

## مقاله پژوهشی

## بررسی اثر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین اسپیرولینا پلاتنسیس

راحله ایروانی مهاجری<sup>۱</sup>، مهتا میرزایی<sup>۲</sup>، حمیده افقی<sup>۳\*</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران

۳- دانشیار، پژوهشکده زیست فناوری، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۳۰، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۲/۳، تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۸)

## چکیده

شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها شامل نوع آنزیم، زمان هیدرولیز و درجه هیدرولیز بر فعالیت زیستی محصول هیدرولیز پروتئین تاثیر گذار است. هدف از تحقیق حاضر، بررسی اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم با نسبت آنزیم به سوپسترا ۱:۱۰، زمان ۵ h، دمای ۳۷ °C بر میزان تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس استخراج شده با روش سونیکاسیون در شرایط توان ۲۰۰w، فرکانس ۲۰kHz و زمان ۵min بود. میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی با روش O-phethaldialdehyde و فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین، بر اساس دو مکانیسم مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در طی زمان هیدرولیز بررسی شدند. مقدار گروه‌های آمین آزاد بعد از ۵ h هیدرولیز از مقدار ۳/۲۷۲ μmolLeu/mgPro به مقادیر ۳/۶۵۳، ۴/۵۲۲ و ۳/۷۱۳ به ترتیب برای آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم رسید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئینی در طی زمان هیدرولیز افزایش یافت. به طوری که فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS بعد از ۱۵۰ min هیدرولیز به وسیله پپسین به ترتیب به مقادیر ۲۳ و ۱۱۰ μmolTrolox/mgPro رسید. درحالی که هیدرولیز به وسیله آنزیم کیموتریپسین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بعد از ۱۲۰ min به ترتیب به مقادیر ۱۸ و ۱۵۹ μmol Trolox/mgPro رساند و ترکیب دو آنزیم باعث افزایش فعالیت مهارکنندگی DPPH تا مقدار ۲۵ μmol Trolox/mgPro بعد از ۹۰ min و مهارکنندگی ABTS تا مقدار ۲۳۰ μmolTrolox/mgPro بعد از ۲۱۰ min شد. به طور کلی نتایج نشان دادند که هیدرولیز پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وسیله آنزیم‌های پپسین و کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم باعث تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌شود و آنزیم کیموتریپسین آنزیم موثرتری از پپسین و استفاده از ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین موثرتر از استفاده تکی از آنزیم‌ها است.

واژه‌های کلیدی: ریزجلبک، آنتی‌اکسیدان، هیدرولیز، پپتیدهای زیست فعال، اسپیرولینا پلاتنسیس.

\* نویسنده مسئول: ofoghi@irost.ir

## ۱. مقدمه

اسپیرولینا به دلایل ذکر شده منبع پروتئینی مناسبی برای تولید محصولات حاصل از هیدرولیز پروتئین می‌باشد. در این راستا مک میچ و همکاران طی بررسی تولید پپتیدهای زیست فعال از ایزوله دانه گوجه فرنگی توسط تخمیر بالاکتوباسیلوس پلانتراروم، نشان دادند پس از طی ۲۴ h از فرایند تخمیر، فعالیت آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد تا ۸۷٪ افزایش یافت [۱۱]؛ همچنین لیزبوا و همکاران طی بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های کاربردی اسپیرولینا از طریق بیومس تجزیه شده با آنزیم پروتامکس ۵۸۰، تولید پپتیدهای زیست فعال از بیومس اسپیرولینا را نشان دادند [۱۲]. با توجه به افزایش روز افزون مصرف جلبک اسپیرولینا و اثرات آنتی اکسیدانی این جلبک، بررسی‌های دقیق تر بر روی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین این جلبک ضروری به نظر می‌رسد. این پپتیدهای زیست فعال در مواد غذایی مختلف از طریق روش‌هایی همانند تخمیر، هیدرولیز با آنزیم‌های مختلف از جمله آنزیم‌های دستگاه گوارش ایجاد و مورد بررسی قرار گرفته است. لازم به ذکر است که ویژگی محصولات حاصل از هیدرولیز وابسته به شرایط هیدرولیز و نوع آنزیم می‌باشد. بنابراین در تحقیق حاضر اثر آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت آنتی اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین میکروالگ اسپیرولینا پلانتنسیس مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲. مواد و روش‌ها

## ۲.۱. تهیه زیست توده جلبک اسپیرولینا پلانتنسیس

سلول جلبک به شکل کشت تازه از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه گردید و در ۲ میلی لیتر محیط کشت زاروک- حاوی بوریک اسید، منیزیم کلراید ۴ آبه، روی ۲ سولفات ۷ آبه، مس ۲ سولفات و آمونیوم هپتا مولیبدات ۴ آبه- به مدت ۱۴ day در ۳۷ °C کشت داده شد. سلول میکروالگ در انتهای فاز لگاریتمی رشد، با استفاده از سانتریفوژ مدل 320R ساخت شرکت UNIVERSAL، کشور آلمان با دور  $3000 \times g$ ، به مدت ۱۵ min در دمای ۴ °C از محیط کشت جداسازی شد. برای اطمینان از جداسازی محیط کشت، نمونه ۳ بار با آب مقطر استریل شستشو داده و زیست توده تولیدی در دستگاه خشک کن انجمادی مدل GT3 ساخت شرکت VAC LYO کشور آلمان، لیوفیلیزه شد. پودر لیوفیلیزه حاصل شده در دمای ۴ °C برای

زیست توده میکروالگ می‌تواند به‌عنوان یک منبع پروتئینی در رژیم غذایی انسان و حیوان مورد بررسی قرار گیرد و گونه اسپیرولینا پلانتنسیس و اسپیرولینا ماکسیما مهم‌ترین میکروالگ‌های شناسایی شده است که به‌عنوان مکمل غذایی یا غذای کامل رژیم غذایی انسان و یا آبریان پرورشی و طیور استفاده می‌شود [۱، ۲]. ارزش تغذیه‌ای بالای اسپیرولینا در مقایسه با برخی از باکتری‌ها به دلیل محتوای کم - در حدود ۰.۴٪ اسید نوکلئیک و کیفیت بالای اسیدآمین‌های آن می‌باشد که به‌وسیله سازمان غذا و کشاورزی آمریکا تایید شده، به‌طوری‌که در سال ۱۹۷۷ سازمان غذا و داروی آمریکا میزان حداکثر جذب روزانه آن را برای هر فرد ۱/۳۵ g اعلام نمود [۳، ۴]. خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا به‌طور عمده به c فیکوسیانین، بتا کاروتن و ترکیبات فنولی نسبت داده می‌شود [۵]. آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که سرعت اکسیداسیون و اتواکسیداسیون را کاهش داده و یا انجام آن را به تعویق می‌اندازند. فیکوسیانین موجود در اسپیرولینا رادیکال آلکوکسیل، هیدروکسیل و پراکسیل را مهار کرده، تولید نیتريت را کاهش داده و پراکسیداسیون لیپید در میکروزوم‌های کبد را مهار می‌نماید؛ همچنین بسیاری از مطالعات برون و درون تنی نشان می‌دهند که اسپیرولینا به‌طور موثری استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد. این تاثیرات ناشی از وجود فیکوسیانین، بتاکاروتن، سایر ویتامین‌ها و مواد معدنی موجود در آن می‌باشد [۶، ۷]. به تازگی ترکیبات ناشی از هیدرولیز پروتئین به‌عنوان منبع آنتی اکسیدانی مورد توجه قرار گرفته اند؛ این ترکیبات هیدرولیز شده پروتئین می‌توانند گونه‌های اکسیژن فعال را غیرفعال و رادیکال‌های آزاد را مهار نمایند، فلزات انتقال دهنده پرواکسیداتیوها را شلاته نمایند، هیدروپراکسیدها را کاهش دهند، اکسیدان‌های خاص را با فرایند آنزیمی حذف نمایند؛ مشتقات هیدرولیز شده از پروتئین در مقایسه با سایر آنتی اکسیدان‌های غذایی بی نظیر می‌باشند چون می‌توانند به‌عنوان آنتی اکسیدان چند منظوره به کار روند و بسیاری از مسیرهای اکسیدانی در مواد اولیه غذایی را مهار نمایند. پپتیدهای آنتی اکسیدانی می‌توانند از پیش ساز پروتئینی خود در شرایط برون تنی و یا در سیستم دستگاه گوارش ایجاد گردند [۸، ۹]، از رایج ترین روش‌ها در تولید مشتقات و ترکیبات هیدرولیز شده پروتئینی، هیدرولیز آنزیمی می‌باشد [۱۰]. جلبک

بهداد، کشور ایران، شد و ۱۰ min در شرایط تاریکی و در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ۲۵۰ μl محلول فولین رقیق شده به نسبت ۱:۱ با آب به هر نمونه اضافه و بلافاصله ورتکس شد. بعد از گذشت ۲۰ min میزان جذب نور در طول موج ۷۳۴ nm خوانده شد. از محلول استاندارد آلبومین سرم گاوی در غلظت‌های ۰-۲۰۰ μg/ml برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد و با استفاده از منحنی استاندارد، غلظت پروتئین در نمونه‌های مورد آزمون مورد بررسی قرار گرفت [۱۶].

#### ۲.۴.۲. تعیین میزان هیدرولیز آنزیمی به روش OPA

محلول ارتو فتال آلدئید از مخلوط ۲۵ cc سدیم تترا هیدرابورات ۱۰۰ mmol، ۲/۵ cc سدیم دیسولفات ۲۰٪، ۴۰ mg ماده ارتو فتال آلدئید در متانول و ۱۰۰ μl بتامرکاپتواتانول به حجم ۵۰ cc به صورت تازه تهیه شد. در زمان آزمایش، ۲۰ μl از هر یک از نمونه‌های پروتئینی برداشته و با یک سی سی از محلول آزمایش مخلوط شد. دو دقیقه زمان داده شد و سپس با دو سی سی آب مقطر مخلوط و جذب آن در ۳۴۰ nm قرائت گردید (از غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰، ۵۰۰، ۱۰۰۰، ۲۰۰۰، ۳۰۰۰، ۴۰۰۰، ۵۰۰۰، ۱۰۰۰۰، ۲۰۰۰۰، ۳۰۰۰۰، ۴۰۰۰۰، ۵۰۰۰۰ mg/l استاندارد ال-لوسین برای رسم منحنی لوسین استفاده شد) [۱۴].

#### ۳.۴.۲. سنجش فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

۲۰۰ میکرولیتر از هر یک از نمونه‌ها برداشته شد و ۱۸۰۰ μl محلول DPPH ۰.۰۲٪ تهیه شده در اتانول به نمونه اضافه شد و به خوبی به کمک ورتکس هم زده و به مدت ۳۰ min در تاریکی قرار گرفت. بعد از ۳۰ min میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ nm قرائت و با استفاده از رابطه درصد مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد (معادله ۱) گزارش شد. با استفاده از منحنی استاندارد ترولوکس (غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰۰)، فعالیت آنی اکسیدانی به صورت معادل ترولوکس به ازای میلی گرم پروتئین محاسبه و گزارش شد [۱۷].

(۱) = فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH (%)

کنترل جذب (%) - جذب نمونه (%)

کنترل جذب (%)

انجام مطالعات بعدی نگهداری شد [۱۳].

#### ۲.۲. استخراج پروتئین جلبک به روش سونیکاسیون

از دستگاه سونیکاتور مدل NO S-4000، ساخت شرکت PART کشور آمریکا، با قدرت ۲۰۰ w و فرکانس ۲۰ kHz، برای شکستن دیواره سلول میکرو الگ و آزادسازی پروتئین از سوسپانسیون ۸٪ زیست توده در آب مقطر استفاده شد. برای جلوگیری از افزایش دما در طی فرایند، نمونه در ظرف حاوی یخ قرار داده شد. پالس دهی به مدت ۵ بار و هر بار به مدت ۵ min و با فواصل زمانی یک دقیقه انجام شد. بعد از هر بار سونیکاسیون، سلول‌های رشته‌ای میکرو جلبک با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شدند. پس از شکست سلول‌های ریز جلبک، سوسپانسیون سلولی در ۳۰۰۰ ×g به مدت ۱۰ min و در دمای ۴ °C سانتریفیوژ گردید. محلول رویی لیوفیلیزه و جهت انجام مطالعات بعدی در فریزر ۱۸- °C نگهداری شد [۱۳].

#### ۳.۲. هیدرولیز آنزیمی محلول پروتئینی

محلول پروتئینی با غلظت ۸٪ به وسیله آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم در دمای ۳۷ °C و pH ۲ و ۷/۸ در شرایط بهینه فعالیت آنزیم‌ها، به مدت ۵ h هیدرولیز شد. نسبت آنزیم/سوبسترا ۱:۱۰ در نظر گرفته شد و هر ۳۰ min یکبار نمونه برداری انجام و جهت انجام آزمون‌های بعدی در فریزر با دمای ۲۰ °C نگهداری شدند. به منظور هیدرولیز با ترکیب دو آنزیم ابتدا هیدرولیز با آنزیم پپسین با نسبت آنزیم/سوبسترا ۱:۱۰ به مدت ۵ h انجام شد و بعد از غیرفعال کردن آنزیم اولیه حرارت دهی در دمای ۸۵ °C به مدت ۳۰ min، آنزیم کیموتریپسین با نسبت ۱:۱۰ اضافه و هیدرولیز به مدت ۵ h ادامه یافت. در پایان زمان هیدرولیز، آنزیم‌ها با حرارت دهی در دمای ۸۵ °C به مدت ۱۰ غیرفعال شدند [۱۵].

#### ۴.۲. آزمون‌ها

##### ۱.۴.۲. اندازه‌گیری میزان پروتئین به روش لوری

ریجنت A از ترکیب ۱ cc سولفات مس ۱٪، ۱ cc سدیم پتاسیم تارتارات ۲٪، ۴۹ cc سود ۰/۱ N و ۴۹ cc کربنات سدیم ۲٪ تهیه شدند. در زمان آزمایش، ۵۰۰ μl از نمونه پروتئینی با ۲/۵ cc از ریجنت A مخلوط و بلافاصله ورتکس ساخت شرکت

آنزیم بر میزان هیدرولیز پروتئین ریز جلبک اسپیرولینا می‌باشد. پیشرفت میزان هیدرولیز نمونه‌های تیمار شده با آنزیم پپسین نیز در شکل b-۱، نشان داده شده است. مطابق این نمودار، پیشرفت هیدرولیز در حضور آنزیم پپسین تا ۲۵۰ min روند افزایشی داشت و پس از آن تقریباً مقدار ثابت شده است. البته میزان این روند صعودی با شیب زیادی همراه نبود. نتایج نشان دهنده روند افزایشی و تاثیر مثبت آنزیم پپسین بر میزان پیشرفت هیدرولیز نمونه‌های میکرو جلبک تیمار شده با آنزیم پپسین می‌باشد. پیشرفت هیدرولیز نمونه‌های تیمار شده با ترکیب دو آنزیم و نمونه کنترل در شکل c-۱، نشان داده شده است. میزان پیشرفت هیدرولیز تا ۹۰ min روند افزایشی داشته است. پس از آن سرعت هیدرولیز کاهش یافته به گونه‌ای که تا زمان ۱۸۰ min پیشرفت هیدرولیز ثابت باقی می‌ماند. تفاوت معناداری بین میزان هیدرولیز صورت گرفته در نمونه‌های تیمار شده با ترکیب دو آنزیم و نمونه شاهد وجود دارد ( $p < 0.05$ ). نتایج نشان دهنده تاثیر ترکیب دو آنزیم بر افزایش میزان هیدرولیز ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس می‌باشد.

در شکل d-۱، میزان هیدرولیز نمونه‌های تیمار شده با آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم همزمان نشان داده شده است. تفاوت معناداری بین تیمارها در حضور آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم وجود دارد ( $p < 0.05$ ). همانگونه که در نمودار نشان داده شده در حضور آنزیم کیموتریپسین میزان هیدرولیز در حداکثر مقدار و در حضور آنزیم پپسین در حداقل مقدار بود، البته از زمان ۲۱۰ min تا پایان زمان هیدرولیز، میزان هیدرولیز نمونه‌ها در حضور آنزیم پپسین و ترکیب دو آنزیم تقریباً یکسان بوده و نمودار آنها بر هم منطبق گشته است. بالاترین میزان هیدرولیز پروتئین استخراج شده از جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس به وسیله آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم به ترتیب ۳/۶۵۳، ۴/۵۲۲ و  $\mu\text{mol Leu/mg Pro}$  ۳/۷۱۳ اندازه‌گیری شد. نتایج آزمون نشان دادند که آنزیم پپسین روند کندی در پیشرفت هیدرولیز داشته است.

میزان هیدرولیز شاخصی از باندهای شکسته شده در محصولات حاصل از هیدرولیز می‌باشد. یکی از روش‌های اندازه‌گیری این شاخص روش O-Phthalaldehyde می‌باشد. اساس این روش واکنش بین گروه آمین در آمینواسیدها و OPA می‌باشد.

#### ۴.۴.۲. سنجش فعالیت میزان مهار رادیکال‌های ABTS

محلول‌های ۷ mmol از ABTS و ۲/۴۵ mmol از پتاسیم پرسولفات تهیه شدند و به مدت ۱۶h در تاریکی قرار داده شد. محلول با فسفات بافر ۵ mmol،  $\text{pH} = 7.4$  تا حد جذب ۰/۷ رقیق و سپس جذب آن در ۷۳۴ nm خوانده شد. جهت بررسی نمونه‌ها یک سی سی از محلول تهیه شده با ۲۵  $\mu\text{l}$  از نمونه به خوبی ورتکس و مدت ۶ min در دمای اتاق نگهداری شد. میزان جذب محلول حاصل در ۷۳۴ nm با استفاده از معادله (۲) اندازه‌گیری و فعالیت مهار کنندگی رادیکال بر حسب درصد محاسبه گردید. از محلول استاندارد ترولوکس در غلظت‌های ۱۰ تا ۲۰۰  $\mu\text{mol}$  برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد [۱۸]. نتایج به صورت میکرومول ترولوکس به ازای میلی گرم ترولوکس گزارش شدند.

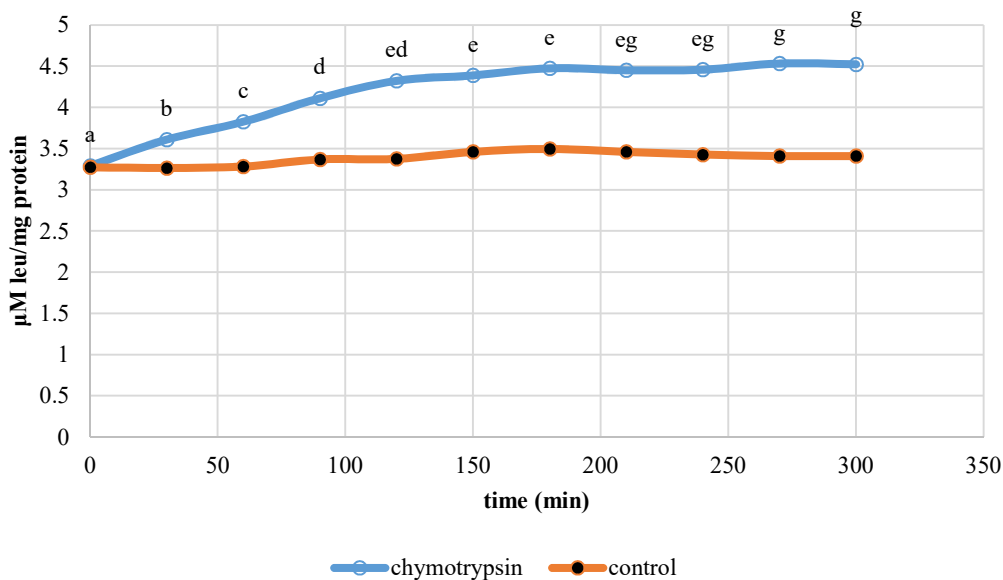
$$(2) \quad \text{فعالیت مهار کنندگی رادیکال ABTS (\%)} = \frac{\text{جذب کنترل (\%)} - \text{نمونه جذب (\%)}}{\text{جذب کنترل (\%)}}$$

### ۳. نتایج و بحث

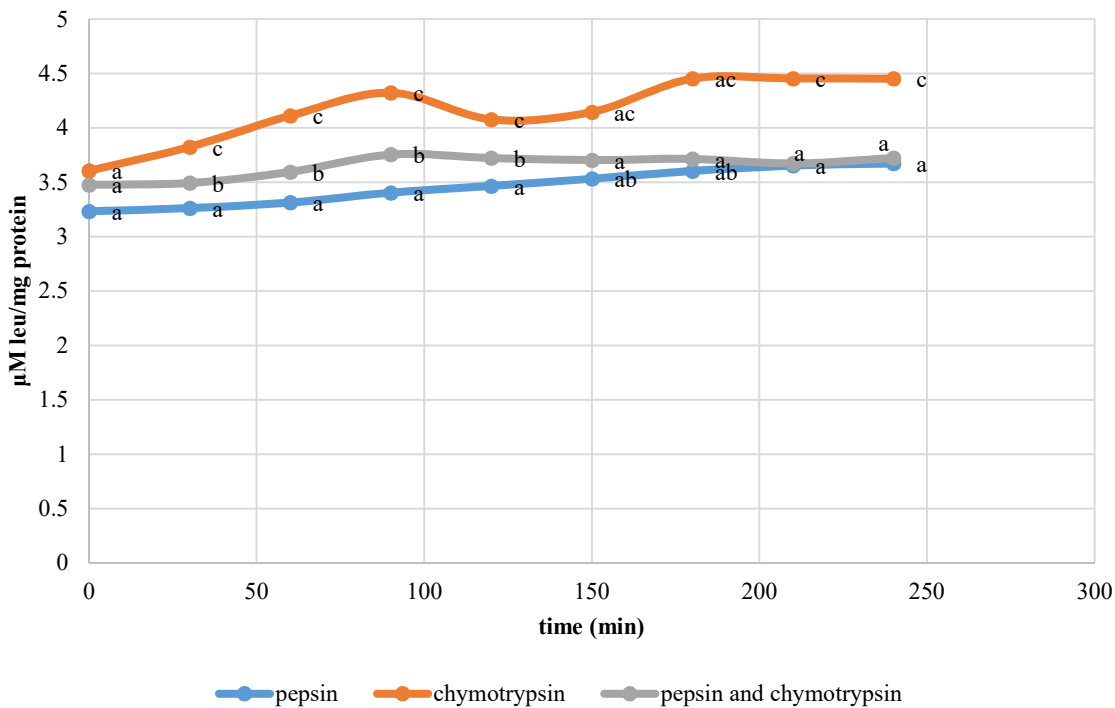
#### ۱.۳. بررسی پیشرفت هیدرولیز آنزیمی پروتئین ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس توسط آنزیم‌های کیموتریپسین و پپسین

در فرایند هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها عواملی نظیر نوع آنزیم و شرایط هضم از جمله pH، دما و زمان هیدرولیز آنزیمی از جمله عوامل موثر بر پیشرفت هیدرولیز آنزیمی و بنابراین تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌باشند. در این تحقیق، نمونه پروتئینی میکروالگ توسط دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین در دمای ۳۷ °C و pH ۲ برای آنزیم پپسین و ۷/۸ برای آنزیم کیموتریپسین، به مدت ۵ h هیدرولیز شدند.

پیشرفت هیدرولیز آنزیمی نمونه پروتئینی استخراج شده از میکروالگ، توسط آنزیم کیموتریپسین در شکل a-۱ نمایش داده شده است. میزان هیدرولیز در حضور آنزیم کیموتریپسین تا ۱۸۰ min روند افزایشی خوبی را نشان داد و پس از آن تقریباً میزان هیدرولیز ثابت باقی ماند. تفاوت معناداری بین میزان هیدرولیز صورت گرفته در نمونه‌های تیمار شده با آنزیم کیموتریپسین و نمونه شاهد وجود داشت ( $p < 0.05$ ) که نتایج نشان دهنده تاثیر



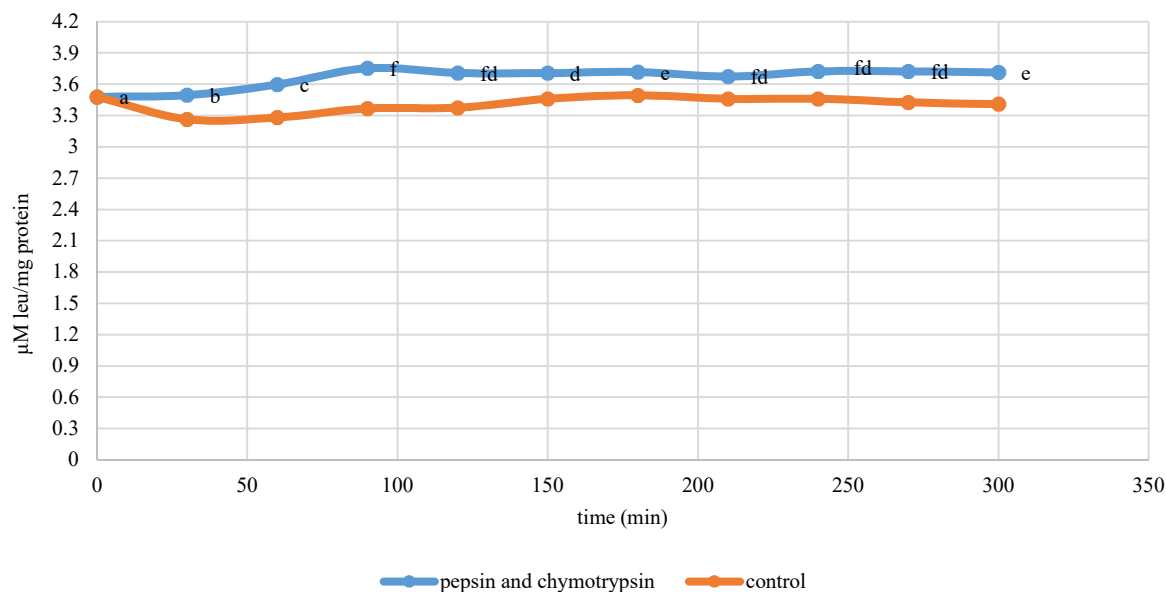
(a)



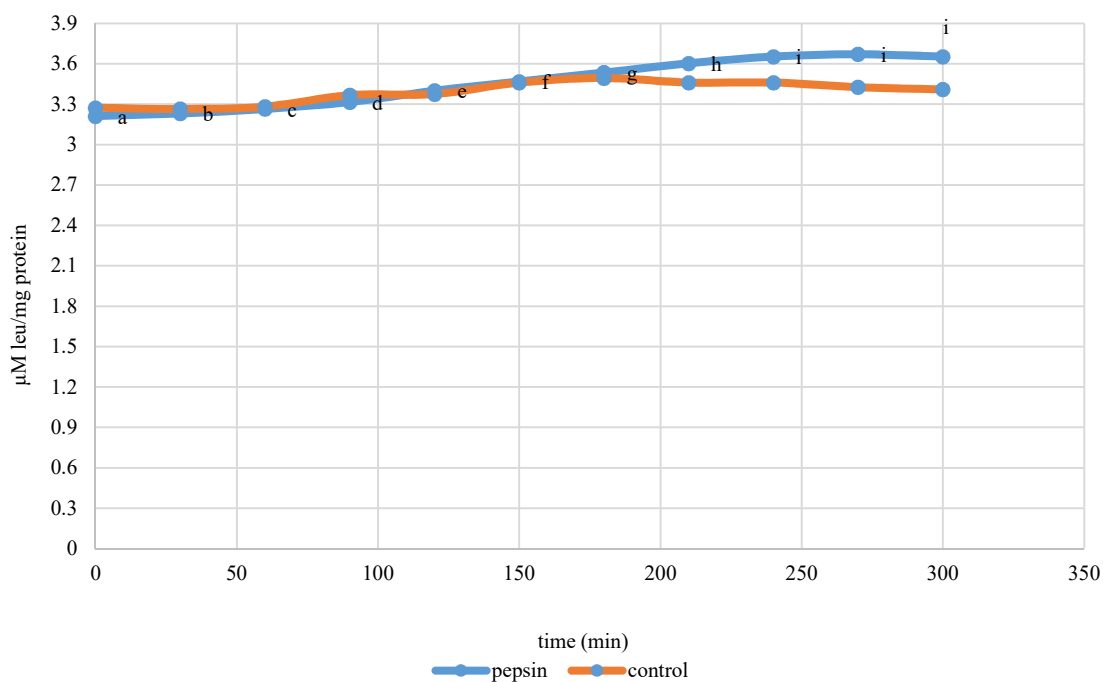
(b)

شکل (۱) بررسی پیشرفت هیدرولیز آنزیمی نمونه‌های تیمار شده با آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b)، ترکیب دو آنزیم (c) و مقایسه عملکرد سه تیمار آنزیمی کیموتریپسین، پپسین و ترکیب دو آنزیم (d). شکل‌های ارائه شده در شکل‌های A، B و C با نمونه‌های کنترل فاقد آنزیم (نمودارهای قرمز رنگ) مقایسه شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) در طی زمان‌های مختلف هیدرولیز می‌باشد.

**Fig. 1.** Evaluation of enzymatic hydrolysis progress in samples treated with chymotrypsin a), pepsin b), combination of two enzymes c) and comparison of performance of three chymotrypsin, pepsin and combination of two enzymes d). The figures presented in figures A, B and C are compared with the enzyme-free control samples (red diagrams). Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) during different hydrolysis times.



(c)



(d)

ادامه شکل (۱) بررسی پیشرفت هیدرولیز آنزیمی نمونه‌های تیمار شده با آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b)، ترکیب دو آنزیم (c) و مقایسه عملکرد سه تیمار آنزیمی کیموتریپسین، پپسین و ترکیب دو آنزیم (d). شکل‌های ارائه شده در شکل‌های A، B و C با نمونه‌های کنترل فاقد آنزیم (نمودارهای قرمز رنگ) مقایسه شده‌اند. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار ( $P < 0.05$ ) در طی زمان‌های مختلف هیدرولیز می‌باشد.

**Fig. 1.** Evaluation of enzymatic hydrolysis progress in samples treated with chymotrypsin a), pepsin b), combination of two enzymes c) and comparison of performance of three chymotrypsin, pepsin and combination of two enzymes d). The figures presented in figures A, B and C are compared with the enzyme-free control samples (red diagrams). Different letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) during different hydrolysis times.

تون پخته شده با آنزیم پروتئاز حاصل از اسپرژیلوس اوریزا دریافتند که بالاترین میزان درجه هیدرولیز به میزان ۲۵/۶۸٪ پس از طی زمان ۲/۵ h از هیدرولیز به دست آمد [۲۵].

### ۲.۳. بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

در طی هیدرولیز آنزیمی از نمونه‌های پروتئینی هیدرولیز شده به وسیله آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم، هر ۳۰ min یکبار و طی مدت زمان ۵h، نمونه برداری شده و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد آن به روش مهارکنندگی رادیکال DPPH بررسی شد.

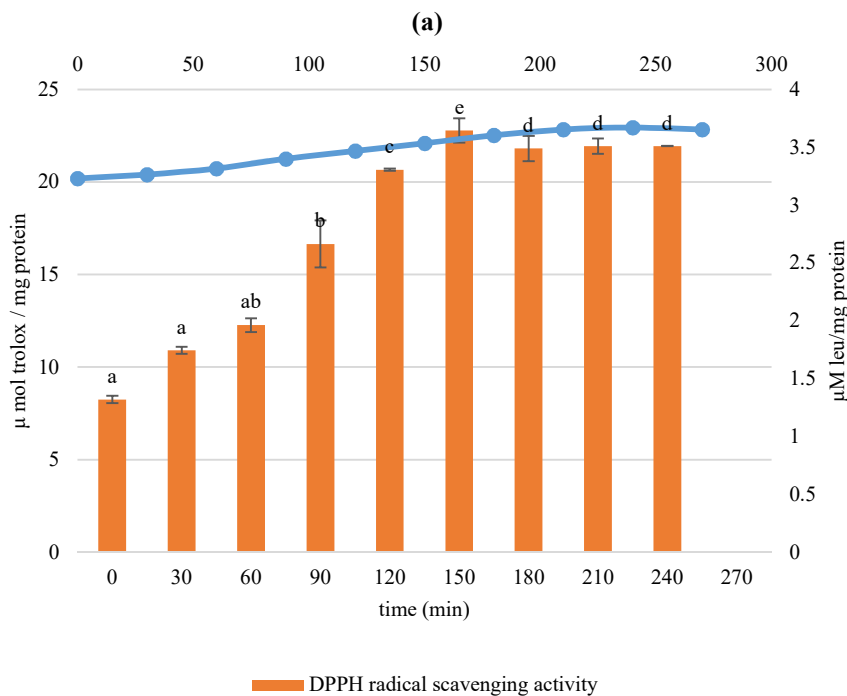
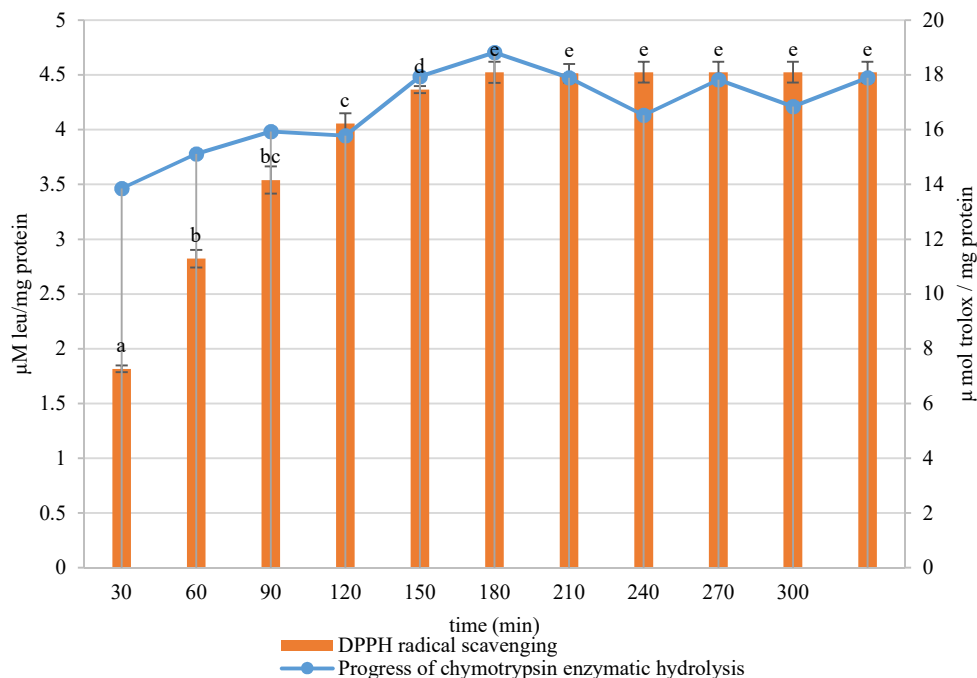
شکل ۲-a تاثیر میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین را نشان می‌دهد. در این نمودار، میزان هیدرولیز تا ۱۵۰ min روند افزایشی برابر با مقدار ۴/۵ μmol Leu/mgPro داشته و پس از آن میزان هیدرولیز تقریباً ثابت باقی مانده است. از طرفی میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH تا زمان ۱۲۰ min روند افزایشی برابر با مقدار ۱۸ μmol Trolox/mgPro نشان داد و پس از آن میزان مهارکنندگی ثابت باقی ماند.

شکل ۲-b بررسی تاثیر میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم پپسین را نشان می‌دهد، مطابق این نمودار، میزان هیدرولیز تا ۲۱۰ min روند افزایشی برابر با مقدار ۳/۶ μmol Leu/mgPro داشت و میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نیز تا ۱۵۰ min روند افزایشی برابر با مقدار ۲۳ μmol Leu/mgPro داشت و پس از آن مقداری ثابت شد؛ البته لازم به ذکر است که افزایش میزان هیدرولیز تا ۱۵۰ min روند افزایشی خوبی داشت و پس از آن مقدار این افزایش کمتر شد.

شکل ۲-c میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با ترکیب دو آنزیم را نشان داده و طبق نمودار میزان هیدرولیز تا ۹۰ min روند افزایشی برابر با مقدار ۳/۷ μmol Leu/mgPro داشته و پس از آن تقریباً ثابت باقی ماند؛ درحالی‌که میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH تا ۹۰ min روند افزایشی برابر با مقدار- ۲۵ μmol Trolox/mgPro نشان می‌دهد و پس از آن، میزان این مهارکنندگی تقریباً ثابت شده است.

نتایج آزمون نشان دادند آنزیم پپسین روند کندی در پیشرفت هیدرولیز داشته است. کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز در طی هیدرولیز مهم است زیرا بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین تولید شده وابسته به شدت و میزان هیدرولیز می‌باشد. اثر دما و زمان نیز بر آن تاثیر مهمی دارد. هیدرولیز آنزیمی در پروتئین‌ها سبب ایجاد پپتیدهای با خواص عملکردی خاص می‌گردد. تاثیر آن می‌تواند با در دسترس قرار گرفتن هرچه بیشتر گروه R فعال در آمینواسیدها مرتبط باشد. آنزیم‌های متفاوت بسیاری همانند پپسین، کیموتریپسین، آلکالاز، فلاووریزیم و غیره برای هیدرولیز پروتئین‌های مختلف گیاهی و حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است. نوع آنزیم‌های مصرفی بر نوع پپتیدهای تولیدی و خواص عملکردی آن‌ها تاثیرگذار می‌باشد [۱۸]. نوع آنزیم استفاده شده در هیدرولیز پروتئین‌ها نقش بسیار مهمی در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان ایفا می‌کنند، زیرا بر الگوی هیدرولیز پروتئین به‌طور مستقیم، تاثیر گذار هستند. فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها، بر ساین، مقدار و ترکیب آمینواسیدها در توالی‌های پپتیدی تولید شده و بنابراین بر فعالیت زیستی آن موثر است. آنزیم پپسین یک آسپارتیک اسید پروتئاز است که پیوند بین اسید آمینه‌های آروماتیک و هیدروفوبیک را می‌شکند. پپسین در تجزیه پیوندهای پپتیدی مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین کاملاً موثر است [۲۷] و آنزیم کیموتریپسین یک سرین پروتئاز است که پپتیدها و پروتئین‌ها را از بخش کربوکسیل تریپتوفان، تیروزین، فنیل آلانین، لوسین و متیونین می‌شکند. حضور آمینواسیدهای اسیدی در بخش دیگر از باند پپتیدی سرعت شکستن را کاهش می‌دهد. درحالی‌که همسایگی با آمینواسیدهای بازی سرعت شکستن را افزایش می‌دهد [۲۸].

کنگ و همکاران گزارش نمودند که تاثیر استفاده از ترکیب دو آنزیم پاپائین و پروتئاز قلیایی نسبت به استفاده تک تک این آنزیم‌ها سبب افزایش بیشتر میزان هیدرولیز در هیدرولیز جلبک *Navicula incerta* می‌گردد [۱۴]. همچنین بوساکار و همکاران با هیدرولیز ضایعات ماهی viscera با میزان نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۵٪ و دمای ۵۰°C، در زمان ۱۳۵ min به حداکثر میزان درجه هیدرولیز با میزان ۵۰٪ دست یافتند [۲۴]. در تحقیقی دیگر جاو و همکاران نیز با هیدرولیز آب خروجی از ماهی

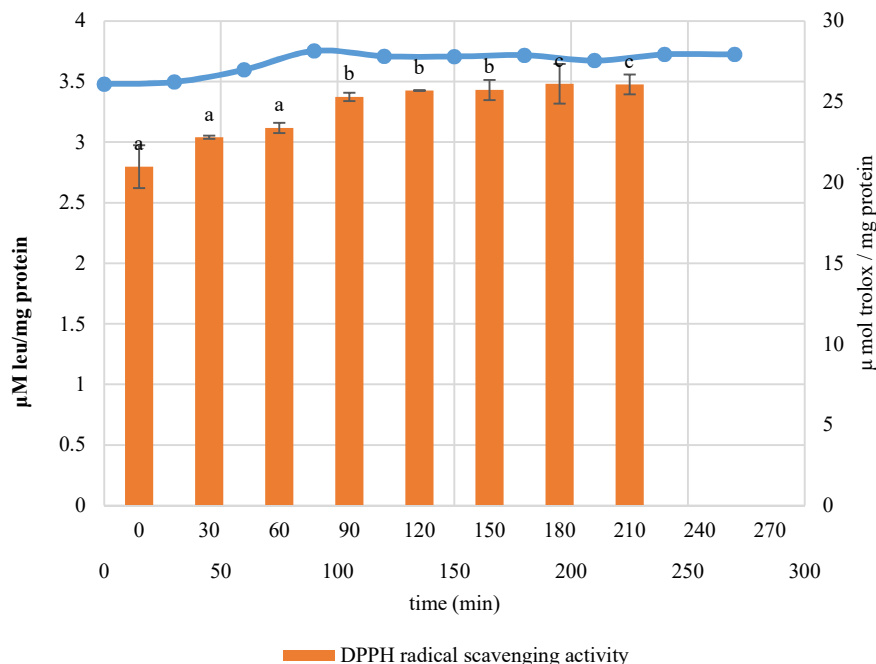


(b)

شکل (۲) مقایسه میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b) و ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین (c) و تولید پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH. اعداد میانگین سه تکرار هستند و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین فعالیت آن‌تی اکسیدانی نمونه‌ها در طی زمان هیدرولیز است.

**Fig. 2.** Comparison of the rate of enzymatic hydrolysis by chymotrypsin a), pepsin b) and the combination of pepsin and chymotrypsin c) and production of peptides with DPPH radical scavenging activity. The numbers are an average of three replications and dissimilar letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the antioxidant activity of the sample during hydrolysis.





(c)

ادامه شکل (۲) مقایسه میزان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b) و ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین (c) و تولید پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH. اعداد میانگین سه تکرار هستند و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها در طی زمان هیدرولیز است.

**Fig. 2.** Comparison of the rate of enzymatic hydrolysis by chymotrypsin a), pepsin b) and the combination of pepsin and chymotrypsin c) and production of peptides with DPPH radical scavenging activity. The numbers are an average of three replications and dissimilar letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the antioxidant activity of the sample during hydrolysis.

در این راستا، ونگ و همکاران گزارش نمودند در هیدرولیز صدف دوکفه ای آبی توسط آنزیم‌های نوتراز، پاپائین، پپسین و آلکالاز، بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در حضور پپتیدهای حاصل از تیمار با آنزیم نوتراز به میزان ۲۸/۸ بوده که در ساعت سوم از هیدرولیز رخ داده است و در ساعت چهارم هیدرولیز بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مربوط به پپسین بوده است [۲۲]. سامارایکا و همکاران طی بررسی هیدرولیز پروتئین ماهی هیک با آنزیم‌های والیداز و فلاورزیم میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH را پس از گذشت یک ساعت از زمان هیدرولیز به میزان  $262 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  و میزان جذب رادیکال‌های اکسیژن را  $225 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  گزارش نمودند. همچنین دریافتند

این اختلاف در نتایج می‌تواند ناشی از میزان پیشرفت هیدرولیز انجام شده بر روی ماده اولیه هیدرولیز شده باشد، همچنین ترکیب توالی آمینو اسیدهای پپتیدهای تولید شده، نقش مهمی در میزان فعالیت آنتی اکسیدانی دارند. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به سوبسترای پروتئین، ویژگی آنزیم و شرایط مورد استفاده از آنزیم دارد [۲۰]. رادیکال‌های DPPH با وجود این‌که جزء رادیکال‌های رایج ایجاد می‌شوند، ولی جزء رادیکال‌های پایدار هستند. ایجاد فعالیت آنتی اکسیدانی نتیجه هیدرولیز پروتئین‌ها و ایجاد پپتیدهای مختلف با توالی آمینواسیدهای مختلف می‌باشد که آمینواسیدها با ترکیبات حلقوی می‌توانند به ترکیبات رادیکال دارای کمبود الکترون، پروتون دهند و از اکسیداسیون جلوگیری کنند [۲۱].

میزان هیدرولیز و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS ارتباط مستقیمی وجود دارد و با افزایش میزان هیدرولیز، میزان مهارکنندگی نیز افزایش یافته است.

### ۴.۳. مقایسه میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در نمونه‌های هیدرولیز شده به وسیله آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم

به منظور مقایسه فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در نمونه‌های هیدرولیز شده به وسیله پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم، داده‌های مربوطه طی ۳۰۰ min هیدرولیز، مورد مقایسه قرار گرفته و نتایج به ترتیب در شکل‌های ۴a، ۴b و ۴c نشان داده شده است.

در شکل ۴-a میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم پپسین نشان داده شده است. همانطور که مشخص است، میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در اثر تیمار نمونه‌ها با آنزیم پپسین تا ۱۵۰ min روند افزایشی داشته است. به ترتیب فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS برابر  $23 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  و  $110$  و در هر دو مورد پس از آن، مقدار ثابت ماند. تفاوت معناداری میان میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در حضور تیمار با آنزیم پپسین وجود داشت ( $p < 0.05$ ).

در شکل ۴-b مقایسه میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین آمده است. همانطور که مشخص است تفاوت معناداری میان میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS بود؛ بیشترین میزان به ترتیب در ۱۲۰ min برابر  $18 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  و در ۱۲۰ min برابر  $159 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  در حضور تیمار با آنزیم کیموتریپسین وجود داشت ( $p < 0.05$ ).

در شکل ۴-c، طی ۳۰۰ min هیدرولیز نمونه‌ها مشاهده می‌گردد که در مقایسه بین دو آنزیم به تنهایی با هم بیشترین فعالیت مهارکنندگی DPPH مربوط به آنزیم کیموتریپسین با مقدار  $18 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  بود، ولی میانگین میزان مهارکنندگی توسط محصولات حاصل از هیدرولیز با ترکیب دو آنزیم در مقدار بالاتر  $25 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  قرار داشت.

که میزان فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین نمونه بالاتر از فعالیت آنتی اکسیدانی آلفاتوکوفرول و BHA در سیستم پراکسیداسیون لینولئیک اسید می‌باشد [۲۳].

### ۳.۳. بررسی فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد ABTS

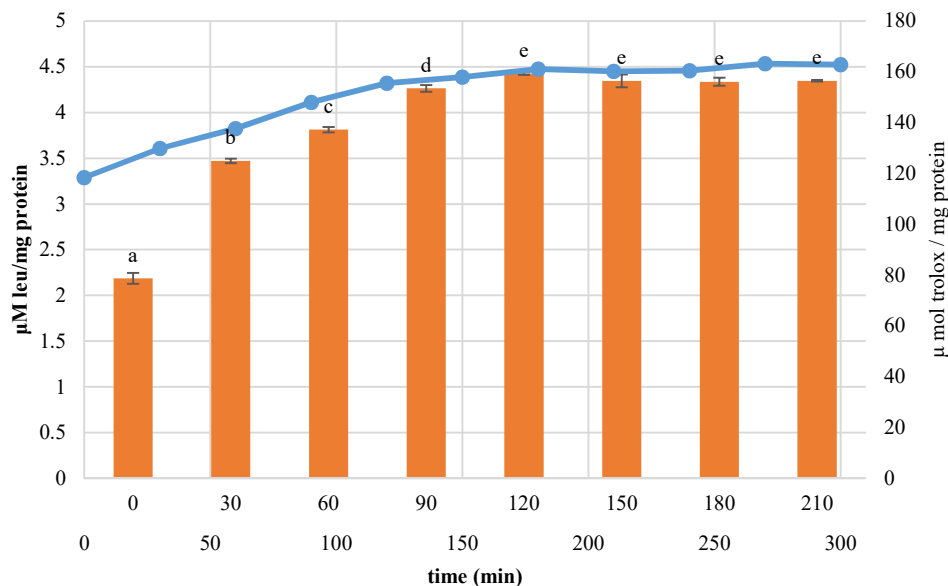
در طی هیدرولیز آنزیمی نمونه‌های پروتئینی به وسیله آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم، هر ۳۰ min یکبار و طی مدت زمان ۵h، از محصولات حاصل از هیدرولیز پروتئین نمونه برداری شده و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد آن به روش ABTS بررسی شد. نتایج در شکل ۳ (a,b,c) نشان داده شده است.

شکل ۳-a بررسی تاثیر میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم کیموتریپسین را نشان داده است که میزان مهار رادیکال‌های ABTS تا ۱۲۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $159 \mu\text{Trolox/mgPro}$  داشته و پس از آن ثابت باقی ماند. میزان هیدرولیز در حضور این آنزیم نیز تا ۱۵۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $4/5 \mu\text{mol Leu/mgPro}$  داشت و پس از آن مقدار ثابت شد.

در شکل ۳-b بررسی تاثیر میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با آنزیم پپسین آمده است؛ مطابق این نمودار، میزان هیدرولیز در حضور آنزیم پپسین تا ۲۱۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $3/6 \mu\text{mol Leu/mgPro}$  داشته و میزان مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS در حضور این آنزیم تا ۱۵۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $110 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  نشان داد.

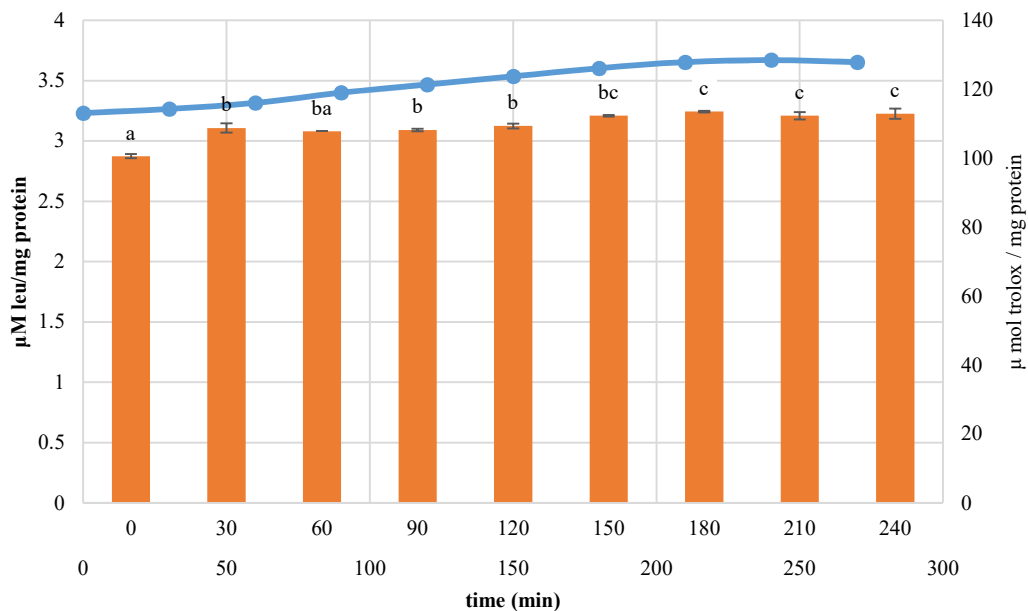
در شکل ۳-c بررسی تاثیر میزان هیدرولیز بر میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS در حضور پپتیدهای تولید شده در اثر هیدرولیز با ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین نشان داده شده و نتایج نشان می‌دهند که میزان مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS در نمونه‌های تیمار شده با ترکیب دو آنزیم تا ۲۱۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $230 \mu\text{mol Trolox/mgPro}$  داشته است. میزان هیدرولیز نیز در حضور ترکیب این دو آنزیم تا ۹۰ min روند افزایشی برابر با مقدار  $3/75 \mu\text{mol Leu/mgPro}$  نشان داده و پس از تغییر معنی داری مشاهده نشد.

همانگونه که نتایج نشان می‌دهند در تمامی این سه نمودار، بین



ABTS radical scavenging activity

(a)

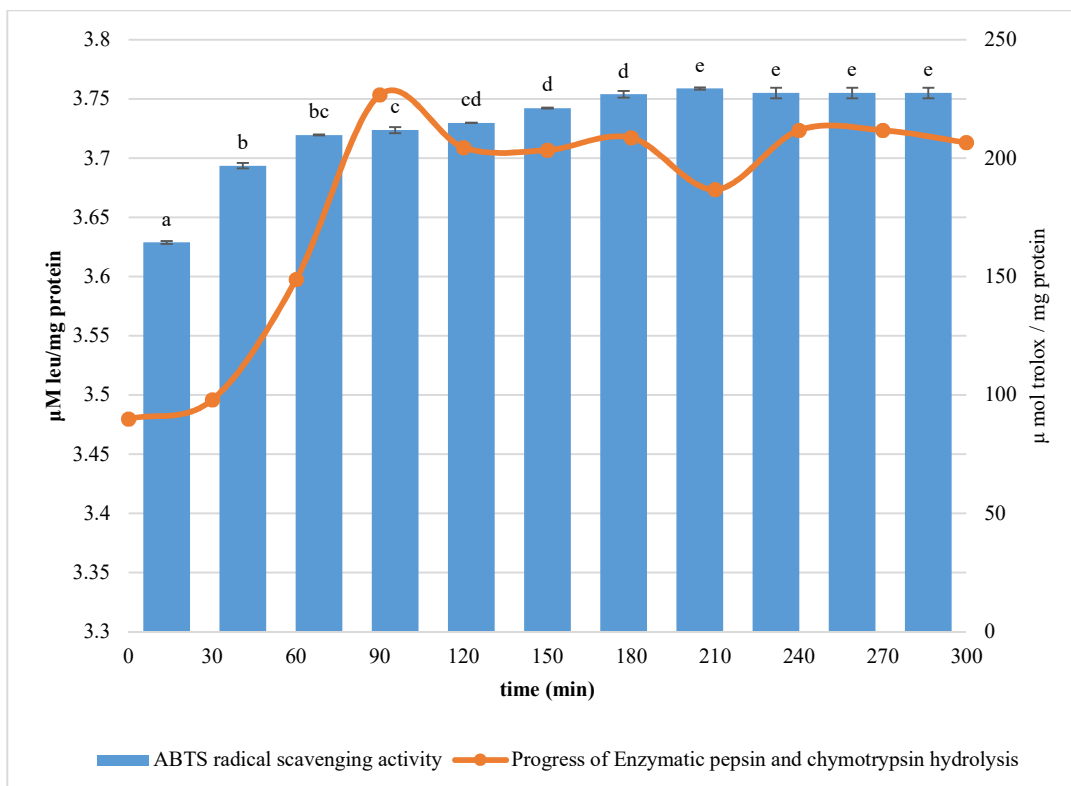


ABTS radical scavenging activity Progress of Pepsin enzymatic hydrolysis

(b)

شکل (۳) بررسی همزمان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b) و ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین (c) و تولید پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال های ABTS. اعداد میانگین سه تکرار هستند و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنی دار ( $p < 0.05$ ) بین فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها در طی زمان هیدرولیز است.

**Fig. 3.** Simultaneous study of the progress of enzymatic hydrolysis by the enzymes chymotrypsin a), pepsin b) and the combination of pepsin and chymotrypsin c) and the production of peptides with ABTS radical scavenging activity. The numbers are an average of three replications and dissimilar letters indicate significant differences ( $P < 0.05$ ) between the antioxidant activity of the sample during hydrolysis.



(c)

ادامه شکل (۳) بررسی همزمان پیشرفت هیدرولیز آنزیمی به وسیله آنزیم کیموتریپسین (a)، پپسین (b) و ترکیب دو آنزیم پپسین و کیموتریپسین (c) و تولید پپتیدها با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS. اعداد میانگین سه تکرار هستند و حروف غیر مشابه نشان دهنده اختلاف آماری معنی‌دار ( $p < 0.05$ ) بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها در طی زمان هیدرولیز است.

**Fig. 3.** Simultaneous study of the progress of enzymatic hydrolysis by the enzymes chymotrypsin a), pepsin b) and the combination of pepsin and chymotrypsin c) and the production of peptides with ABTS radical scavenging activity. The numbers are an average of three replications and dissimilar letters indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) between the antioxidant activity of the sample during hydrolysis.

دارای کمبود الکترون، پروتون دهند [۱۵]. علت تفاوت‌ها میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ترکیب دو آنزیم در مقایسه با آنزیم‌ها به تنهایی می‌توانند ناشی از تغییر سوبسترای پروتئینی و عدم کاربرد ترکیب دو آنزیم باشد. در اغلب موارد گزارش شده است که پپتیدهای با ابعاد کوچک‌تر و دارای اسیدآمینوهای آبریز و یا حلقوی توانایی بالاتری در مهارکنندگی میزان رادیکال‌های آزاد از خود نشان می‌دهند. کاربرد ترکیب دو آنزیم می‌تواند سبب کوچک‌تر شدن اندازه پپتیدها و افزایش قدرت مهارکنندگی آنها گردد. طبق تحقیقات پپتیدهای حاصله فعالیت مهار رادیکالی مرتبط با غلظت از خود نشان می‌دهند. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی وابسته به جرم مولکولی و ویژگی‌های ساختاری پپتیدهای حاصله می‌باشد. اکثر پپتیدهای با فعالیت

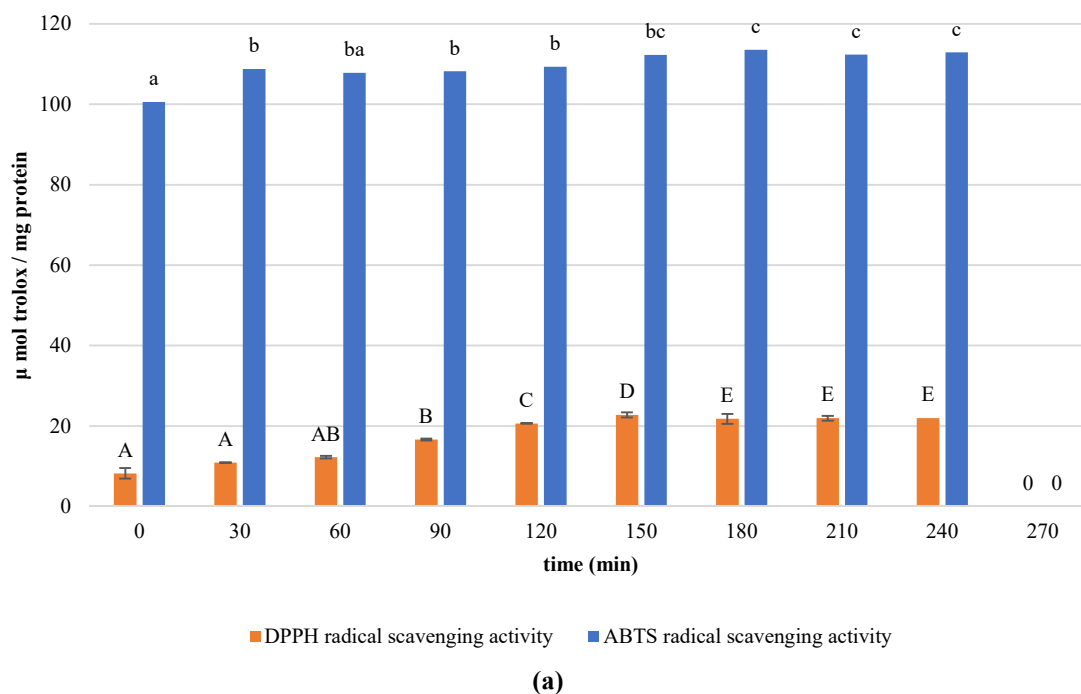
همانگونه که نتایج نشان دادند محصولات هیدرولیز به دست آمده از عملکرد هر دو آنزیم دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند که با توجه به ویژگی‌های پپتیدهای آنتی‌اکسیدان ارائه شده در منابع مختلف به نظر می‌رسد محصولات تولیدی حاوی آمینواسیدهای آبریز و پپتیدهای با وزن مولکولی کوچک باشند.

علاوه بر آن نتایج نشان دادند که میزان مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS بالاتر از رادیکال‌های DPPH بودند. رادیکال‌های آزاد ABTS/DPPH با وجود این که جزء رادیکال‌های رایج ایجاد در غذا نمی‌باشند ولی جزء رادیکال‌های پایدار می‌باشند. ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی نتیجه‌ی هیدرولیز پروتئین‌ها و ایجاد پپتیدهای مختلف با توالی آمینواسیدهای مختلف می‌باشد [۱۸]. آمینواسیدهای با ترکیبات حلقوی می‌توانند به ترکیبات رادیکاله

پانکراتین اندازه گیری شد ولی این ترکیبات پایداری طولانی مدت نداشته و پس از گذشت زمان ۳h اثر آنتی اکسیدانی آنها به شدت کاهش یافت [۱۹].

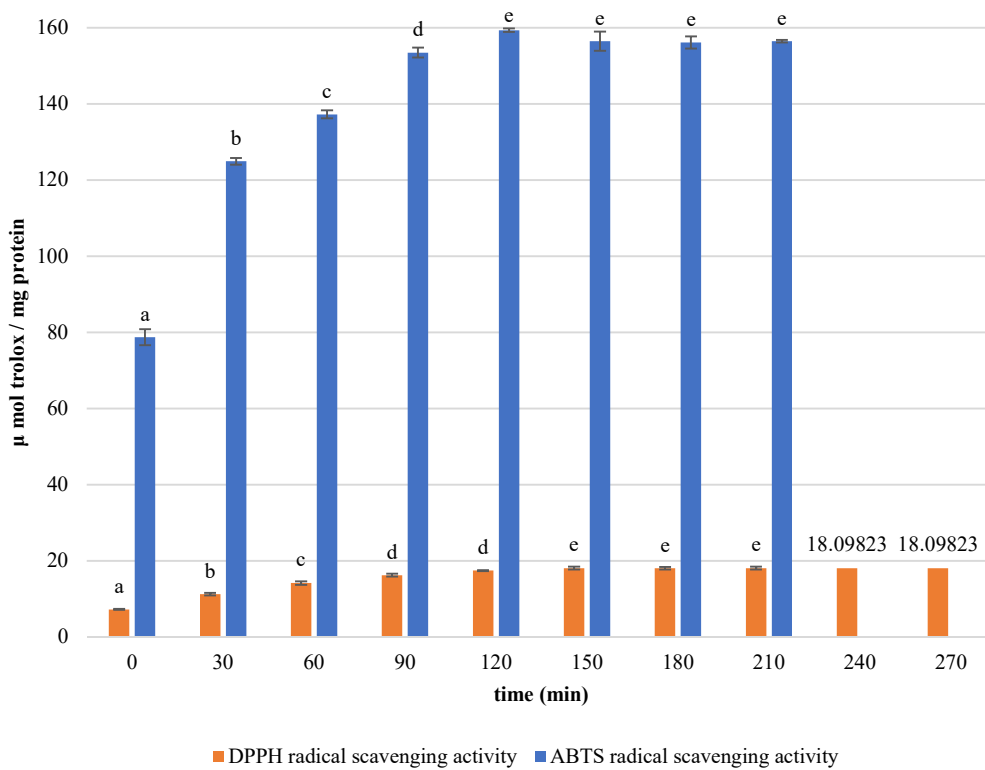
نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی محصول هیدرولیز پروتئین، نشان دهنده تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان است. گرچه ارتباط بین ساختار و عملکرد پپتیدها به روشنی مشخص نشده است اما بر اساس اطلاعات موجود در منابع تحقیقاتی مختلف و مطالعه ساختار پپتیدهای آنتی اکسیدانی که تا به حال جداسازی و شناسایی شده اند، احتمالاً پپتیدهای تولید شده در جریان هیدرولیز آنزیمی پروتئین میکروالگ، دارای اسیدآمینوهای هیدروفوب والین، لوسین، ایزولوسین، آلانین، اسید آمینه های گوگرد دار و آمینواسیدهای آروماتیک، تیروزین، هیستیدین، تربیتوفان و فنیل آلانین، در توالی پپتیدی هستند. پپتیدهای آنتی اکسیدان عمدتاً دارای وزن مولکولی کم، به طور عمده حاوی ۱۰-۲ آمینواسید، می باشند و علاوه بر آن عمدتاً دارای آمینواسید هیدروفوب در ناحیه N-ترمینال می باشند [۲۹].

آنتی اکسیدانی وزن مولکولی کمتری دارند. بخش R در پپتیدها و آمینواسیدهای موجود در این ناحیه نقش مهمی در فعالیت آنتی اکسیدانی دارند. توالی سیستئین اغلب از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری می کند. طی فعالیت آنزیمی تاخوردگی های ساختار پروتئینی باز شده و خاصیت آگریزی افزایش یافته و در نتیجه میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش می یابد. تعادل بین میزان خاصیت آگریزی و آبدوستی نقش مهمی در حلالیت و فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می کند [۲۱]. بیون و همکاران طی بررسی هیدرولیز روتیفرها با آنزیم های آلكالاز، نوتراز، پاپائین، پپسین، تریپسین و آلفا کیموتریپسین دریافتند که بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH مربوط به ترکیبات حاصل از هیدرولیز با آنزیم پپسین بود که هم راستا با این تحقیق نبود [۲۴]. هی و همکاران طی بررسی هیدرولیز دانه کلزا با آنزیم های پپسین، پانکراتین، ترمولیزین، پروتئیناز، آلكالاز و فلاوریزیم نشان دادند که بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH به وسیله ترکیب آنزیم های پپسین و

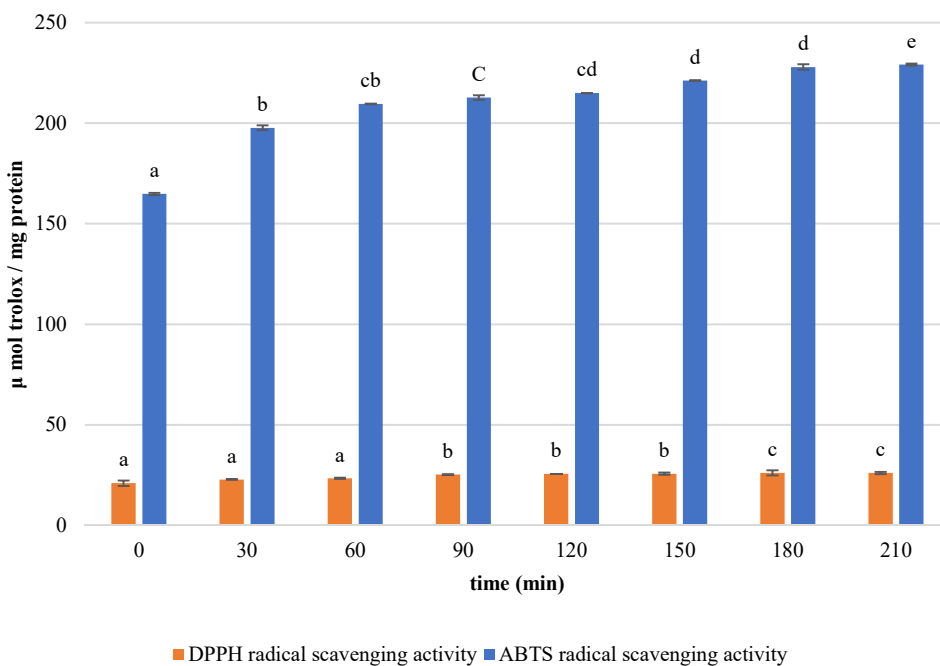


شکل (۴) مقایسه فعالیت مهارکنندگی رادیکال های DPPH و ABTS در طی زمان هیدرولیز در نمونه های هیدرولیز شده به وسیله آنزیم های پپسین (a)، کیموتریپسین (b) و ترکیب دو آنزیم (c)

Fig. 4. Comparison of DPPH and ABTS radical scavenging activity during hydrolysis in samples hydrolyzed by pepsin a), chymotrypsin b) and combination of two enzymes c)



(b)



(c)

ادامه شکل (۴) مقایسه فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH و ABTS در طی زمان هیدرولیز در نمونه‌های هیدرولیز شده

به‌وسیله آنزیم‌های پپسین (a)، کیموتریپسین (b) و ترکیب دو آنزیم (c)

**Fig. 4.** Comparison of DPPH and ABTS radical scavenging activity during hydrolysis in samples hydrolyzed by pepsin a), chymotrypsin b) and combination of two enzymes c)

یافت درحالی که در رابطه با تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم با افزایش میزان هیدرولیز، روند افزایشی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مشاهده نشد. نتایج نشان دادند که ترکیب دو آنزیم تاثیر بیشتری در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان نسبت به استفاده از تک آنزیم داشت. به طور کلی نتایج حاصل از این تحقیق نشان دادند که جلبک اسپرولینا به عنوان یک منبع ایمن خوراکی و غنی از پروتئین، دارای توانایی پپتیدی با فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد که با کمک هیدرولیز آنزیم‌های گوارشی نظیر پپسین و کیموتریپسین، دارای پتانسیل کاربرد در تولید غذاهای فراسودمند می باشد.

#### ۴. نتیجه گیری

در بخش اول از تحقیق میزان پیشرفت هیدرولیز طی مدت زمان ۵ h در اثر تیمار با آنزیم‌های پپسین، کیموتریپسین و ترکیب دو آنزیم مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند آنزیم کیموتریپسین برای هیدرولیز پروتئینی نسبت به آنزیم پپسین موثرتر بود و در زمان کوتاهتری درجه هیدرولیز به حداکثر مقدار خود رسید.

در بخش دوم از تحقیق میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS مورد بررسی قرار گرفت. در تیمارهای هیدرولیز شده با آنزیم پپسین با افزایش میزان هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH افزایش

#### منابع

- extracted from *Laminaria japonica*. *Int J Biol Macromol.* 42(2). 127-132.
- [9] Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F0, Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem.* 44(9). 2619-2623.
- [10] Yogianti, F., Kunisada, M., Nakano, E., Ono, R., Sakumi, K., Oka, N. C. (2014). Inhibitory effects of dietary *Spirulina platensis* on UVB-induced skin inflammatory responses and carcinogenesis. *J Invest Dermatol.* 134(10). 2610-2619.
- [11] Mechmeche, M., Kachouri, F., Ksontini, H., Hamdi, M. (2017). Production of bioactive peptides from tomato seed isolate by *Lactobacillus plantarum* fermentation and enhancement of antioxidant activity. *Food Biotechnol.* 31(2). 94-113.
- [12] Lisboa, C. R., Pereira, A. M., Costa, J. A. V. (2016). Biopeptides with antioxidant activity extracted from the biomass of *Spirulina sp.* LEB 18. *Afr J Microbiol Res.* 10(3). 79-86.
- [13] Kuddus, M., Singh, P., Thomas, G., Al-Hazimi, A. (2013). Recent developments in production and biotechnological applications of C-Phycocyanin. *Biomed Res Int.* 2013.9.
- [14] Mirzaei, M., Mirdamadi, S., Ehsani, M. R., Aminlari, M., Hosseini, E. (2015). Purification and identification of antioxidant and ACE-inhibitory peptide from *Saccharomyces cerevisiae* protein hydrolysate. *J Funct Foods.* 19. 259-268.
- [15] Kang, K. H., Qian, Z. J., Ryu, B., Kim, S. K. (2011). Characterization of growth and protein contents from microalgae *Navicula incerta* with the investigation of
- [1] Butcher, H. K., Bulechek, G., M Dochterman, J. M. M., Wagner, C. (2018). *Nursing Interventions classification (NIC)-E-Book.* Elsevier Health Sciences. pp 281-304.
- [2] Salehifar, M., Shahbazadeh, S., Khosravi-Darani, K., Behmadi, H., Ferdowsi, R. (2013). Possibility of using microalgae *Spirulina platensis* powder in industrial production of Iranian traditional cookies. *Iran J Nutr Sci Food Technol.* 7(4). 63-72.
- [3] Volkmann, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L., Sant'Anna, E. S. (2008). Cultivation of *Arthrospira (Spirulina) platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino-acid profile. *Braz J Microbiol.* 39(1). 98-101.
- [4] Belay, A., Gershwil, M. E. (2007). *Spirulina (Arthrospira)*. In *Spirulina in Human Nutrition and Health.* CRC Press. pp 11-35.
- [5] Gupta, M., Dwivedi, U. N., Khandelwal, S. (2011). C-Phycocyanin: An effective protective agent against thymic atrophy by tributyltin. *Toxicol Lett.* 204. 2-11.
- [6] Vijayabaskar, P., Shiyamala, V. (2012). Antioxidant properties of seaweed polyphenol from *Turbinaria ornata* (Turner) J. Agardh, 1848. *Asian Pac J Trop Biomed.* 2(1). S90-S98.
- [7] Yokozawa, T., Kim, H. Y., Nonaka, G. I., Kosuna, K. (2002). Buckwheat extract inhibits progression of renal failure. *J Agric Food Chem.* 50(11). 3341-3345.
- [8] Wang, J., Zhang, Q., Zhang, Z., Li, Z. (2008). Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions

- [28] Fruton, J. S. (2014). *Specificity and mechanism of pepsin action*. Paper presented at the Structure-Function Relationships of Proteolytic Enzymes: Proceedings of the International Symposium. Copenhagen June 16-18, 1969, No. 37 in the Series of the International Union of Biochemistry Sponsored Symposia.
- [29] Blow, D. M. (1976). Structure and mechanism of chymotrypsin. *Acc chem res*. 9(4). 145-152.
- [30] Kim, S. K. (Ed.). (2013). *Marine proteins and peptides: biological activities and applications*. John Wiley & Sons. pp 5-39.
- antioxidant activity of enzymatic hydrolysates. *Food Sci Biotechnol*. 20(1). 183-191. (Hartree, 1972).
- [16] Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W., Jeon, Y. J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresour Technol*. 96(14). 1613-1623.
- [17] Sheih, I. C. Wu. T. K., Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour Technol*. 100(13). 3419-3425.
- [۱۸] شیخ نژاد، ع؛ لباب پور، ع؛ معظمی، ن. (۱۳۹۴). افزایش تولید باکتری سیانو اسپیرولینا با کنترل هم زدن شیمیایی و ترکیب کشت محیط. *مجله پژوهش‌های گیاهان (مجله زیست شناسی ایران)*، جلد ۲۸، شماره ۲، ص ۳۵۳-۳۴۳.
- [19] JAO, C. L. KO. W. C. (2002). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. *Fish Sci*. 68(2). 430-435.
- [20] He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *J Funct Foods*. 5(1). 219-227.
- [21] Shahidi, F., Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *J AOAC int*. 91(4). 914-931.
- [22] Baratzadeh, M. H., Asoodeh, A., Chamani, J. (2013). Antioxidant peptides obtained from goose egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Int J Food Sci & Technol*. 48(8). 1603-1609.
- [23] Wang, Q., Huang, Y., Qin, C., Liang, M., Mao, X. Li. S.C. W. (2016). Bioactive Peptides from *Angelica sinensis* Protein Hydrolyzate Delay Senescence in *Caenorhabditis elegans* through Antioxidant Activities. *Oxid med cell longev*. 2016. 10.
- [24] Samaranayaka, A. G., Li-Chan, E. C. (2008). Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chem*. 107(2). 768-776.
- [25] Byun, H. G., Lee, J. K., Park, H. G., Jeon, J. K., Kim, S. K. (2009). Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. *Process Biochem*. 44(8). 842-846.
- [26] Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R. G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresour Technol*. 99(2). 335-343.
- [27] JAO, C. L. KO. W. C. (2002). 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. *Fish Sci*. 68(2). 430-435.



Research Article

## Effects of Enzyme Types and Hydrolysis Time on the Production of Antioxidant Peptides from *Spirulina Platensis*

Raheleh Iravani<sup>1</sup>, Mahta Mirzaei<sup>2</sup>, Hamideh Ofoghi<sup>3\*</sup>

1. M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Shahr-e-Qods Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3. Associate Professor, Department of Biotechnology, Iranian Research Organization for Science & Technology (IROST), Tehran, Iran.

### Abstract

Conditions of enzymatic hydrolysis including time, enzyme types, and degree of hydrolysis are impressive on biological activities of the protein hydrolysate. The aim of the present research was to consider the effect of pepsin, chymotrypsin and combination of two enzymes in E/S ratio of 1/10, at 37 °C for 5 hrs, also the time and degree of hydrolysis on the production of antioxidant peptides from *Spirulina platensis* protein. Protein was extracted through sonication treatment with the power of 200 W, frequency of 20 KHz and for 5 min. The progress of enzymatic hydrolysis and antioxidant activity were considered through the time of hydrolysis by respectively, O-phethaldialdehyde (OPA) and DPPH and ABTS radicals scavenging assays. The content of free amino groups reached from 3.272 to respectively, 3.653, 4.552, 3.713  $\mu\text{M}$  Leu/mg protein for samples hydrolyzed by pepsin, chymotrypsin, and combined enzymes. Antioxidant activity increased by the progress of hydrolysis and finally DPPH and ABTS radicals scavenging activity increased to 23 and 110  $\mu\text{M}$  Trolox/mg protein after 150 min hydrolysis by pepsin, and to 18 and 159  $\mu\text{M}$  Trolox/mg protein after 120 min hydrolysis by chymotrypsin. Hydrolysis by combined enzymes increased DPPH and ABTS radicals scavenging activities to respectively, 25  $\mu\text{M}$  Trolox/mg protein after 90 min and 230  $\mu\text{M}$  Trolox/mg protein after 210 min. Altogether, our results confirmed the production of antioxidant peptides through pepsin and chymotrypsin hydrolysis of. Also, our results showed that chymotrypsin was more effective compared to pepsin and a combination of two enzymes was more effective for producing antioxidant peptides from *Spirulina platensis*.

**Keywords:** Microalgae, Antioxidants, Hydrolysis, Bioactive peptides, *Spirulina platensis*.

\* Corresponding author: ofoghi@irost.ir