ارزیابی تاثیر آنزیم‌های میکروبی و وزن مولکولی بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده دانه جو

نگار تاجیک [۱]، پیمان آریایی [۲*]، لیلا نجفیان [۳]

۱- دانشجوی دکتری،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی،دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران

۳- استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ساری، دانشگاه آزاد اسلامی،ساری، ایران

* مسئول مکاتبه:Email:p.aryaye@yahoo.com

چکیده

یکی از منابع جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، پروتئین‌های هیدرولیزشده از منابع گیاهی می‌باشد. جو با توجه به سازگاری بالا به شرایط اقلیمی مختلف و قابلیت رشد در زمین‌های فقیر و نامساعد و همچنین به علت دارا بودن ویتامین‌های A، E، B_1، B_2، B_{12} و مواد معدنی و درصد پروتئین نسبتا بالا مورد توجه خاص است. بنابر این هدف از این تحقیق بررسی آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده دانه جو بوده است. بنابراین در این مطالعه پروتئین هیدرولیز شده دانه جو با استفاده با استفاده از آنزیم‌های تجاری آلکالاز و فلاورزایم، هیدرولیز و پپتیدهای زیست فعال که با استفاده از روش اولترافیلتراسیون غشایی با سه فرکشن شامل کمتر از ۳ کیلو دالتون، ۳-۱۰ کیلو دالتون و ۱۰-۳۰ کیلو دالتون جدا گردید. خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و ضدمیکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم برخوردار بود ($p<۰/۰۵$). نتایج نشان داد که فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیاکنندگی آهن در پروتئین هیدرولیز شده دانه جو توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی‌داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده فلاورزایم بود ($p<۰/۰۵$)، همچنین این پروتئین خاصیت ضدمیکروبی بالاتری بر روی باکتری‌های پاتوژن داشت و خاصیت ضدمیکروبی علیه باکتری *استافیلوکوکوس اروئوس* بالاتر از *اشیرشیاکلی* بود. پروتئین هیدرولیز شده دانه جو با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را دارا بود ($p<۰/۰۵$). نتایج کلی نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده دانه جو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی بالقوه بوده و می‌تواند یک منبع ایمن خوراکی و غنی از پروتئین جهت استفاده در صنایع غذایی، غذاهای فراسودمند و خوراک دام توصیه شود.

کلمات کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، آنتی اکسیدان، دانه جو، وزن مولکولی، ضد میکروبی

۱- مقدمه

هر روز اثرات زیان آور نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله عوارض سرطانزایی و خواص تراتوژنیک و نیز باقیمانده‌های سمی بر سلامت انسان به اثبات می‌رسد و تقاضا برای مصرف مواد غذایی که عمر ماندگاری آن‌ها به صورت طبیعی افزایش یافته، بیشتر می‌شود (۸). لذا محققین مواد غذایی درصدد جایگزینی آن‌ها با نمونه‌های طبیعی شده‌اند. یکی از منابع جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، پروتئین‌های هیدرولیزشده از منابع گیاهی و جانوری می‌باشد. پروتئین‌های هیدرولیز شده، ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می‌شوند (۲۸). پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء پروتئینی شناخته می‌شوند که در ساختمان پروتئین غیر فعال بوده و پس از آزاد شدن از طریق هیدرولیز، تخمیر، هضم شدن توسط آنزیم‌های گوارشی و...اثرات متعددی بروز می‌دهند. پپتیدهای زیست فعال حاوی ۲۰-۲ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون هستند که اثرات مثبتی بر سلامت مصرف کننده دارند. امروزه پپتیدهای زیست فعال به علت قابلیت استفاده در تهیه مواد غذایی فراسودمند مورد علاقه و توجه هستند. این پپتیدها به عنوان ترکیبات ضد اکسایش، ضدمیکروب، ضد سرطان، ضد فشار خون، ضد ترمبوز و... به شمار می‌روند و علاوه بر خواص سلامت بخشی، واجد ویژگی‌های عملکردی مانند امولسیون کنندگی و کف کنندگی، جذب آب و جذب روغن و ژلسازی می‌باشند (۳۲). این پپتیدها به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می‌شوند، در این میان هیدرولیز آنزیمی از روش‌های جدید در بیوتکنولوژی غذایی می‌باشد که فرآیندی قابل کنترل و ملایم است و منجر به نابودی آمینواسیدهای آزاد نمی‌شود (۲۲، ۲۸). پروتئین‌های هیدرولیز شده گیاهی همانند هسته انگور، دانه جو، شبدر، جوانه گندم کنجاله کنجد و کلزا و ... به دلیل قیمت مناسب و آلرژی‌زایی کم، در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۱۳، ۱۹، ۲۰، ۳۱).

گیاه جو به تیره‌ی گندمیان و جنس *Hordeum* تعلق دارد این جنس حدود ۲۵ گونه زراعی و وحشی دارد. جو از نظر میزان تولید رتبه‌ی پنجم را در میان غلات در دنیا دارد. ولی از نظر اهمیت، پس از گندم، ذرت و برنج چهارمین غله مهم دنیا به شمار می‌رود. از نظر علوفه‌ای به عنوان دومین گیاه در نظر گرفته می‌شود (۶). جو با توجه به سازگاری بالا به شرایط اقلیمی مختلف و قابلیت رشد در زمین‌های فقیر و نامساعد، نیاز کم به رطوبت و مصارف مختلفی که دارد، مورد توجه خاص است. دانه‌ی جو علاوه بر مصرف تغذیه‌ای انسان در کشورهای فقیر مانند کشورهای شمال آفریقا، در صنعت داروسازی و کارخانجات نشاسته‌سازی مورد استفاده قرار می‌گیرد. دانه‌ی این گیاه به عنوان منبع اصلی انرژی، پروتئین و فیبر برای نشخوار کنندگان و تقویت تولید تخم در مرغان تخم گذار به‌کار می‌رود. همچنین به علت دارا بودن ویتامین‌های A، E، B_1، B_2، B_{12} و مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، سدیم، منگنز، منیزیم، آهن و روی، و درصد پروتئین نسبتا بالا (۸ تا ۳۰ درصد) به اهمیت آن افزوده شده است. جو نسبت به سایر غلات برای دامنه‌ی وسیعی از شرایط محیطی سازگار می‌باشد، بنابراین در مناطقی که شرایط محیطی برای تولید سایر غلات عامل محدود کننده‌ای است، جو می‌تواند محصول قابل قبولی تولید کند (۶، ۱۸).

با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین هیدرولیز شده و در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده دانه جو تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه جو توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی این پپتیدها می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

دانه جو (رقم صحرا) از مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان خریداری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. آنزیم آلکالاز و فلاورزایم (جدول ۱) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجهٔ آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

جدول ۱: آنزیم های مورد استفاده در آزمایش

نام تجاری	منبع	دامنه pH	دامنه دما	میزان فعالیت (واحد آنسون)
آلکالاز	*Bacillus licheniformis*	٦ –١٠	٥٥ –٧٠	٢/٤
فلاورزایم	*Aspergillus oryzae*	٥ – ٧	٥٠ –٧٠	١/٥

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

۲-۲-۱-آماده سازی ایزوله پروتئین از دانه جو

دانه جو توسط آسیاب برقی (مدل کنوود، ساخت چین) پودر شد. سپس به منظور تهیه ایزوله پروتئینی ابتدا ۲۰۰ گرم پودر با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس pH در ۹ و با استفاده از سود ۰/۱ مولار تنظیم و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد همزده و با دور g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (Z36 HK, Labnet, Germany) و فاز رویی جمع آوری شد. pH فاز رویی با اسید هیدروکلریک ۱ مولار در ۳/۴ تنظیم و مخلوط در g ×۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. در انتها رسوب‌ها جمع آوری شدند و مجددا در آب به صورت سوسپانسیون در آمده و برای هیدرولیز آنزیمی در شرایط سرما نگهداری شد (۹).

۲-۲-۲- هیدرولیز ایزوله پروتئینی حاصل از دانه جو

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک (Comecta، اسپانیا) در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع‌آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشورکره) بصورت پودر در آمد (۳۱).

۲-۳- اندازه‌گیری میزان پروتیئن دانه جو

مخخقادیر پروتئین ابتدایی دانه جو، ایزوله پروتئنی و پروتئین هیدورلیز شده بر اساس روش کلدال نمونه‌ها هضم و سپس با تیتراسیون مقدار (N×۶.۲۵) مقدار کل پروتئین رسوبی در فاز آبی محاسبه شد (۲۲).

۲-٤- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و زمان ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۲۲):

فرمول ۱:

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰درصد / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-۵- ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۱۶).

۲-٦- جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترا فیلتراسیون با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (۳ تا ۳۰ کیلودالتون) انجام شد. سه فرکشن (کمتر از ۳ کیلو دالتون، ۳-۱۰ کیلو دالتون و ۱۰-۳۰ کیلو دالتون) جدا گردید. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Sigma 2 16kl - ، اسپانیا) شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۳۰ کیلودالتون مجددا با استفاده از فیلتر آمیکون ۳ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب، پپتیدهای کمتر از ۳ کیلو دالتون ، بین ۳ و ۱۰ کیلودالتون و ۱۰ تا ۳۰ کیلودالتون جدا شدند (۳۴).

۲-۷- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۷-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

این آزمایش بر اساس مهار DPPH که با اضافه کردن گونه‌های رادیکالی یا آنتی اکسیدان باعث بی رنگ شدن محلول DPPH می شوند، می‌باشد. DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه‌های فنیل در ساختارش به راحتی به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد میباشد . این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH در ۵۱۲ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی اکسیدان رابطه خطی دارد هر چه بر مقدار ماده آنتی اکسیدان افزوده شود DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد میل می کند. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد (۴).

فرمول ۲:

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH = (جذب شاهد - جذب نمونه / جذب شاهد) ×۱۰۰

۲-۷-۲- اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش آنتی‌اکسیدان‌ها نقش احیاءکنندگی دارند و باعث احیا آهن فریک به آهن فرو می‌شود. بسته به قدرت احیاءکنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می‌یابد (۴).

۲-۷-۳- بررسی مهار رادیکال آزاد (ABTS)

محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از ABTS، ۷ میلی مولار و ۸۸ میکرو مولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط درتاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی لیتر از محلول موجود با۴۰ میلی لیتر (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۷/۴، حاوی Nacl ۰/۲ مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS بتواند در۷۳۴ نانومتر عدد ۰/۰۲ ± ۰/۷۰ بدست آمد، ترکیب می شود. ۶۵ میکرو مولار نمونه محلول با ۶۵ میکرو مولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرو مولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ میکرو مولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر قرائت شد (۲۴).

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول ۳ زیر محاسبه شد:

فرمول ۳:

درصد مهار رادیکال آزاد ABTS = (جذب شاهد - جذب نمونه / جذب شاهد) ×۱۰۰

۲-۸- خصوصیات ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: *اشریشیاکلی* PTCC:۱۳۹۹ و *استافیلوکوکوس اورئوس* ۱۱۱۲ PTCC: که از مرکز تحقیقات و پژوهش علمی صنعتی ایران تهیه شد.

۲-۸-۱- آماده سازی باکتری

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. ابتدا طبق دستورالعمل و تحت شرایط استریل سر ویال‌ها شکسته و محتوی داخل محیط مایع مغذی محیط براث[1] تخلیه و سپس در لوله ها با پنبه پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد گرمخانه گذاری شدند تا باکتری‌ها رشد کرده و کدورت ایجاد کنند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر با کمک آنس استریل از محیط مایع برداشت کرده و روی محیط جامد مغذی نوترینت آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت تا کلنی‌های لازم ایجاد شدند. از این کلنی برای تهیه سوسپانسیون‌های استاندارد استفاده گردید. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندرد از کلنی‌های رشد یافته ۲۴ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار استفاده شد. سوسپانسیون حاصل برای مطابقت با نیم مک فارلند توسط اسپکتوفتومتر در طول ۶۲۵ نانومتر سنجیده شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (تعیین لگاریتم درصد احتمال رشد)، با مشخص شدن جذب نوری که معادل تقریبا $۱۰^{۸}$ CFU/g باکتری در هر میلی لیتر بود، لوله کووت حاوی تقریبا $۱۰^{۸}$ CFU/g باکتری در میلی لیتر مشخص گردید (۱۴).

[1] Brain Heart Infusion

۲-۸-۲- حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی پپتید

باکتری‌های مورد مطالعه غلظت تقریبی 10^8 CFU/g به میزان ۰/۲ میلی لیتر به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده شد. در مرحله بعد محلول‌های پپتید با استفاده از آب مقطر به نحوی تهیه شد که با ریختن مقدار ۰/۲ میلی لیتر از هرکدام از محلول‌ها درون لوله آزمایش‌های حاوی محیط کشت BHI آگار باکتری‌های مورد آزمایش (*اشریشیاکلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس*) ساخته شد. سپس لوله‌های آزمایش در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد برای باکتری‌ها گرمخانه‌گذاری و پس از ۲۴ ساعت پائین‌ترین غلظتی که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید به عنوان MIC در نظرگرفته شد. پس از تعیین MIC جهت تعیین MBC در شرایط کاملا استریل از محتویات ارلن‌هایی که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری هنوز شفاف بودند و کدورتی در آنها مشاهده نشده باشد به میزان ۰/۱ میلی لیتر در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت مناسب هر گونه باکتری کشت سطحی داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب رشد و عدم رشد باکتری‌ها بررسی و اولین غلظتی که در آن رشد مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته شد (۳۰).

۲-۹-تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر پروتئین

میزان پروتئین اولیه دانه جو برابر با ۰/۴۹±۱۲/۷۱ درصد و میزان پروتئین اولیه ایزوله دانه جو برابر با ۰/۹۳±۴۵/۲۴ بوده است. همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف مابین ۶۰/۴۳- ۹۳/۳۵ درصد بوده است. بنابراین ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده به علت دارا بودن مقادیر بالایی از پروتئین، دارای ارزش افزوده بوده و می‌تواند در فرمولاسیون غذای دام و همچنین در صنعت غذایی و دارویی استفاده شود (۱). همچنین مقادیر بالاتر پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با ایزوله دانه جو، به علت تجزیه پروتئین در حین فرآیند هیدرولیز می‌باشد و همچنین انجام سانتریفیوژ در حین فرآیند هیدرولیز، سبب جداسازی قسمت‌های غیر پروتئین نمونه می‌شود (۱۲). Guo و همکاران (۲۰۱۶) مقادیر پروتئین اولیه دو رقم مختلف جو را مابین ۱۱/۶- ۱۳/۳درصد اعلام نمودند که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی داشت (۱۵). Houde و همکاران (۲۰۱۸) به اندازه‌گیری مقادیر پروتئین کنسانتره آرد جو بدون چربی با استفاده از روش‌های قلیایی و آنزیمی پرداختند. آنها اعلام نمودند تیمار آنزیمی کنسانتره پروتئین با بالاترین محتوای پروتئین (۴۹/۰درصد) تولید نمودند (۱۷). Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر پروتئین جو را ۹/۵۶درصد اعلام نمودند (۱۸).

جدول ۲: مقادیر پروتئین، پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم / زمان هیدرولیز (دقیقه)	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	۷۵/۵٦±۰/۵۳^{Ac}	٦۰/٤۳±۰/۵۵^{Bc}
۲۰	۸۳/٦۷±۰/٤٦^{Ab}	۷۰/٤۳±۰/۵٦^{Bb}
۳۰	۹۳/۳۵±۰/۸۵^{Aa}	۸۳/۰۸±۰/۵۳^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۲- بررسی مقادیردرجه هیدرولیز

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز نشان داد که نوع آنزیم و زمان فرآیند تاثیر مستقیمی بر روند افزایشی درجه هیدرولیز داشت ($p<۰/۰۵$). به طوریکه مقادیر درجه هیدرولیز توسط هر دو آنزیم به‌طور پیوسته افزایش یافت، درجه هیدرولیز به طور قابل توجهی تحت تأثیر زمان فرآیند بود و طول زنجیره پپتیدی با درجه هیدرولیز نسبت عکس دارد بنابراین افزایش درجه هیدرولیز باعث کوتاه‌تر شدن طول زنجیره پپتیدی و کاهش توزیع وزن مولکولی می‌شود و در نتیجه باعث شکسته شدن نوارهای پپتیدی و افزایش اسیدهای آمینه آزاد می‌شود (۲، ۲۷). در بین دو آنزیم، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز درجه هیدرولیز بالاتری را در تمامی زمان‌های هیدرولیز نشان داد ($p<۰/۰۵$). علت این امر ممکن است عملکرد دو آنزیم را در قابلیت آلکالاز در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد بیان کرد (۲۲، ۲۹).

جدول ۳: مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم / زمان هیدرولیز (دقیقه)	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	۱٤/۱۰±۰/٤٤^{Ac}	۱۰/۷۵±۰/٤۳^{Bc}
۲۰	۲۰/۲٤±۰/۸۰^{Ab}	۱٦/۱۹±۰/۱۷^{Bb}
۳۰	۲۸/۹٤±۰/۸٦^{Aa}	۲۰/٤۰±۰/۵۵^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۳- ترکیب اسید آمینه

آنزیم‌های پروتئولیتیک پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچک متشکل از ۲-۲۰ اسید آمینه تجزیه می‌کند. وزن مولکولی، طول و توالی پپتیدها و ترکیب اسید آمینه آنها بر خواص پپتیدهای زیست فعال تأثیر می‌گذارد. هیدرولیزهای پروتئینی شامل آمینو اسیدهای آزاد و پپتیدهای با زنجیره کوتاه هستند که دارای ارزش غذایی و خواص زیستی مفیدی دارد (۲۵). عملکرد پروتئین‌های هیدرولیز شده

به ترکیب اسید آمینه آن بستگی دارد. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد، که میزان اسیدهای آمینه آبگریز آزاد (HAA) تحت تأثیر نوع پروتئاز قرار دارد. به طوریکه مقادیر HAA در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز برابر با **۴۱/۹۴**درصد و برای آنزیم فلاورزایم برابر با **۳۹/۵۲**درصد بوده است. در مجموع اسیدهای آمینه‌ای که دارای خواص آبگریز هستند، نقش مهمی در روند بازدارندگی رادیکال‌های آزاد دارند. این امر به دلیل توانایی اسیدهای آمینه آبگریز در افزایش دسترسی به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش دسترسی رادیکال‌های آزاد در سلول‌های هدف رخ می‌دهد (۱۱). Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر HAA پروتئین جو را **۳۷/۸۶**درصد اعلام نمودند که به نظر می‌رسد پس از هیدرولیز پروتئین مقادیر HAA افزایش می‌یابد (۱۸). بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری در ارتباط با هر دو آنزیم، لوسین (آنزیم آلکالاز ۶/۹۹درصد و آنزیم فلاورزایم ۶/۱۵درصد) و بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری گلوتامیک اسید (آنزیم آلکالاز ۱۹/۲۵درصد و آنزیم فلاورزایم ۱۸/۷۵درصد) بود. Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر لوسین و گلوتامیک اسید، پروتئین جو را به ترتیب ۳/۱۳ و ۸/۸۹درصد اعلام نمودند (۱۸). بر اساس توصیه های FAO/WHO (1990) در مورد پروتئین‌های هیدورلیز شده تنها اسیدهای آمینه لایزین و فنیل آلانین دارای محدودیت نسبت به پروتئین های حیوانی بود (۱۰)، بنابراین پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد از کیفیت غذایی مناسبی برخوردار باشد و می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئین در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۰).

جدول ٤: ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	فلاورزایم	FAO/ WHO, 1990
هیستدین[1]	۲/۹۹	۲/۵۵	
ایزو لوسین[1]	۳/۵۸	۳/۲۵	۲/۸۰
لوسین[1]	٦/۹۹	٦/۱۵	٦/٦۰
لایزین[1]	٤/۹۹	٤/۵۸	۵/۸۰
متیونین[1]	۲/۵٦	۲/٤۱	
فنیل آلانین[1]	۵/۹۹	۵/۵۵	٦/۳۰
تروئنین[1]	۳/۵۹	۳/٤۵	۳/٤
والین[1]	٤/۵۵	٤/۰۱	۳/۵
آسپارتیک اسید	۷/۳۵	۷/۹۹	
آرژنین	٤/۵۹	٤/۷۹	
پرولین	۱۰/۹۷	۱۰/۱۱	
سرین	۷/۵۵	۸/۵۹	
آلانین	٤/۲۵	٤/۰۵	
سیستئین	۲/۲۹	۳/۵۵	
گلوتامیک اسید	۱۹/۲۵	۱۸/۷۵	
تیروزین	۳/۰۵	۳/۹۹	۱/۱
گلایسین	۵/۲۵	٤/۹۹	
HAA[2]	٤۱/۹٤	۳۹/۵۲	
میزان اسید آمینه کل	**۹۹/۷۹**	**۹۸/۷٦**	

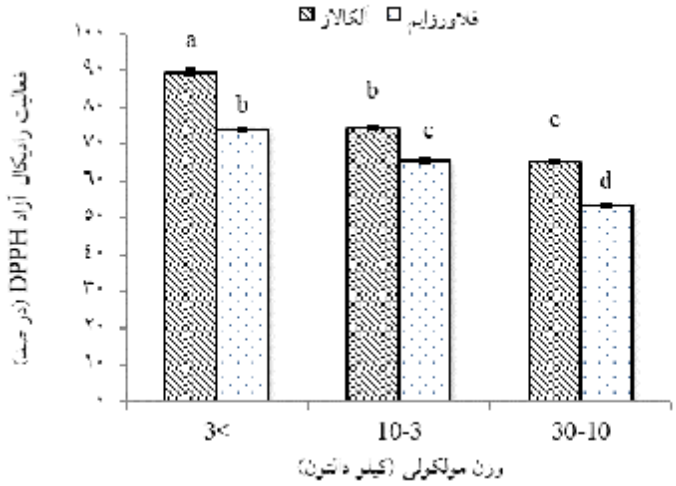
[1] اسیدآمینه ضروری

[2] مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۳-٤- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-٤-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

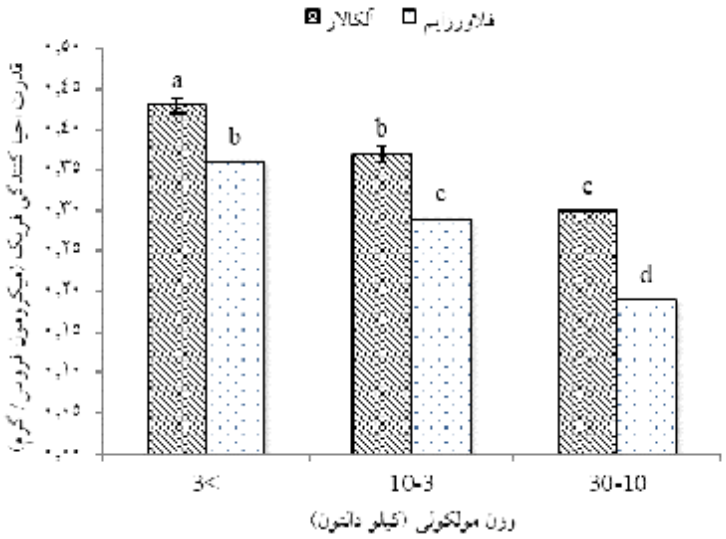
تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند اما فعالیت مهاری رادیکال DPPH ارتباط مستقیمی و معنی‌داری با وزن مولکولی و نوع آنزیم داشت($p<۰/۰۵$). اگر رادیکال‌های DPPH با یک سوبسترای پروتئینی مانند یک آنتی‌اکسیدان برخورد کنند، رادیکال‌ها پاک می‌شوند و جذب کاهش می‌یابد. کاهش جذب به عنوان معیاری برای فعالیت مهار رادیکال آزاد، در نظر گرفته شده است. پروتئین هیدرولیز شده جو، حاوی دهنده‌های هیدروژن است که با واکنش با رادیکال‌های آزاد تثبیت می شوند زیرا اسیدهای آمینه با باقیمانده‌های زنجیره جانبی آبگریز می‌توانند سبب انتقال الکترون از پپتیدها به رادیکال DPPH شوند (۲۱). همچنین فعالیت مهاری رادیکال DPPH، پروتئین جو تولیدی توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی‌داری بالاتر از فلاورزایم بود ($p<۰/۰۵$). ممکن است به علت بالاتر بودن HAA در این پروتئین باشد، اسیدهای آمینه آبگریز بالاتر سبب افزایش دسترسی بیشتر به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش دسترسی رادیکال‌های آزاد در سلول‌های هدف رخ می دهد (۱۱). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی در صنایع غذایی اهمیت ویژه‌ای دارند، به‌طوری‌که که کیفیت محصول را با جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین‌ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک حفظ می‌کنند (۲۶). این نتایج با نتایج Ovissipour و همکاران (۲۰۱۳) (پروتئین ماهی کیلکا) و Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) (پروتئین هسته انگور) هم خوانی دارد (۲۳ و ۳۱)، آنها نیز اعلام کردند پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به فلاورزایم دارا می‌باشد. با توجه به نتایج مربوط به فعالیت مهاری رادیکال DPPH ، بالاترین مقادیر به ترتیب در وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون، سپس کمتر از ۱۰ کیلو دالتون و در انتهای مابین ۱۰-۳۰ کیلو دالتون مشاهده شد($p<۰/۰۵$). وزن مولکولی کمتر از ۱۰-۳۰ کیلو دالتون فعالیت مهاری DPPH بسیار پایینی را نشان داد. پروتئین جو با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون، حاوی پپتیدها/ اسیدهای آمینه، بالاتری می باند که می توانند به عنوان دهنده‌های هیدروژن، رادیکال‌های آزاد تثبیت را تثبت نمایند. نتایج مشابهی توسط Nasir and Sarbon (۲۰۱۹) نیز گزارش نمودند پروتئین هیدورلیز شده اسکلت ماهی (*Decapterus macrosoma*) با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا بود (۲۱). Taheriو Bakhshizadeh (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده *skipjack tuna* با اندازه مولکولی ۳ کیلو دالتون بالاترین مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان داده است (۳۳). بر اساس این گزارش ها، پپتیدهای کوچکتر به عنوان اهداکنندگان پروتون مناسب با هیدرولیز گسترده پروتئین‌ها تولید می شوند.



شکل ۱: مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

۳-٤-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

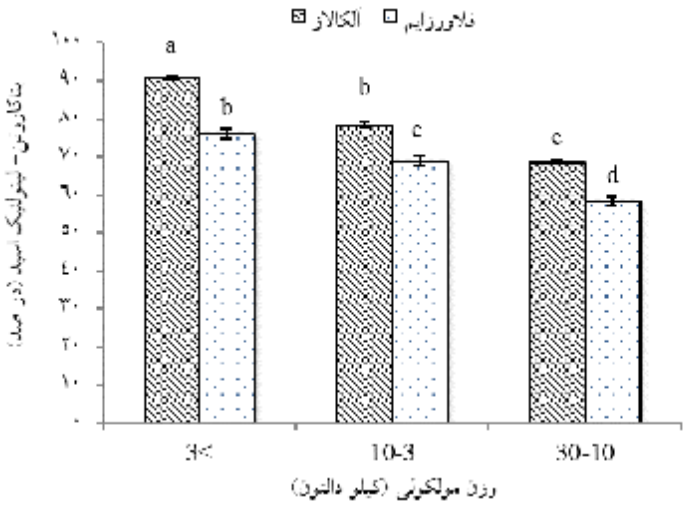
قدرت احیا کنندگی فریک پروتئین‌های هیدرولیز شده (شکل ۲) به طور معنی داری تحت تاثیر پارامترهای فرآیند (نوع آنزیم و وزن مولکولی) بوده است. بیشترین قدرت احیا کنندگی فریک، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بود (۰/۴۳ میکرومول فروس/ گرم) ($p<0/05$). در حالی‌که کمترین مقادیر مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم با وزن مولکولی ۱۰-۳۰ کیلو دالتون بود (۰/۱۹ میکرومول فروس/ گرم). ترکیبات با قدرت کاهشی بالاتر توانایی بهتری برای اهدای الکترون یا هیدروژن دارند و پتانسیل قابل توجهی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی دارند (۵). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون احتمالاً حاوی بالاترین سطوح پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد است که قادر به اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد و پایان دادن به واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون هستند (۳۴). Aondona و همکارن، (۲۰۲۰) پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد بالاترین توانایی کاهندگی در کمترین وزن مولکولی مشاهده شد (۱).Taheri و Bakhshizadeh (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده *skipjack tuna* با اندازه مولکولی ۳ کیلو دالتون بالاترین توانایی کاهندگی را نشان داده است (۳۳). بنابر این بر اساس این دو مطالعه، قدرت کاهنده نیز مشابه مطالعه حاضر وابسته به وزن مولکولی بوده است.



شکل ۲: مقادیر قدرت احیا کنندگی آهن

۳-٤-۳- فعالیت رادیکال آزاد ABTS

ارزیابی مهار رادیکال محلول در آب ABTS یکی دیگر از شاخص‌های تعیین قدرت ترکیبات آنتی‌اکسیدان و اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر این شاخص است. عملکرد هر آنزیم از نظر نوع رهایش اسیدهای آمینه خاص (لیپوفیل یا هیدروفیل) می‌تواند بر مهار رادیکال‌های آزاد مؤثر باشد. این پپتیدها از طریق اهداء اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد موجب توقف با کاهش سرعت فرآیند اکسیداسیون می‌شوند. بیشترین مهار رادیکال محلول در آب ABTS (شکل ۳)، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بود (۹۰/۷۲درصد). در حالی‌که کمترین مقادیر مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم با وزن مولکولی ۱۰-۳۰ کیلو دالتون بود (۵۸/۳۶درصد). خاصیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی مهار رادیکال کاتیونی و محلول در آب ABTS، مانند سایر شاخص‌ها، به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز و ترکیب اسید آمینه پپتیدها بستگی دارد و همچنین اندازه پپتیدها می تواند عامل کلیدی در توانایی حذف رادیکال ABTS باشد (۲۷). Shahosseini و همکاران (۲۰۲۲) نیز نتایج مشابهی را در مورد پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیاح گزارش نموده و بیان داشته اند نوع آنزیم مورد استفاده برای هیدرولیز و اندازه پپتیدها می‌تواند تاثیر بسزایی در توانایی حذف رادیکال ABTS بگذارد (۲۹).



شکل ۳: مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS

۳-۵- فعالیت ضد میکروبی

در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی پیرامون استفاده از نگهدارنده‌های طبیعی در صنایع غذایی صورت گرفته است از جمله این ترکیبات ضد میکروبی، پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد (۳۵). خاصیت ضد میکروبی پروتئین‌های هیدرولیز شده به طور قابل توجهی در ارتباط با پارامترهای فرآیند (نوع آنزیم و وزن مولکولی) بوده است. بیشترین خاصیت ضد میکروبی در ارتباط با هر دو باکتری، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون، در حالی که کمترین مقادیر مربوط به مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم با وزن مولکولی ۱۰-۳۰ کیلو دالتون بود. استفاده از آنزیم‌های مختلف در تولید پپتیدهای ضد باکتری بسیار مهم است. فعالیت این پپتیدهای ضد میکروبی باعث اختلال انتخابی غشای سلولی می‌شود که منجر به نفوذپذیری غشا، دپلاریزاسیون، اتلاف گرادیان‌های الکتروشیمیایی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۳). همچنین توالی اسید آمینه، ساختار ثانویه، طول و وزن مولکولی بر فعالیت ضد میکروبی پپتیدها تأثیر گذار می باشد (۳۳).

با توجه به نتایج باکتری گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت پایین‌تری نسبت به باکتری *اشیرشیاکلی* داشت. علت این امر، حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی است که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد (۷). عملکرد ضد باکتریایی پپتیدها به گونه‌های باکتریایی بستگی دارد. اول، پپتیدها ممکن است به صورت الکترواستاتیکی به غشاهای باکتری متصل شوند. بنابراین، ساختارها و فرآیندهای بین سلولی، مانند سنتز دیواره سلولی، DNA، RNA و سنتز پروتئین ممکن است تحت تأثیر قرار گیرند و غشای پلاسما ممکن است قطع شود (۲۶).

جدول ۵: مقادیر MIC پروتئین‌های هیدرولیز شده علیه باکتری‌های مختلف

باکتری / تیمار	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشیرشیاکلی*
آلکالاز (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)	۳۵۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Bb}	۵۲۵/۰۰±۲۵/۰۰^{Ab}
آلکالاز (۳-۱۰ کیلو دالتون)	۲۸۳/۳۳±۱٤/٤۳^{Bc}	٤٦٦/٦٦±۱٤/٤۳^{Ac}
آلکالاز (<۳ کیلو دالتون)	۲۰۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Bd}	۳۵۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Ae}
فلاورزایم (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)	٤۰۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Ba}	٦۲۵/۰۰±۲۵/۰۰^{Aa}
فلاورزایم (۳-۱۰ کیلو دالتون)	۳۵۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Bb}	۵۰۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Ab}
فلاورزایم (<۳ کیلو دالتون)	۳۰۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Bc}	٤۳۳/۳۳±۱٤/٤۳^{Ad}

۱) همه اعداد بر حسب ppm بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

جدول ٦: مقادیر MBC پروتئین‌های هیدرولیز شده علیه باکتری‌های مختلف

باکتری / تیمار	*استافیلوکوکوس اورئوس*	*اشیرشیاکلی*
آلکالاز (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)	٤۱٦/٦٦±۱٤/٤۳^{Bb}	٦۰۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Ab}
آلکالاز (۳-۱۰ کیلو دالتون)	۳۵۸/۳۳±۱٤/٤۳^{Bc}	۵۳۳/۳۳±۱٤/٤۳^{Ac}
آلکالاز (<۳ کیلو دالتون)	۲٦٦/٦٦±۱٤/٤۳^{Bd}	٤۳۳/۳۳±۱٤/٤۳^{Ae}
فلاورزایم (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)	٤۹۱/٦٦±۱٤/٤۳^{Ba}	۷۱٦/٦٦±۱٤/٤۳^{Aa}
فلاورزایم (۳-۱۰ کیلو دالتون)	٤٤۱/٦٦±۱٤/٤۳^{Bb}	٦۲۵/۰۰±۲۵/۰۰^{Ab}
فلاورزایم (<۳ کیلو دالتون)	۳۷۵/۰۰±۲۵/۰۰^{Bc}	۵۰۰/۰۰±۲۵/۰۰^{Ad}

۱) همه اعداد بر حسب ppm بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

٤- نتیجه گیری نهایی

در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه جو بررسی شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز بالاتری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت همچنین پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز، اسیدهای آمینه HAA بالاتر، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالاتری داشت و بالاترین خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون مشاهده شد. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده دانه جو می‌تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور پیشنهاد شود و همچنین می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان و ضد میکروب طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرد.

٥- منابع:

1. Ahmadi, F., Kadivar, M., Shahedi. M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*, 105 (1): 57-64.
2. Aondona, M., Ikya, J.K., Ukeyima, M.T., Gborigo, J.A., Aluko, R.E., Girgih, A.T. 2021. In vitro antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*, 45: 1056-1073.
3. Borrajo, P., Pateiro, M., Gagaoua, M., Franco, D., Zhang, W., Lorenzo, J.M. 2020. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porcine Liver Protein Hydrolysates Obtained Using Alcalase, Bromelain, and Papain. *Appl. Sci,* 10: 22-33.
4. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114: 1198-1205.
5. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*, 135(4): 3020‑3038.
6. Cozzolino, D., Roumeliotis, S., Eglinton, J. 2015. Relationships between fatty acid contents of barley grain, malt, and wort with malt quality measurements. *Cereal Chemistry*, 92: 93-97.
7. Da Rocha, M., Alemán, A., Romani, V. P., López-Caballero, M. E., Gómez-Guillén, M. C., Montero, P., & Prentice, C. 2018. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food Hydrocolloids*, 81: 351–363.
8. Davidson, P.M., Taylor, T.M. and Schmidt, S .E. 2013. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in Food microbiology. American Society of Microbiology, 22: 765-801.
9. DECastro, R. J. S., Cason, V. G., Sato, H. H. 2017. Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 10: 291-297.
10. FAO/WHO, 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.

11. Firmansyah, M., Abduh, M. Y. 2019. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from Hermetia illucens. *Heliyon*, 5(6): 25-41.
12. Ghanbarinia, S. H., Ariaii, P., Safari, R., Najafian, L. 2022. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. *Animal science journal*, 93: 11-29.
13. Ghelich, S., Ariaii, P., Ahmadi, M.2022. Evaluation of Functional Properties of Wheat Germ Protein Hydrolysates and Its Effect on Physicochemical Properties of Frozen Yogurt. *Int J Pept Res Ther*, 28: 69-81.
14. Grisi,T. C., Lira, K. G. 2005. Action of nisin and high ph on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 151-156.
15. Guo, B., Luan, H., Lin, S., Lv, C., Zhang, X., Xu, R. 2016. Comparative proteomic analysis of two barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) with contrasting grain protein content. *Front Plant Sci*, 7:1–11.
16. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S. 2019. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measurement*, 12: 721–727.
17. Houde, M., Khodaei, N., Benkerroum, N., Karboune, S. 2018. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry*, 254: 367–376.
18. Jaeger, A., Emanuele, Z., Aylin, W., Sahin, Elke K. Arendt. 2021. Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods*, 10(6): 13-29.
19. Mirsadeghi Darabi, D., Ariaii, P., Safari, R., Ahmadi, M. 2022. Effect of clover sprouts protein hydrolysates as an egg substitute on physicochemical and sensory properties of mayonnaise. *Food Science & Nutrition*, 10: 253–263.
20. Mirzapour, Z., Ariaii, P., Safari, R. 2022. Evaluation the Effect Hydrolyzed Canola Meal Protein with Composite Coating on Physicochemical and Sensory Properties of Chicken Nugget. *Int J Pept Res Ther*, 28: 71-90.
21. Nasir, S. N. A. M., Sarbon, N. M. 2019. Angiotensin converting enzyme (ACE), antioxidant activity and functional properties of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) muscle protein hydrolysate at different molecular weight variations. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 20: 101-124.
22. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18 (7): 950-956.
23. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis)* prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of Food Science and Agriculture*, 93: 1718–1726.
24. Rabiei, S., Rezae. M., Asgharzade, D., Nikoo, M., Rafieian-Kopaei, M. 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55:1-10.
25. Ryu, B., Shin, K.H., Kim, S.K.2021. Muscle Protein Hydrolysates and Amino Acid Composition in Fish. Mar Drugs Jun, 29: 11-29.
26. Saad, A. M., Sitohy, M. Z., Ahmed, A. I., Rabie, N. A., Amin, S. A., Aboelenin, S. M., Soliman, M. M., El-Saadony, M. T. 2021. Biochemical and Functional Characterization of

Kidney Bean Protein Alcalase-Hydrolysates and Their Preservative Action on Stored Chicken Meat. *Molecules*, 26*:* 46-59.

27. Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S. Z., Najafian, L. 2020. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. *Heliyon*, 6(2): 55-72.
28. Shahnazi, S., Khalili Sigaroudi, F., Ajni, Y., Yazdani, D., Ahvazi, M. taghizad, F. 2007. Investigation of chemical composiotion and antimicrobial properties Thymus trautvetteri essential oil. *Journal of Medicinal plants*, 23:80–88.
29. Shahosseini, S.R., Javadian, S.R., Safari, R. 2021. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. J*ournal of Innovation in Food Science and Technology*, 30 (2): 123-146.
30. Shahosseini, S.R., Javadian, S.R., Safari, R. 2022. Effects of Molecular Weights -Assisted Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant and Anticancer Activities of *Liza abu* Muscle Protein Hydrolysates. *International Journal for Peptide Research & Therap*eutics. 28: 1-11.
31. Taha, S.F., Mohamed, S.S., Wagdy M.S., Mohamed, F.G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal*, 21: 651-658.
32. Taheri, A., Bakhshizadeh, A. 2020. Antioxidant and ACE Inhibitory Activities of Kawakawa (*Euthynnus affinis*) Protein Hydrolysate Produced by Skipjack Tuna Pepsin, *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 29 (2): 148-166.
33. Tkaczewska, J., Borawska-Dziadkiewicz, J., Kulawik, P., Duda, I., Morawska, M., Mickowska, B. 2020. The effects of hydrolysis condition on the antioxidant activity of protein hydrolysate from *Cyprinus carpio* skin gelatin. *LWT Food Science and Technology*,117: 108-126.
34. Varedesara, M.S., Ariaii, P., Hesari, J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Sci Nutr*, 9:2180–2190.
35. Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R. and Fattahi, E. 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26: 625–632.

Evaluation of the effect of microbial enzymes and molecular weight on the antioxidant and antimicrobial properties of barley grain hydrolyzed protein

Negar Tajik [1], Peiman Ariaii[2]*, Leila Najafian [3]

[1]PhD student, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
[2] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran

*Corresponding author: Email: p.aryaye@yahoo.com

Abstract

One of the new sources of natural antioxidants is hydrolyzed proteins from plant sources. Barley is of particular interest due to its adaptability to different weather conditions and the ability to grow in poor and unfavorable lands, as well as due to the presence of vitamins A, E, B1, B2, B12 and minerals and a relatively high percentage of protein. Therefore, the aim of this research was to investigate the antioxidant and antimicrobial properties of hydrolyzed barley protein. In this study, barley grain protein was hydrolyze using commercial enzymes of alcalase and flavourzyme, and bioactive peptides was separated using membrane ultrafiltration with three fractions including less than 3 kDa, 3-10 kDa and 10 -30 kDa. The antioxidant properties of hydrolyzed and antimicrobial proteins were evaluated. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase had a higher protein content and degree of hydrolysis than the protein hydrolyzed by flavourzyme enzyme ($p < 0.05$). The results showed that the free radical scavenging activity of DPPH and ABTS and the power of iron reduction in barley grain hydrolyzed protein by alcalase enzyme was significantly higher than flavourzyme ($p < 0.05$), also this antimicrobial properties against pathogenic bacteria was higer, and its antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* were higher than *Escherichia coli*. Hydrolyzed barley grain protein with a molecular weight of less than 3 kDa had the highest antioxidant and antimicrobial activity ($p < 0.05$). Therefore, it seems that hydrolyzed barley grain protein has potential antioxidant and antimicrobial activity and can be recommended as a safe and rich source of protein for use in food industry, health foods and animal feed.

Keywords: Hydrolyzed protein, antioxidant, barley seed, molecular weight, antimicrobial