰۱٤). در سال‌های اخیر تحقیقات زیادی بر استفاده از کینوا و پپتیدهای زیست فعال حاصله از آن انجام شده است. هفده پپتید زیست فعال با خواص بالقوه از پروتئین‌های کینوا شناسایی شدند. نواک و همکاران (۲۰۱٦) در بررسی ترکیبات مغذی در کینوا بیان کردند کینوا یک محصول کشاورزی باستانی است و می‌تواند در جهت ایمنیِ موادغذایی در سرتاسر جهان نقش مهمی ایفا کند. فیشر و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی اجزای پروتئینی و آنتی-اکسیدانیِ جوانه و دانه‌های کینوا که در معرض آب، نمک و شرایط نوری قرار داده شده‌اند بیان کردند، جوانه‌های خوراکی نسبت به گیاه بالغ ارزش‌غذایی بالاتری دارند. ویکاکندو و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی خصوصیات محافظت‌کنندگی شیمیایی انواع پپتیدهای استخراج شده از کینوا در محیط آزمایشگاهی و بررسی پروتئین در شرایط هضم معده‌ای شبیه سازی شده بیان کردند پپتیدهای با وزن کمتر از ٥ کیلودالتون نقش بیشتری در زمینه‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و پپتیدهای دارای وزن بیشتر از ٥ کیلودالتون بیشتر اثرات ضدسرطانی دارند. گیاه کینوا با دارا بودن درصد بالایی از پروتئین، مواد مغذی و اسیدآمینه‌های ضروری دارای خواص فیزیکو شیمایی، عملکردی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب بوده و هیدرولیزات پروتئینی حاصل از آن می توانند به عنوان منابع غذایی زیست فعال در محصولات عملگرا استفاده شوند. هدف از

1 - Quinoa

پژوهش حاضر، بررسی خواص فیزیکوشیمیایی کینوا به عنوان یک منبع پروتئینی مهم به عنوان جایگزین گندم جهت غلبه بر مشکلات بیماران سلیاک است و در ادامه بررسی استفاده از آنزیم جانوری پانکراتین جدا از آنزیم‌های متداول در هیدرولیز پروتئینها (آلکالاز، نوترئاز، پپسین و...) جهت هیدرولیز کنسانتره پروتئینی آن است. در نهایت خواص فیزیکی‌شیمیایی وکاربردی آن از جمله درجه هیدرولیز، قابلیت حل‌شوندگی وفعالیت آنتی‌اکسیدانی و.. بررسی می‌شود تا بتوان از پپتیدهای زیست فعال بدست آمده به عنوان ترکیب زیست‌فعال با خواص تغذیه‌ای و عملکردی مناسب در انواع سیستم‌های غذایی استفاده نمود.

مواد و روش‌ها

دانه گیاه کینوا از مرکز ملی تحقیقات شوری وابسته به سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی استان یزد، رادیکال آزاد DPPH و آنزیم پانکراتین (فعال در pH معادل ۸ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد) از شرکت سیگما (آلمان) تهیه شد.

آنالیزهای شیمیایی دانه کینوا

اندازه‌گیری رطوبت با روش ۱۵-٤٤ AACC ، پروتئین از روش ۱۲-٤٦ AACC با اندازه‌گیری مقدار کل ازت مقدار پروتئین با کمک فاکتور ۵/۷ ، چربی (روش ۱۲-٤٦ AACC)، خاکستر و مواد معدنی (روش ۰۱-۰۸ AACC)، فیبر با استفاده از روش ۱۰-۳۲AACC و کربوهیدرات کل از تفریق مقادیر رطوبت، پروتئین، لیپید و خاکستر از ۱۰۰ به‌دست آمد.

تهیه آرد از دانه‌های کینوا و چربی‌گیری از آن به روش-گرم استخراج با حلال

پس از شست و شوی دانه‌ی کامل کینوا به تعداد ٤ تا ٥ بار و حذف کامل کف از محلول، که نشانه حذف ساپونین بود، دانه‌ها در آون با دمای ۱ ± ٤٥ درجه سانتی‌گراد خشک شده و سپس با استفاده از آسیاب (Proctor Silex model E160, UPC) الک شماره ٦٠ به آرد تبدیل شدند چربی‌گیری از آرددانه‌های کینوا به روش‌گرم استخراج با حلال با استفاده از تجهیزات سوکسله و حلال هگزان نرمال و نسبت ۱ به ٤ پودردانه به حلال در مدت زمان ۹ ساعت انجام شد (السوهیمی و همکاران ۲۰۱۵).

تهیه کنسانتره پروتئین دانه کینوا

ابتدا کنجاله دانه کینوای چربی‌گیری شده با نسبت ۱ به ۱۰ در آب مقطر استریل پراکنده شد. سپس با استفاده از سود (NaOH) با غلظت ۱ نرمال به صورت قلیایی در آمده و pH محلول به ۱۰ رسانده شد و در دمای اتاق به مدت ۱ ساعت کاملاً هم‌زده شد. در این بازه زمانی pH در مقدار تعیین شده ثابت نگه داشته شد تا حداکثر حل شدن پروتئین ایجاد گردد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه با دور rpm ۹۰۰۰ در دمای ٤٤ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل (K241R, Pro-Research, Centurion Scientific Ltd, UK) با دور rpm ۹۰۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد فاز جامد جدا شده و pH مایع رویی آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال به منظور رسوب دادن پروتئین‌های کینوا به ٥ رسانده شد. و مجدد مشابه با شرایط بالا عملیات سانتریفیوژ تکرار شد رسوب به‌دست آمده با سانتریفیوژ که همان کنسانتره پروتئین است با در دستگاه خشک کن انجمادی مدل (Christ, Germany) لیوفلیزه شده و برای مراحل انجام آزمایشات بعدی در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (زیوانویچ و همکاران ۲۰۱۱).

پروفایل اسیدهای‌آمینه

کنسانتره پروتئین بدست آمده از کینوا به مدت ٢٤ ساعت با اسیدکلریدریک ٦ نرمال در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز شدند. قبل از آنالیز با HPLC مشتق‌سازی اسید-های‌آمینه با O-phthaldialdehyde (OPA) انجام شد. آنالیز اسیدآمینه با استفاده از HPLC مدل (Young Lin Acme 9000, YL Instruments Co., Ltd., Anyang, Korea) مجهز به ستون HPLC فاز معکوس (۱۵۰ میلیمتر* ٤/٦ میلیمتر * ۰/۵ میکرومتر، RP-C18 ODS-A، Technokroma، بارسلونا، اسپانیا) و دتکتور فلورسانس

مدل (LC305، LabAlliance، State College، PA، USA) انجام شد.

تهیه هیدرولیزات پروتئین از کنسانتره پروتئین کینوا

ابتدا کنسانتره پروتئین به مدت ۳۰ دقیقه در غلظت ۵ درصد (وزنی-حجمی) در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار پراکنده و حل شد و با همزدن مداوم در دمای محیط امکان هیدراته شدن کامل آن فراهم آمد. سپس محلول اولیه آنزیم پانکراتین، در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار فوق و در نسبت آنزیم به سوبسترای پروتئینی (وزنی-وزنی) معادل ۲/۵ درصد (وزنی-وزنی) آنزیم به سوبسترای پروتئینی به محلول دارای ایزوله پروتئینی اضافه گردید. دمای انجام واکنش در مورد آنزیم پانکراتین ٤٠درجه سانتی‌گراد بوده و همزدن مداوم با سرعت ۲۰۰ rpm در طول مدت ٤ ساعت انجام شد. پس از اتمام فرایند هیدرولیز آنزیمی و برای غیرفعال شدن آنزیم و توقف واکنش، محیط واکنش نمونه به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از آنکه محلول مورد نظر تا دمای محیط خنک شد، به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm عملیات سانتریفیوژ انجام شد، سپس محلول فاز رویی جداسازی شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد با فشار تقریبی ۰/۱ میلی‌بار لیوفلیزه شده و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (ویلانوئوا و همکاران ۱۹۹۹).

تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون هیدرولیز شده‌ی ایزوله کنسانتره پروتئین و اسید تری کلرواستیک (TCA) (٠/٤٤ مولار) با نسبت برابر مخلوط شدند و پس از آن به مدت ۱۵ دقیقه در یخچال و در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ انجام شد. پروتئین‌های محلول به کمک روش برادفورد و با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Visible مدل (Ultrospec 2000 Scinteck، انگلستان) و بر اساس منحنی استاندارد تهیه شده ازپروتئین سرم آلبومین گاوی (BSA) محاسبه شد. و درجه هیدرولیز بر اساس معادله ۱ محاسبه شد.

معادله ۱: $\text{درصدهیدرولیز} = \frac{\text{مایع روئی پروتئین} + TCA}{\text{سوسپانسیون پروتئین}} \times ۱۰۰$

حل‌شوندگی

برای تعیین حل‌شوندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده، مقدار ۲۰۰ میلی گرم نمونه پروتئینی در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل شده و سپس pH مخلوط با استفاده از سود (NaOH) و اسید کلریدریک (HCl) با غلظت ۱ نرمال در pH های مختلف (۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲) تنظیم شد. مخلوط‌ها در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در حالت همزده شدن با سرعت ۱۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه انکوبه گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از انجام رقیق‌سازی مناسب، میزان پروتئین سوپرناتانت بر اساس روش برادفورد طبق معادله ۲ تعیین شد.

معادله۲ : $\text{درصد حل‌شوندگی} = \frac{\text{مقدار مایع رویی در پروتئین}}{\text{مقدار کل نمونه پروتئین}} \times ۱۰۰$

اندازه‌گیری خواص آنتی‌اکسیدانی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از روش وو و همکاران (۲۰۰۳) با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پروتئین کینوای هیدرولیز شده (با غلظت ٤٠ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) در آب مقطر حل شد و سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH ۰/۱۵میلی‌مولار) مخلوط شد. سپس در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول رویی در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد.درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد :

معادله ۳: $FC\ (\%) = \frac{(\text{نمونه جذب} - \text{کنترل جذب})}{\text{کنترل جذب}} \times ۱۰۰$

نمونه کنترل= حجم یکسانی از آب مقطر (بجای محلول نمونه) با محلول DPPH

آنالیزآماری

تجزیه و تحلیل نتایج آماری آزمون‌های شیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS ۱۹ در آنالیز داده‌ها و ۲۰۱٦ Excell جهت رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی دانه کینوا

ویژگی و آنالیز تقریبی دانه کینوا در جدول ۱ ارائه شده است. مقادیر ارائه شده میانگین از ۳ بار تکرار هر آزمایش هست (P≤۰/۰۵).

جدول ۱ - خصوصیات شیمیایی دانه کینوا

Table 1 - Chemical properties of quinoa seeds

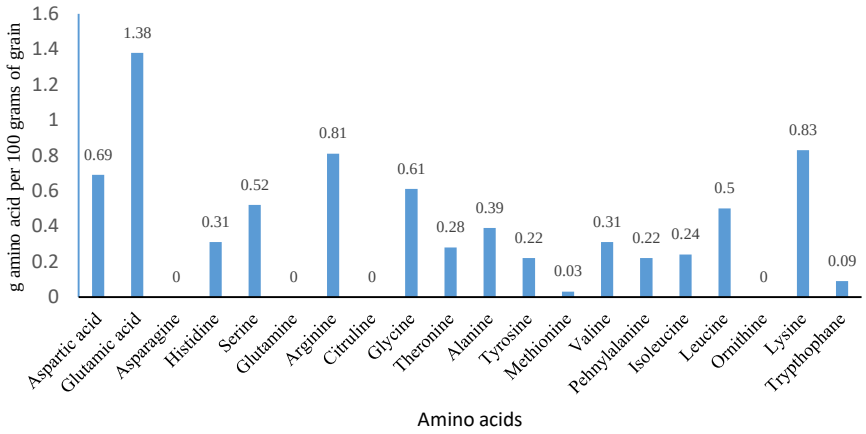
parameter	Percentage based on dry weight
Moisture	9.36 ± 0.46
Ash	2.29 ± 0.11
Crude Fiber	4.6 ± 0.91
Protein	12.51 ± 0.52
Lipid	5.36 ± 0.29
Carbohydrate	70.48 ± 0.35

نتایج خواص شیمیایی، دانه کینوا را به عنوان یک منبع غذایی فوق العاده با ویژگی‌های کاربردی عالی نشان داد. نتایج پژوهش حاضر در تایید نتایج مطالعه جیمز (۲۰۰۹) مبنی بر دارا بودن حدود ۱۱/۲ درصد رطوبت، ۱۳/۲ درصد پروتئین خام، ۹ درصد فیبرخام، ۱/۲ درصد خاکستر کل و حدود ۵۸/۲ درصد کربوهیدرات در دانه کینوا بود که البته مقدار کربوهیدرات آن در مقایسه با پژوهش حاضر به نسبت کمتر است. درمطالعات قبلی گزارش داده شده است که میانگین پروتئین دانه‌های کینوا از ۱۲ درصد تا ۲۳ درصد متغیر است. در مقایسه با دانه-های غلات، محتوای کل پروتئین آرد دانه کینوا از جو (۱۱ درصد)، برنج (۷/۲ درصد) و ذرت (۱۳/۲ درصد) بیشتر است (ابگوچ ۲۰۰۹). همچنین مقدار پروتئین کینوا از پروتئین موجود در بادام زمینی (۸/۲ الی ۱۱/۲ درصد) و لوبیا چشم‌بلبلی (۸/۲ الی ۱۲/۲درصد) بیشتر است. مقادیر ترکیبات شیمیایی کینوا با توجه به خواستگاه و ترکیب دانه متفاوت است؛ تنوع در میزان خاکستر به وابستگی ترکیبات معدنی به نوع خاک و کودهای مورد استفاده برای رشد محصول مربوط می‌شود. در پژوهش که اوگانگبنل (۲۰۰۳) میزان خاکستر برای دانه‌های کینوا معادل ۱/۳۵ درصد به‌دست امد که تقریبا با مقدار اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر مطابقت دارد. در مطالعه‌ای که توسط فریرا و همکاران (۲۰۱۵) انجام شد، نشان داده شد دانه های همراه با سبوس باعث افزایش محتوای خاکستر شد. بر اساس یافته‌های گنزالز و همکاران (۱۹۸۹) در رابطه با کربوهیدرات‌های آرد کینوا مشاهده شد که محتوای نشاسته آن برابر ۳۲/٦ درصد و قندهای محلول آن برابر با ۱۵/۸ درصد بود. از این قندهای محلول ٤/٥٥ درصد گلوکز و ۲/٤۱ درصد فروکتوز و ۲/۳۹ درصد آن را ساکارز تشکیل می‌دهد. بر اساس یافته‌های تورکوت و همکاران (۲۰۱٦) میزان محتوای فیبر دانه‌های کینوا از دانه‌های گندم سیاه بیشتر است. استیکیک و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند دانه کامل و سبوس‌دار کینوا دارای مقدار ۱۰/۳۲ درصد فیبر است و دانه‌های سبوس‌گیری شده و آن دارای ٥/٦۹ درصد فیبر بوده‌اند که این مقدار تقریباً مشابه با مقادیر اندازه‌گیری شده در پژوهش حاضر است.

پروفایل اسید آمینه دانه کینوا

ترکیب اسیدهای آمینه نقش بسیار مهمی در ایجاد ویژگی-ها و خصوصیات ضد اکسایشی در پروتئین ها و پپتید ها دارد (ژائو و همکاران ۲۰۱۲). اکثر پروتئین های گیاهی اغلب از نظر یک یا دو آمینو اسید ضروری کمبود و محدودیت دارند. کینوا بیشتر از نقطه نظر کیفیت پروتئین

تا کمیت آن مورد توجه است و به‌نوبه خود دارای آمینواسیدهای ضروری قابل توجهی است و می‌تواند به عنوان یک مکمل عالی پروتئینی عمل کند (وگا-گالوز و همکاران ۲۰۱۰). محتویات آمینواسیدهای کینوا (بر حسب گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) و درصد آنها در شکل ۱ آورده شده است. آمینواسیدهای گلوتامیک اسید (۱۸/۵۷ درصد)، لیزین (۱۱/۲ درصد)، آرژنین (۱۰/۲ درصد) و آسپارتیک اسید (۹/۲ درصد) بیشترین مقدار را به خود اختصاص داده‌اند. در مقابل اسیدآمینه‌های اورنیتین، سیترولین، گلوتامین و آسپارژین کمترین مقدار را داشتند. از سوی دیگر دانه کینوا مقادیر متوسطی از اسیدآمینه‌های گلیسین (۸/۲ درصد)، سرین (۷ درصد) و لوسین (۶/۲ درصد) داشت. در پژوهش سکوردو و همکاران (۲۰۱٤) نیز آمینو اسید گلوتامیک بیشترین مقدار را در پروتئین‌های کینوا دارا بود. در پژوهش انجام گرفته توسط السوهیمی و همکاران (۲۰۱۵) نیز مقدار آمینواسیدهای گوگردی در کینوا ناچیز گزارش شد. پروتئین کینوا دارای غلظت مناسب از اسیدهای آمینه ضروری به جز متیونین (۰/۲ درصد) است. اوگانگبنل و همکاران (۲۰۰۹) بیان کرده‌اند تعادل اسید های آمینه ضروری در کینوا نسبت به بسیاری از غلات همچون ذرت، ارزن و سورگوم بیشتر است. محتوای آمینواسیدهای کینوا از سایر غلات بیشتر است و مقدار لیزین پروتئین کینوا ازگندم (۲/۲ درصد) بیشتر است.



شکل ۱- مقدار اسیدهای آمینه (گرم) در ۱۰۰ گرم دانه کینوا

Figure 1- Amount of amino acids in terms of grams per 100 grams of grain

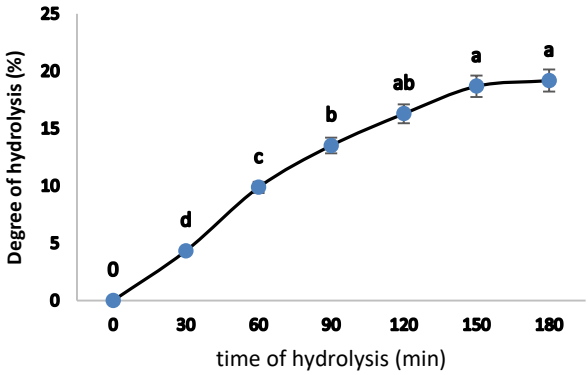
درجه هیدرولیز (DH)

DH اندازه و ترکیب اسیدآمینه پپتیدها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، در DH زیاد و در نتیجه تولید پپتیدهای آبگریز با طعم تلخ، بر طعم هیدرولیز پروتئین تأثیر گذار است (سیلوستره و همکاران ۲۰۱۳). با بیشتر شدن درجه هیدرولیز پیوندهای پپتیدی بیشتری شکسته شده و رشته‌های پپتیدی کوتاه تر می‌شود، وزن مولکولی آنها کمتر شده و در نهایت میزان کل اسید های آمینه ازاد در سوبسترا افزایش پیدا می‌کند (زیوانویچ و همکاران ۲۰۱۱). همان‌طور که در شکل ۲ مشخص است در ۱۲۰ دقیقه‌ی اول، هیدرولیز کنسانتره پروتئینی کینوا توسط آنزیم پانکراتین با شیب زیاد افزایش یافت اما پس از آن از سرعت افزایش درجه هیدرولیز کاسته شد ($P\leq ۰/۰۵$). این امر اهمیت زیادی در هنگام افزایش زمان هیدرولیز دارد و می تواند به دلیل تجزیه بیش از حد سوبسترا و همچنین اثر بازدارندگی محصول نهایی باشد که به عنوان بازدارنده رقابتی با اتصال به جایگاه فعال آنزیم، روی فعالیت آنزیم بر سوبسترای مد نظر اثر منفی می‌گذارد و در نهایت میزان پارامتر درجه هیدرولیز به صورت ویژه تحت تاثیر مستقیم زمان فرایند قرار می‌گیرد (سینگیویچ

زاپکا و همکاران ۲۰۰۹). هم‌چنین این کاهش در میزان صعود درجه هیدرولیز ممکن است به علت کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی موجود برای هیدرولیز، مهار آنزیم و غیرفعال سازی آنزیم باشد. در تحقیقی که توسط سیلوستره و همکاران (۲۰۱۳) در مورد کنسانتره پروتئنی آب پنیر انجام گرفت با بررسی میزان پارامتر درجه هیدرولیز به وسیله آنزیم پانکراتین در بازه های زمانی تا ٥ ساعت مشاهده شد که با گذشت زمان میزان این پارامتر افزایش یافته و به حدود ۳۰/۵۲ درصد می رسد.

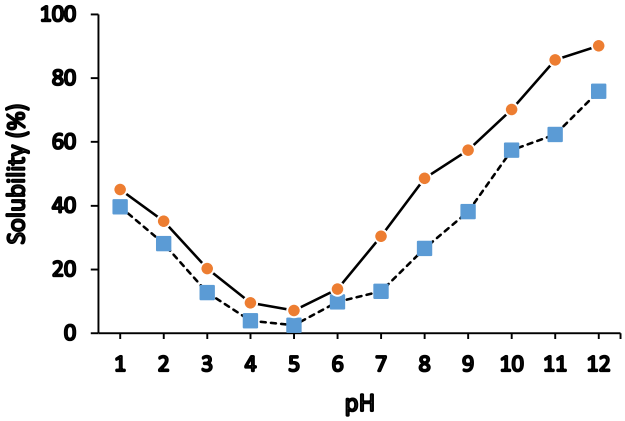
حل‌شوندگی کنسانتره پروتئینی و هیدرولیزات پروتئینی کینوا

در شکل ۳ حل‌شوندگی کنسانتره پروتئینی و نیز پپتیدهای کینوا حاصل از آنزیم پانکراتین آن در pHهای مختلف نشان داده شده است. پایین‌ترین و کمترین میزان حل‌شوندگی کنسانتره پروتئین و پپتید ها در محدوده‌ی ایزوالکتریک آنها است. کمترین میزان حل‌شوندگی (حدود ۳ تا ۱۰ درصد) در محدوده pH بین ٤ تا ٦ به‌دست آمد. هیدرولیز پروتئین‌ها با آنزیم پانکراتین به صورت قابل توجهی پارامتر حل‌شوندگی را بهبود بخشید. پس از هیدرولیز در pH برابر ۷ مقدار درصد حل‌شوندگی از ۲٦/٥۹ درصد برای کنسانتره پروتئین به ٤۸/٦۱ درصد افزایش یافت. حل‌شوندگی بیشتر در هیدرولیزات پروتئینی می‌تواند به پپتیدهای مولکولی کوچکتری مربوط باشد که توسط آنزیم پانکراتین تولید شده‌اند، از طرف دیگر هیدرولیز می‌تواند موجب بازشدن تاخوردگی مولکول‌های پروتئین شود و لذا هم آمینواسید های قطبی و غیر قطبی که در بخش‌های داخلی‌تر قرار داشته‌اند می‌توانند در سطح مولکول پروتئین قرار گیرند آمینو اسید های قطبی می‌توانند با مولکول‌های آب از طریق پیوندهای هیدروژنی و برهمکنش های الکترواستاتیک واکنش دهند که نتیجه این پدیده افزایش حل‌شوندگی است. یکی از دلایل کاهش حل‌شوندگی در pHبین ٤ تا ٦ می‌تواند به تعداد زیاد باندهای دی‌سولفیدی مربوط باشد که موجب انبوهش مولکول‌ها می‌شود. با عمل هیدرولیز آنزیم پانکراتین تا حدی این باندها ازاد می‌شوند و حل‌شوندگی بهبود پیدا میکند (ژانگ و همکاران ۲۰۱٦). بر اساس یافته‌های نیشیناری و همکاران (۲۰۱٤) محدوده ی با حل‌شوندگی پایین می‌تواند به دسته‌ی گلوبولین ها مربوط باشد و پروتئین‌ها و پپتیدهای با وزن مولکولی بالا در نقطه ایزوالکتریک رسوب می‌کنند و کمترین حل‌شوندگی را دارند. بر اساس نتایج حاصل از اگونگبنله و همکاران (۲۰۰۳) که کمترین میزان حل‌شوندگی پروتئین‌های کینوا را در pH برابر با ٦ به‌دست آوردند، پروتئین های کینوا در شرایط تقریباً اسیدی حل‌شوندگی نسبتاً بالایی دارند نشان دهنده‌ی آن است که این پروتئین‌ها می‌توانند در فرمولاسیون محصولات نوشیدنی کربناته و مواد غذایی کم اسید، مفید باشند. بر اساس یافته‌های السوهیمی و همکاران (۲۰۱٥) اکثر پروتئین‌های ایزوله شده از کینوا، پروتئین های اسیدی هستند و مقدار pH بهینه برای ماکزیمم حل‌شوندگی پروتئین در pH=10 است. ساپونین‌های موجود در دانه‌های کینوا تأثیر منفی بر حل‌شوندگی پروتئین دارند. پژوهش‌های انجام شده در رابطه با کینوا، السوهیمی و همکاران (۲۰۱٥) گزارش کردند حل‌شوندگی پروتئین با افزایش pH افزایش یافت و حداکثر مقدار حل‌شوندگی (معادل ۷٥/۲۱ درصد) در pH=10بود. برعکس حداقل میزان حل‌شوندگی (معادل ۲٥/٥۹ درصد) در pH=4 حاصل شد. در مقادیر pH بالا، بار منفی خالص روی پروتئین‌ها موجب دافعه میان پروتئینها و باز شدن انبوهش پروتئین‌ها با قرارگیری مولکول‌های آب میان مولکول‌ها می‌شود، در حالی‌که در مقادیر pH کمتر افزایش با ایجاد دافعه الکترواستاتیکی میان پروتئین‌ها و قرارگیری مولکول‌های آب میان زنجیره‌ها، حل‌شوندگی افزایش می‌یابد (یین و همکاران ۲۰۱۱) .



شکل ۲- تاثیر مدت زمان هیدرولیز کنسانتره پروتئینی کینوا (با استفاده از آنزیم پانکراتین) بر میزان درجه هیدرولیز (P≤0.05)

Figure 2 – Effect of different times of hydrolysis of quinoa protein concentrate using pancreatin enzyme on degree of hydrolysis parameter (P≤0.05)



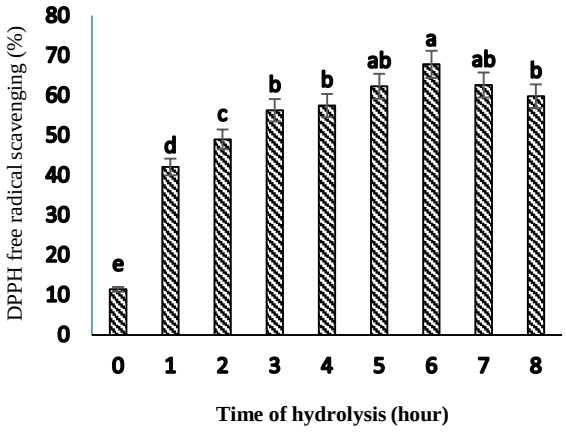
شکل ۳- درصد حلالیت هیدرولیزات پروتئینی کینوا حاصله از آنزیم پانکراتین (نمودار قرمز رنگ) و کنسانتره پروتئینی کینوا (نمودارآبی رنگ) در pH های متفاوت (P≤0.05)

Figure 3 - Solubility percent of hydrolyzed samples of quinoa proteins by pancreatin enzyme (red colour) and protein concentrate (blue colour) in different pH values, (P≤0.05)

بر اساس گزارشات مکینن و همکاران (۲۰۱٦) چنوپودین، که یک گلوبولین از نوع S۱۱ است، پروتئین اصلی موجود در کینوا بوده و با استخراج قلیایی و رسوب ایزوالکتریک می‌توان آن را جداسازی کرد. چنوپودین از زیر واحدهای ٤۹ و ٥۷ کیلو دالتونی تشکیل شده است. هر زیر واحد متشکل از یک زنجیره اسیدی و یک زنجیره بازی است که توسط یک پیوند دی سولفید مرتبط اند. این پروتئین‌ها نقطه ایزوالکتریک خود را بین pH حدود ٥/۰ و ٦/٥ دارند، یعنی جایی‌که آنها حداقل حل‌شوندگی را نشان می‌دهند.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال آزاد DPPH

در شکل ٤ نتایج حاصل از اندازه‌گیری وضعیت مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیزات پروتئینی کینوا حاصل از عملکرد آنزیم پانکراتین نشان داده شده است. پس از گذشت مدت زمان ۱ ساعت از هیدرولیز آنزیمی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش قابل ملاحظه ای داشته است و پس از آن تا مدت زمان ٦ ساعت به آرامی افزایش یافته (٦۷/۸ درصد) و نهایتاً پس از این زمان دچار کاهش شده است.



شکل ۴ - درصد مهار رادیکالهای آزاد DPPH توسط هیدرولیزات پروتئینی کینوا حاصله از آنزیم پانکراتین

Figure 4- DPPH free radical scavenging by quinoa protein hydrolyzate resulted from pancreatin enzyme

در این پژوهش پپتیدهای زیست‌فعال کینوا، به صورت مشخصی موجب احیای رادیکال DPPH شدند. ایجاد تغییرات ساختاری در پروتین هیدرولیز شده توسط آنزیم پانکراتین موجب می‌شود که خاصیت خاموش کنندگی رادیکال بیشتر شود. بدین گونه که با باز شدن ساختار در هم تنیده‌ی پروتئین و در نتیجه، الکترون‌دهی اجزای آمینواسیدی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند، این اجزا با رادیکال های آزاد واکنش می‌دهند و واکنش های زنجیره‌ای آنها را متوقف می‌کنند (پنگ و همکاران، ۲۰۱۰). سایتو و همکاران (۲۰۰۳) بیان کردند که در برخی پپتید ها وجود آمینواسید تیروزین درc ترمینال زنجیره موجب بیشتر شدن فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. قابل ذکر است خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال و عملکرد آنها به زمان هیدرولیز وابسته است؛ با پیشرفت هیدرولیز و عملکرد بیشتر آنزیم بر روی کنسانتره پروتئینی، برخی از پپتیدهایی که در مراحل اولیه هیدرولیز از خود خاصیت آنتی‌اکسیدانی نشان دادند شکسته شده و به نوعی تخریب می‌شوند (جامدار و همکاران، ۲۰۱۰). در مقابل کیم و همکاران (۲۰۰۱) گزارش کردند پس از طی مدت زمان ۳۰ روز نگهداری درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH به ۳۹ درصد کاهش یافت و علت این کاهش را می‌توان از دست رفتن ترکیبات زیست فعال موجود در پپتیدها بیان داشت. چرا که پپتیدهای فعال زیستی گونه‌های واکنش‌دهنده اکسیژن را خنثی می‌کنند و متعاقباً باعث مهار آسیب اکسیداتیو در سیستم‌های بیولوژیکی می شوند. با کاهش و تخریب این ترکیبات زیست‌فعال، از میزان مهارکنندگی اکسیداسیون کاسته می‌شود

نتیجه‌گیری کلی

در پروتئین کینوا اسیدآمینه‌های گلوتامیک اسید و لیزین بیشترین میزان آمینو اسید را تشکیل داده‌اند. در بررسی ویژگی‌های حل‌شوندگی وآنتی‌اکسیدانی مشاهده شد هیدرولیزات پروتئینی از عملکرد آنزیم نسبت به پروتئین کینوا فعالیت بهتری دارند. با توجه به خواص فیزیکوشیمایی، عملکردی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب پروتئین و هیدرولیزات پروتئینی دانه کینوا با استفاده از آنزیم پانکراتین می‌توان از آن به عنوان منابع پروتئینی مکمل غذایی زیست‌فعال در محصولات عملگرا استفاده کرد.

منابع مورد استفاده

حسن فامیان ف و پزشکی نجف‌آبادی ا، ۱۳۹٦. تولید نانوامولسیون حاوی لینولئیک اسیدکونژوگه (CLA) به روش تشکیل خود به خودی وغنی سازی شیر کم چرب پاستوریزه با آن. پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱٤٥-۱۳٥ (٤)۲۷.

مرندی الف، محمدی م، فتح الهی ع، ، پزشکی نجف‌آبادی ا ۱۳۹۷. غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه با استفاده از نانولیپوزوم حاوی لینولئیک اسیدکونژوگه(CLA). پژوهش‌های صنایع غذایی، ۱٦٥-۱٥۷ (٤)۲۸

Abugoch LE, Romero N, Tapia, CA, Silva J and Rivera, M, 2008. Study of some physicochemical and functional properties of quinoa (Chenopodium quinoa Willd) protein isolates. Journal of Agricultural and Food chemistry 56(12): 4745-4750.

Alashi AM, Blanchard CL, Blanchard CL, Mailer RG, Agboola SO, Mawson J, et al., 2014. Antioxidant properties of Australian canola meal protein hydrolysates. Food Chemistry 146: 500-506.

Bamdad F, Wu J, Chen L, 2011. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. Journal of Cereal Science 54(1): 20-28.

Berti C, Ballabio C, Restani P, Porrini M, Bonomi F and Iametti S, 2004. Immunochemical and molecular properties of proteins inChenopodium quinoa. Cereal Chemistry 81(2): 275-277.

De Castro RJS and Sato HH 2015. Biologically active peptides: Processes for their generation, purification and identification and applications as natural additives in the food and pharmaceutical industries. Food Research International 74: 185-198.

Duran NM, Spelzini D, Wayllace N, Boeris V and da Silva, FLB, 2018. A combined experimental and molecular simulation study of factors influencing interaction of quinoa proteins–carrageenan. International journal of biological macromolecules 107: 949-956.

Elsohaimy SA, Refaay TM and Zaytoun MAM, 2015. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. Annals of Agricultural Sciences, 60(2): 297-305.

Escuredo O, Martín, M. I. G., Moncada, G. W., Fischer S and Hierro, JMH, 2014. Amino acid profile of the quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) using near infrared spectroscopy and chemometric techniques. Journal of Cereal Science 60(1): 67-74.

Ferreira DS, Pallone JAL and Poppi RJ, 2015. Direct analysis of the main chemical constituents in Chenopodium quinoa grain using Fourier transform near-infrared spectroscopy. Food Control 48: 91-95.

Fischer S, Wilckens R, Jara J, Aranda M, Valdivia W, Bustamante L, Obal I, 2017. Protein and antioxidant composition of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) sprout from seeds submitted to water stress, salinity and light conditions. Industrial Crops and Products 107: 558-564.

Gallagher E, Gormley TR and Arendt EK, 2004. Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. Trends in Food Science & Technology 15(3-4): 143-152.

Gonzalez JA, Roldan A, Gallardo M, Escudero T and Prado FE, 1989. Quantitative determinations of chemical compounds with nutritional value from Inca crops: Chenopodium quinoa. Plant foods for human nutrition 39(4): 331-337.

Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V and 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.

James LEA, 2009. Quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*): Composition, chemistry, nutritional, and functional properties. Advances in food and nutrition research 58(1):1-31.

Kim SK, Kim YT, Byun HG, Nam KS, Joo DS and Shahidi F, 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. Journal of agricultural and food chemistry 49(4): 1984-1989.

Mäkinen OE, Zannini E, Koehler P and Arendt EK, 2016. Heat-denaturation and aggregation of quinoa (*Chenopodium quinoa*) globulins as affected by the pH value. Food Chemistry 196: 17-24.

Nishinari K, FangY, Guo S and Phillips GO, 2014. Soy proteins: A review on composition, aggregation and emulsification. Food Hydrocolloids 39: 301-318.

Nowak V, Du J and Charrondière UR, 2016. Assessment of the nutritional composition of quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*). Food Chemistr, 193: 47-54.

Ogungbenle HN, 2003. Nutritional evaluation and functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. International Journal of Food Sciences and Nutrition 54(2): 153-158.

Ogungbenle HN, Oshodi AA and Oladimeji MO, 2009. The proximate and effect of salt applications on some functional properties of quinoa (*Chenopodium quinoa*) flour. Pakistan Journal Nutrition 8(1): 49-52.

Peng X, Kong B, Xia X and Liu Q, 2010. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with alcalase. International Dairy Journal 20(5): 360-365.

Saito K, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T and Nokihara K, 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12), 3668-3674.

Sienkiewicz-Szłapka E, Jarmołowska B, Krawczuk S, Kostyra E, Kostyra H and Iwan M, 2009. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. International Dairy Journal 19(4): 258-263.

Silvestre MPC, Morais HA, Silva, VDM and Silva MR, 2013. Degree of hydrolysis and peptide profile of whey proteins using pancreatin. Nutrire (Impresso): Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição: 278-290.

Stikic R, Glamoclija D, Demin M, Vucelic-Radovic B, Jovanovic Z, Milojkovic-Opsenica D and Milovanovic M, 2012. Agronomical and nutritional evaluation of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa Willd.*) as an ingredient in bread formulations. Journal of cereal science 55(2): 132-138.

Turkut GM, Cakmak H, Kumcuoglu S and Tavman S, 2016. Effect of quinoa flour on gluten-free bread batter rheology and bread quality. Journal of Cereal Science 69: 174-181.

Vega-Gálvez A, Miranda M, Vergara J, Urib E, Puente L and Martínez EA, 2010. Nutrition facts and functional potential of quinoa (*Chenopodium quinoa willd.*), an ancient Andean grain: A review. Journal of the Science of Food and Agriculture 90(15): 2541-2547.

Vilcacundo R, Miralles B, Carrillo W and Hernández-Ledesma B, 2018. *In vitro* chemopreventive properties of peptides released from quinoa (*Chenopodium quinoa Willd.*) protein under simulated gastrointestinal digestion. Food Research International 105: 403–411.

Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J and Millán F,1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society 76(12): 1455-1460.

Vioque J, Clemente A, Pedroche J, Yust MM and Millgn F, 2001. Obtencion y aplicacionesde hidrolizad osproteicos. Journal of GrasasAceites 52: 132–136.

Wu HC, Chen HM and Shiau CY, 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food research international 36(9-10): 949-957.

Wu W, Yu PP, Zhang FY, Hx C, ZM J, 2014. Stability and cytotoxicity of angiotensin-Iconverting enzyme inhibitory peptides derived from bovine casein. Journal of Zhejiang University- Science B 15(2): 143-152.

Yin SW, Chen JC, Sun SD, Tang CH, Yang XQ, Wen QB and Qi, JR 2011. Physicochemical and structural characterisation of protein isolate, globulin and albumin from soapnut seeds (Sapindus mukorossi Gaertn.). Food chemistry, 128(2): 420-426.

Zhang F, Lin L and Xie J, 2016. A mini-review of chemical and biological properties of polysaccharides from Momordica charantia. International journal of Biological Macromolecules 92:246-253.

Zhao Q, Xiong H, Selomulya C, Chen DX, Zhong H, Wang S, Sun W and Zhou Q, 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food Chemistry 134: 1360-1367.

Živanović I, Vaštag Z, Popović S, Popović L and Peričin D, 2011. Hydrolysis of Hull-Less pumpkin oil cake protein isolate by Pepsin. Internation Journal of Biology Life Science 5(3): 30-34.

Journal of Food Research, 2022,32(1):123-135
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/FR.2021.41561.1759

Study of amino acid profile, solubility and antioxidant properties of quinoa protein hydrolysates

H Daliri [1], A Pezeshki Najafabadi [2] *, H Hamishehkar[3], M Mohammadi[4] and H Beyrami[5]

Received: September 2, 2020 Accepted: June 7, 2021
[1]PhD Student, Department of Food Science and Technology, University of Tabriz, Tabriz, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture University of Tabriz, Tabriz, Iran
[3] Professor, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[4]Assistant Professor, Department of Food Science and Engineering, Faculty of Agriculture, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
[5]Assistant Professor, National Salinity Research Center, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Yazd, Iran
[*]Corresponding Author: Email:akram.pezeshki@tabrizu.ac.ir

Introduction: Bio-based and nutritive food materials and compounds, especially plant-based ones are increasingly applied in different areas of research including food packaging, nutraceuticals encapsulation, functional foods, or food fortification.Quinoa with scientific name "Chenopodium quinoa Willd", unlike real grains that belong to the family Poaceae, is a pseudocereal belonging to the Amaranthaceae family of dicotyledonous or dual-leaf vegetables, and Its origin is in South America. Quinoa seeds also contain a variety of bioactive components such as polyphenols, carotenoids, and oleic acid, all of them are beneficial to human health. Quinoa, with its essential amino acids, protein content, and high protein bioavailability, can be a good alternative for plant and animal proteins in patients with celiac disease. Seventeen bioactive peptides with potential properties were isolated and identified from quinoa proteins. In recent years, much research has been done on use of quinoa and its bioactive peptides for its functional properties. Nowak et al., (2016) in study of nutrients in quinoa expressed that; Quinoa is an ancient agricultural product and can play an important role in food safety around the world. Fischer et al., (2017). In present study, amino acid sequence is extracted and quinoa protein is hydrolyzed using pancreatin enzyme and its functional properties such as emulsifying, foaming, solubility, antioxidant activity, etc. are investigated, so it can be used as a bioactive compound with nutritional and functional properties in food systems.

Material and methods: Quinoa seeds purchased from National Salinity Research Center dependent to Yazd Agricultural investigation organization (Yazd, Iran), Pancreatic enzyme (active at pH of 8.0 and temperature of 37 °C) and DPPH free radical prepared from Sigma Aldrich (Steinheim, Germany).

Chemical analysis, preparation of sample for protein hydrolysis

For preparation from quinoa seeds and defatting by hot method and solvent extraction whole seeds were washed for 4-5 times until there was no foam in the solution that was the sense of saponins, then seeds oven-dried at 45+1 ˚C until being dry, then whole seeds were ground into flour using Miller (Proctor Silex model EI60, UPC) with a sixty-mesh screen (Elsohaimy et al., 2015). Defatting from quinoa flour was performed with Soxhlet technique and by hot solvent of hexan (normal) at a raito of 1:4 seed flour to solvent in 9 hr. (Sánchez-Vioque et al., 1999).

Amino acids compositions

Protein samples hydrolyzed with HCI 6 N in time of 24 hours at 110 ˚C. The excitation wavelength was 330 nm and the emission spectra were recorded at 480 nm, The analysis was carried out with a gas flow rate of 1.3 ml/min at separation temperature of 35 °C.

Obtaining of quinoa protein concentrate at first, defatted quinoa flour was suspended in distilled water in ratio of 1:10. Then pH of solution was adjusted to 10.0 using NaOH at a concentration of 1 N and resulted solution was thoroughly stirred at room temperature for 60 min. During this time interval, pH was kept constant at set value to maximize proteins dissolution. The mixture was then mixed for 30 minutes at 9000 rpm at 4°C in a centrifugal refrigerator (K241R, Pro-Research, Centurion Scientific Ltd, UK), The solid phase was then separated and pH of the supernatant was reduced to 5 using 1 N hydrochloric acid to precipitate quinoa proteins. same centrifuge operation, with above conditions was repeated again. The centrifuge precipitate, which is protein concentrate, was lyophilized with freeze dryer (Christ, Germany). And were stored in freezer at -18 °C for subsequent experiments)Živanović et al., 2011).

Preparation of protein hydrolyzate from quinoa protein concentrate

To complete enzymatic hydrolysis process, first, protein isolate sample was dispersed and dissolved in 0.01 M phosphate buffer with pH = 7.4 for 30 minutes at a concentration of 5% (w/v). And constant stirring at ambient temperature allowed it to be completely hydrated. Then, initial solution of pancreatin enzyme was prepared in 0.01 M phosphate buffer, This solution was added to the protein isolated solution in ratio of enzyme to protein substrate equal to 2.5% (w/w). Reaction temperature for pancreatin enzyme was 40 °C and continuous stirring was performed at 200 rpm for 4 hours. After completion of enzymatic hydrolysis process, sample reaction medium was placed in a 95 °C water bath for 15 min to inactivate enzyme and stop reaction. After that solution was cooled to ambient temperature, centrifugation was performed for 15 minutes at 9000 rpm, then supernatant solution was separated and lyophilized at a temperature of -20 °C with an approximate pressure of 0.1 mB, and then stored at -20 °C until use .

Results and discussion: The results were in a completely randomized design with three replications and a significance level of 5% with a moisture content of 9.36, ash 2.29, crude fiber 4.6, protein 12.51, fat 5.36 and carbohydrate 71.48%. Results of chemical properties, shows quinoa seeds as an excellent potential food source with functional properties and this is due to quinoa essential nutrients content (such as proteins, carbohydrate, lipid and fiber). Result of present study is in agreement with (James, 2009), which in case quinoa seeds had about 11.2% moisture, 13.2% protein, 9% crude fiber, 1.2% total ash, and about 48.2% carbohydrate, however, this amount of carbohydrate was relatively less compared to present study. previous studies have shown that average protein content in quinoa seeds varies between 12% to 23%. The highest percentage of quinoa amino acids were glutamic acid and lysine, but there was a shortage of sulfur amino acids. The highest degree of hydrolysis (19.17%) was obtained after 180 minutes. Quinoa peptides had the lowest solubility in the isoelectric pH range and their solubility was increased in pH values below and above the isoelectric range. Quinoa bioactive peptides significantly reduced DPPH radical reduction and had high antioxidant activity (67.8% after 6 hours of hydrolysis and decreased to 59.8% after 8 hr).

Coclusion: Overall, this study suggests that pancreatin could be employed for hydrolysis of quinoa protein and its hydrolysate with functional properties could be possibly considered for food fortification or production of functional foods. Quinoa with high percentage of protein has favorable physicochemical, functional and antioxidant properties and the resulting peptides can be used as bioactive food sources in pragmatic products.

Keywords: quinoa, pancreatin, bioactive peptid, bioactive peptid, antioxidant activity