(مقاله پژوهشی)

ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیزشده حاصل از جلبک کلرلا ولگاریس توسط هیدرولیزآنزیمی

شیما تقدیری[۱]، مژگان امتیازجو[۲*]، محمد حسین عزیزی[۳]، پیمان آریایی[۴]، مرجانه صداقتی[۵]

۱-دانشجوی‌دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۲- دانشیار، دانشکده علوم و فنون دریایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.
۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴-دانشیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.
۵- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۱۲/۱۴ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۳/۰۲

DOI: 10.30495/jfst.2022.1954308.1781

چکیده

ریز جلبک‌ها از قدیمی‌ترین ساکنان اقیانوس‌ها و آب‌های شیرین هستند. یکی از مشهورترین آن‌ها، جلبک دریایی سبز رنگی به نام کلرلا ولگاریس است که در پژوهش حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده از این جلبک مورد مطالعه قرارگرفت. بدین منظور هیدرولیزات پروتئینی جلبک کلرلا ولگاریس توسط آنزیم‌های تجاری آلکالاز و فلاورزایم در بازه‌های زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه تولید شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های هیدرولیزات پروتئینی (درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین) نشان داد، هیدرولیزات پروتئینی توسط آلکالاز از درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که بیشترین مقادیر درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین توسط‌آنزیم‌آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد (به ترتیب ۳۷/۶۳ درصد و ۱۸/۴۴ درصد). همچنین بررسی‌ها نشان داد که جلبک کلرلا ولگاریس از اسیدهای آمینه ضروری بالایی برخوردار بود. در ادامه خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین‌ها (توسط هر دوآنزیم در زمان ۳۰ دقیقه) با وزن‌های مولکولی ۳، ۵ و ۱۰ کیلودالتون سنجیده شد. نتایج نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم‌آلکالاز با وزن مولکولی ۳ کیلو دالتون علاوه بر خواص عملکردی مناسب، از بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ($p<۰/۰۵$) برخوردار بود. بنابراین می‌توان پروتئین هیدرولیزشده حاصل از جلبک کلرلا ولگاریس(توسط آنزیم آلکالاز) بعنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در رژیم غذایی و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، هیدرولیزات پروتئینی، جلبک کلرلا ولگاریس.

*مسئول مکاتبات:moz_emtyazjoo@yahoo.com

۱- مقدمه

پپتیدهای زیست فعال، بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که جرم‌مولکولی آن‌ها کمتراز ۶۰۰۰ دالتون و دارای ۲-۲۰ آمینو اسیدمی‌باشند. این پپتیدها در ساختار پروتئینی اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیرمثبتی برعملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند، از جمله این تأثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشارخون و ضد سرطان اشاره نمود (۱، ۲). در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیزشده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع دریایی، حیوانی وگیاهی بسیاری مانند جلبک، شیر، لوبیای‌سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده‌ی تخم‌مرغ، صدف خوراکی، ضایعات ماهی ومیگو تولید شده‌اند(۳، ۴). در بین منابع دریایی، گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین‌هیدرولیزشده، منابع دریایی به ویژه جلبک‌ها به دلیل قیمت مناسبتر و آلرژی‌زایی‌کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند(۵،۶).ریزجلبک‌ها از قدیمی‌ترین ساکنان اقیانوسها و آب‌های شیرین هستند. یکی از مشهورترین آن‌ها، جلبک دریایی‌سبزرنگی‌به‌نام‌کلرلاولگاریس[1]است. کلرلا ولگاریس تک سلولی و جزء آغازیان بوده که در خانواده جلبک‌ها قرار دارد. سلول‌های کروی آن با قطر حدود ۲-۱ میکرون معادل اندازه‌یک‌گلبول قرمز است. این جلبک حاوی۸ اسید آمینه ضروری، ویتامین‌های A،C،E،B_1، B_6، B_{12}، بیوتین، املاح آهن، کلسیم، منیزم و روی، اسیدهای چرب ضروری امگا۶وامگا۹می‌باشد(۷،۹،۱۱).پژوهش‌های مختلفی پیرامون کاربرد این ریز جلبک در مواد غذایی صورت گرفته است که‌گویای‌ظرفیت‌بالای‌امولسیون‌کنندگی، پایداری امولسیون پروتئین‌حاصل‌ازاین‌جلبک‌و قابلیت رقابت آن با پروتئین‌های تجاری‌است(۹،۱۰). کیفیت پروتئین موجود در ریزجلبک‌ها با برخی از منابع پروتئین سنتی مانند شیر،گوشت و تخم‌مرغ مشابه‌است. به‌طورکلی،محتوای‌پروتئین ریزجلبک در مقایسه با لیپید وکربوهیدرات، بخش‌عمده‌ای را تشکیل می‌دهد(۸). ازسوی‌دیگر به منظور بهبود خصوصیات پروتئین می‌توان از روش‌های‌متعددی‌استفاده‌نمودکه هیدرولیز آنزیمی یکی از این‌روش‌هاست. فرآیند هیدرولیز آنزیمی می‌تواند با استفاده از آنزیم‌ها با منشا داخلی (فرآیند اتولیز) وآنزیم های تجاری صورت‌پذیرد.کاربردآنزیم‌های تجاری به جای استفاده از فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های داخلی دارای مزایای بسیارزیادی است، زیرا کل فرآیند هیدرولیز کاملا تحت کنترل است در نتیجه محصول و فرآورده‌هایی با خواص مشخص تولیدمی‌شود (۱۲). یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده و مهم در هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های تجاری، انتخاب آنزیم پروتئاز می‌باشد. انواع مختلفی از آنزیم‌های تجاری‌وجوددارندکه‌به‌صورت‌موفقیت‌آمیزی برای هیدرولیز پروتئین‌های‌موادغذایی‌مورداستفاده‌قرارگرفته‌است.آنزیم‌هایی که‌برای‌هیدرولیزپروتئین‌های‌غذایی‌مورداستفاده‌قرارمی‌گیرند، حداقل باید دارای یک ویژگی‌مشترک باشند، محصولات تولیدی از اثرآن‌ها باید از ارزش غذایی برخوردار باشند و اگر منشا میکروبی‌دارند، ارگانیزم تولیدکننده آن ها باید غیر بیماری‌زاباشد(۱۳،۲). آنزیم‌های‌مختلف‌مانندآلکالاز (دارای فعالیت‌اندوپروتئازی در شرایط قلیایی)، بروملین (اندوپپتیداز سیستئین‌باویژگی‌های‌متعدد)،فلاورزایم(مخلوطی‌از اندوپپتیداز واگزوپپتیداز)،پروتامکس(پروتئاز باکتریایی دارای مخلوطی از اندو و اگزوپپتیداز) جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خصوصیات کاربردی و آنتی اکسیدانی به کار می‌روند (۲). به هنگام انجام فرآیند هیدرولیز، پپتیدهای مختلف با وزن مولکولی متفاوت تولید می‌شوند. هرچه قدر وزن مولکولی پایین‌تر باشد پپتید تولید شده دارای خواص زیست فعال بوده و ممکن است توانایی آنتی اکسیدانی داشته باشد. به طور معمول، پپتیدهای با وزن مولکولی زیر۱۰۰۰ دالتون دارای این ویژگی‌ها می‌باشند (۱۴، ۱۵). یکی از ویژگی‌های بارز هیدرولیزات‌های پروتئینی ، خواص زیست فعالی آنها بوده که ناشی از وزن مولکولی نسبتا پائین آن ها می‌باشد. امروزه از این هیدرولیزات‌های پروتئینی به علت دارا بودن خاصیت ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی به عنوان مکمل و یا جایگزین‌پروتئین‌در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده می‌شود (۱۵، ۱۶، ۳۹). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین

1 -*Chlorella vulgaris*

هیدرولیزشده و با توجه به این‌که در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا ولگاریس تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص‌شده از هیدرولیز آنزیمی جلبک کلرلا ولگاریس توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی این پپتیدها بود.

۲- مواد و روش

۲-۱- مواد اولیه

جلبک کلرلا ولگاریس (ATCC ® 30821)، به شکل پودر سبز رنگ از شرکت نور دارو در شهرستان گنبد کاووس تهیه شد. آنزیم آلکالاز(استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) با کد p4860 و فلاورزایم (استخراج‌شده از *Aspergillus oryzae*) با کد ۲۳۳-۷۵۲-۲ 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 بودند.

۲-۲- اندازه‌گیری میزان پروتئین کلرلا ولگاریس

بر اساس روش کلدال نمونه‌ها هضم و سپس با تیتراسیون مقدار(N×۶/۲۵)مقدارکل‌پروتئین‌رسوبی در فازآبی محاسبه شد (۱۷).

۲-۳- تولید پروتئین هیدرولیز شده

۵۰گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. در ادامه با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، فلاورزایم ۷/۵)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای۵۷ درجه‌سانتی‌گراد برای آنزیم‌آلکالاز و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم فلاورزایم در جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با دورثابت ۲۰۰دوردردقیقه قرار داده، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش(زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش‌آنزیمی‌درحمام‌آبی به مدت ۱۵دقیقه‌دردمای۹۵درجه‌سانتی‌گرادقرارداده‌شد.پروتئین های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی‌به‌صورت پودردرآمد(۱۸). در ارتباط باآزمون های مربوط‌به‌هیدرولیزجلبک‌کلرلاولگاریس مطالعه حاضر شامل ۶ تیمار بوده است (جدول ۱):

جدول۱- تیمارهای مختلف در این مطالعه

شماره تیمار	نام آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)
۱		۱۰
۲	آلکالاز	۲۰
۳		۳۰
٤		۱۰
٥	فلاورزایم	۲۰
٦		۳۰

۲-٤- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید(TCA) اندازه‌گیری شد مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیترتری کلرواستیک اسید۲۰ درصد مخلوط‌گردید و سپس با دور۶۷۰۰ rpm و زمان

۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس‌مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۱۸):

فرمول(۱)

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

۲-۵- میزان بازیافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت‌تعیین‌شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین‌آلبومین سرم گاوی استفاده گردید. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل T80ساخت کشورانگلستان‌قرائت‌شد.میزان بازیافت پروتئینی از از طریق فرمول ۲ محاسبه گردید(۱۹).

فرمول(۲)

×۱۰۰ (میزان پروتئین موجود در نمونه / میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیزشده) = بازیافت پروتئینی

۲-۶- میزان اسیدآمینه کل

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام و میزان اسیدهای‌آمینه‌کل‌با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line(آلمان)بااستفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۲۰).

۲-۷- جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترافیلتراسیون با سه فیلترآمیکون با وزن مولکولی مختلف (MWCO) ۳، ۵ و۱۰کیلودالتون انجام شد. سه فرکشن(3kDa>MW) و (-MW(5kDa، (10kDa– MW) جدا گردید. ابتدا پروتئین هیدرولیزشده خام با استفاده از فیلترآمیکون ۵،۳ و۱۰کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد، مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Biophotometer، آمریکا) شد (۲۱).

۲-۸-اندازه‌گیری‌فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین‌هیدرولیز شده

۲-۸-۱- بررسی مهار رادیکال‌آزاد (DPPH)

بدین‌منظور۱ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طورجداگانه‌با۱میلی‌لیترمحلول۰/۱میلی‌مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵دقیقه‌دراتاق‌تاریک‌قرارداده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج۵۱۷nm در مقابل شاهد خوانده شد و با استفاده ازرابطه۳، میزان مهار رادیکال آزاد بر حسب درصد گزارش گردید (۲۲).

فرمول

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

۲-۸-۲-اندازه‌گیری‌قدرت‌احیاکنندگی‌آهن (FRAP)

این‌آزمون‌مطابق 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 (۲۲). توضیح بیشتری در خصوص قرادت عدد آورده شود.

۲- ۹- خواص عملکردی

۲-۹-۱- حلالیت

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش Bera و Mukherjee (۱۹۸۹) انجام شد. یک گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول‌آب مخلوط‌کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱۰-۲ تنظیم کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه‌با سرعت ۵۰۰ سانتریفیوژ انجام شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۴) محاسبه شد (۲۳).

معادله(۴)

×۱۰۰ (گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتانت) = اندیس حلالیت در آب

۲-۹-۲- ظرفیت و پایداری امولسیون‌کنندگی

به ۳گرم نمونه، ۵۰ میلی لیترآب مقطر و ۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با هموژنایزر هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله آزمایش تقسیم گردید و با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ شد EC طبق معادله (۵) زیر گزارش شد (۲۴).

معادله(۵)

$$EC\ (\%) = \text{حجم کل / حجم قسمت امولیسفیه شده}$$

۱۰میلی‌لیتر‌روغن گیاهی کلزا با ۳۰ میلی لیتر محلول پروتئینی ۱درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس با میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های t= 0' و t =10' انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست‌آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ۵ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات۱٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۲۴).

معادله(۶)

$$ESI = A0 \times \Delta t/\Delta A$$

$$\Delta A = A0 - A\ 10, \quad \Delta t = 10\ \text{min}$$

۲-۹-۳- اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری کف‌کنندگی

برای‌اندازگیری‌ظرفیت‌کف‌کنندگی ۲۰ میلی‌لیتر محلول‌های پروتئینی تهیه شد و در استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس‌به مدت یک دقیقه با التراتر‌کس با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت‌کف‌کنندگی‌درنظرگرفته شد (معادله ۷) (۲۵).

معادله(۷)

$$\text{ظرفیت کف کنندگی (٪)} = \text{حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف - حجم نمونه قبل تشکیل کف}$$

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد (۲۵).

۲-۱۰- ارزیابی‌آماری

طرح‌آماری‌مورداستفاده‌دراین پژوهش طرح کاملاً تصادفی وشامل سه تکرار برای هر تیمار بوده است. تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده‌ازروش‌آنالیزواریانس‌یک‌طرفه(One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها ازآزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین ±انحراف‌معیار‌گزارش‌شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم‌افزار(SPSS version 18) برای‌آنالیز داده‌ها و Excel برای رسم نمودارها استفاده‌گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- میزان پروتئین‌اولیه

میزان‌پروتئین‌اولیه‌جلبک‌کلرلاولگاریس‌برابربا ۱/۱۶±۵۰/۶۶ درصد بوده است. پروتئین ترکیب اصلی جلبک ها می‌باشد به طوری‌که۵۰-۷۰ درصد از وزن خشک اکثر جلبک‌ها، پروتئین می‌باشد (۲۶). بسته به نوع‌گونه، مواد مورد نیاز برای رشد و ترمیم و نگهداری سلول‌ها و شرایط رشد، جلبک کلرلا ولگاریس محتوای پروتئین برابر با ۴۳-۵۸ درصد از وزن خشک آن است (۹، ۲۷، ۲۸). همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف مابین ۶۵/۱۵- ۹۳/۴۶ درصد بوده است.

۳-۲- بررسی مقادیردرجه هیدرولیز

نتایج‌مربوط‌به‌درجه‌هیدرولیزنشان‌می‌دهد که درجه هیدرولیز به‌طورمعنی‌داری‌در حضور آنزیم آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بود (P<۰/۰۵) (جدول۱) و تاثیر زمان بر درجه هیدرولیز معنی‌دار بود. همچنین تیمار با حضور آنزیم آلکالاز و در زمان۳۰ دقیقه بیشترین درجه هیدرولیز را داشت (P<۰/۰۵). براساس نتایج به‌دست‌آمده از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین مشخص گردیدکه‌با افزایش‌زمان واکنش، هیدرولیزآنزیمی با یک‌فازسریع‌آغازمی‌شودودراین‌مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود. همچنین، افزایش زمان فرآیندموجب‌طولانی‌ترشدن فعالیت‌آنزیم‌واثر آن بر سوبسترا می‌گردد(۲۹). انتخاب‌آنزیم‌نقش‌بسیارمهمی‌درتولید پروتئین

هیدرولیز شده دارد، زیرا هر آنزیم دارای الگوی متفاوتی در شکستن‌باندهای‌پپتیدی می‌باشد که در ترکیب آمینو اسیدی، وزن ملکولی‌و فعالیت زیستی پپتیدهای تولید شده اثر خواهد گذاشت (۱۳). آلکالاز به دلیل تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیزبالا درمدت زمان کم، به طور مکرر توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۳، ۲۰).

۳-۳- بررسی‌مقادیر پروتئین و بازیافت پروتئینی

بازیافت‌پروتئینی یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان‌کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول و در نتیجه میزان بازدهی فرآیند در طی هیدرولیزآنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد (۳۰). نتایج مربوط به بازیافت پروتئینی، پروتئین (جدول۲) ودرجه‌هیدرولیزدر مطالعه حاضر باهم، هم خوانی دارد. به طوری‌که با افزایش درجه هیدرولیز و میزان بازیافت پروتئینی نیز افزایش پیدا می‌کند. نتایج مشابهی توسط سایر محققین‌گزارش‌شده است، آن‌هانیزگزارش‌نمودند با افزایش زمان‌هیدرولیز، مقادیربازیافت‌پروتئین‌ومیزان پروتئین افزایش یافت (۱۳، ۱۸). در مجموع، تیمار با حضور آنزیم آلکالاز و درزمان ۳۰دقیقه‌بیشترین‌بازیافت‌پروتئین‌را داشت ($P<۰/۰۵$).

جدول۲- درجه هیدرولیز، محتوای پروتئین و بازیابی پروتئین هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

تیمارها		درجه هیدرولیز	مقادیر پروتئین (درصد)	بازیافت پروتئینی
نام آنزیم	زمان هیدرولیز	(درصد)		(درصد)
آلکالاز	۱۰	۱۸/۹۸±۰/۳۸^{d}	۷۰/۸۲±۱/۲۵^{d}	۱۳/۹۸±۰/۲۱^{e}
	۲۰	۲۷/۶۳±۰/۵۶^{b}	۸۲/۳۰±۱/۸۵^{b}	۱۶/۲٤±۰/۳۱^{c}
	۳۰	۳۷/۶۳±۰/۵۹^{a}	۹۳/٤٦±۰/٦۹^{a}	۱۸/٤٤±۰/۱۲^{a}
فلاورزایم	۱۰	۱۱/۹۵±۰/٦٦^{e}	٦۵/۱۵±۰/۹۰^{e}	۱۲/۸٦±۰/۱۵^{e}
	۲۰	۱۸/۸٦±۰/۷۰^{d}	۷٤/٤۰±۰/۸۰^{c}	۱٤/٦۸±۰/۱۵^{d}
	۳۰	۲٤/۱۸±۰/٦۵^{c}	۸۱/۳۸±۱/۲۲^{b}	۱۷/۳٦±۰/۲۹^{b}

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

۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند سطح آماری هم ذکر شود.(a, b, c,..)

۳-٤-ترکیب اسیدآمینه

در سال‌های اخیر، ترکیب اسیدهای چرب در مقیاس وسیع تولید ریز جلبک‌ها از جمله جلبک‌های دریایی علاقه قابل توجهی را در بین محققان ایجاد کرده است. این امر عمدتا به دلیل مزایای سلامت بخش اسیدهای چرب مونو و چند غیراشباع (MUFA و PUFA) که در گیاهان دریایی از جمله ریز جلبک‌ها یافت می‌شود (۹، ۲۶). نتایج مربوط به ترکیب اسید آمینه (جدول۳) پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌آلکالاز و فلاورزایم‌در زمان ۳۰ دقیقه (با توجه به بالاتر بودن بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز) نشان داد، مجموع اسیدهای آمینه آبگریز برابر با ۳۲/۰۱ و ۲۷/۲۹ برای آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب بوده است. بنابراین، می‌توان ادعا کرد که پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به دلیل وجود مقادیر بالاتر مقدار اسید آمینه هیدروفوب (HAA[1]) ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند. به طورکلی، تفاوت درماده خام، نوع آنزیم مورد استفاده و شرایط هیدرولیز می‌باشد در ترکیب اسید آمینه‌موثر است (۳۱). در مجموع بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، لوسین به ترتیب ۹/۲۵ و ۸/۰۱ درصد بوده است، بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم گلوتامیک اسید ۱۰/۸۴،۱۰/۰۱درصدوبوده‌است.Jacob-Lopes و همکاران

1-Hydrophobic Amino Acid

(۲۰۱۵) بالاترین‌مقادیراسیدآمینه‌ضروری برای جلبک کلرلا ولگاریس را لوسین اعلام نمودند (۶/۸۴ درصد)، بالاترین مقادیراسیدآمینه‌غیرضروری‌راگلوتامیک اسید ۱۰/۷۴ درصد اعلام نمودند (۱۶). Irene و همکاران (۲۰۲۰a) بالاترین مقادیراسیدآمینه ضروری برای جلبک کلرلا ولگاریس چند منطقه متفاوت را لوسین (اسید آمینه) اعلام نمودند (مابین ۶/۹۱ – ۱۰/۷۸درصد)،بالاترین‌مقادیراسیدآمینه غیر ضروری را گلوتامیک اسید مابین ۸/۳۷– ۱۲/۶۶ درصد اعلام نمودند (۱۴). با توجه به با توجه به‌گزارش مشترک سازمان بهداشت جهانی نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسیدآمینه‌ها نباید کمتر از۴۰ درصد باشد و همچنین میزان اسیدآمینه ضروری به غیر ضروری نبایدکمتر از۰/۶ باشد (۳۲). با توجه به نتایج پروتئین‌هیدرولیزشده از ترکیب اسیدآمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسیدآمینه ضروری به غیرضروری آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب برابر با ۰/۹۷ و ۰/۹۹ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه موجود به ترتیب برابر با ۴۹/۲۷ و ۴۹/۸۸ است، که این نتایج نشان دهنده بالا بودن کیفیت‌پروتئین‌هیدرولیزشده جلبک‌کلرلاولگاریس‌می باشد.

جدول۳- ترکیب اسید آمینه هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰گرم نمونه)	آلکالاز	فلاورزایم	FAO/ WHO, 1990
هیستدین[1]	۵/۰۲	٤/۸۷	
ایزو لوسین[1]	٤/۵۵	٤/۱۵	۲/۸۰
لوسین[1]	۹/۲۵	۸/۰۱	٦/٦۰
لایزین[1]	۵/۸۹	۷/۲۱	۵/۸۰
متیونین[1]	۱/۵۹	۱/۰۵	
فنیل آلانین[1]	۵/۲۵	٤/۰۵	٦/۳۰
تروئنین[1]	٤/۷۵	٦/۰۵	۳/٤
والین[1]	۵/۹۹	۵/۰۵	۳/۵
آرژنین[1]	٦/۵۸	۸/۲۰	
آسپارتیک اسید	۱۰/۳۵	۹/۸۵	
پرولین	۵/٤۵	۵/۲۵	
سرین	۵/۰۹	۵/۸۷	
آلانین	۸/٤٤	۷/۳۵	
سیستئین	۰/۱۸	۰/۹۹	
گلوتامیک اسید	۱۰/۸٤	۱۰/۰۱	
تیروزین	۵/۲۰	۳/۹۹	۱/۱
گلایسین	٤/۷۵	۵/۵۵	
نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه	٤۹/۲۷	٤۹/۸۸	
نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیرضروری	۰/۹۷	۰/۹۹	
میزان اسید آمینه کل	۹۹/۱۷	۹۷/۵۰	
HAA[2]	۳۲/۰۱	۲۷/۲۹	

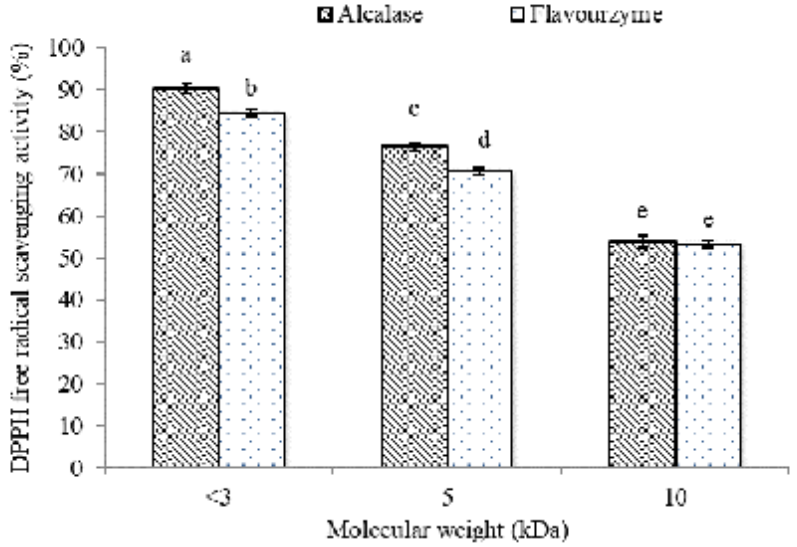
[1] اسیدآمینه ضروری

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

۳-۵- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-۵-۱-فعالیت رادیکال‌آزاد DPPH

با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده توانایی بالایی‌برای‌حذف‌رادیکال آزاد DPPH (شکل ۱) دارا بودند دارابودن توانایی مهار رادیکال‌آزاد DPPH توسط جلبک کلرلاولگاریس‌توسط Abdel-Karim و همکاران (۲۰۲۰) و Taghavi و همکاران (۲۰۱۹) نیز، گزارش شد (۱، ۳۴). فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌توسط‌آنزیم‌آلکالاز به‌طورمعنی‌داری‌بالاتربود($P<0/05$). فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی پپتیدها ارتباط نزدیکی با ترکیب اسیدآمینه، ساختار و وزن مولکولی‌دارد.برخی‌محققان‌معتقدند،آمینواسیدهای هیدروفوب (HAA)دارای‌قدرت‌ضداکسایش‌می‌باشند، که بر این اساس مقادیراسیدآمینه‌HAAدرپروتئین‌هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالازبالاتراز فلاورزایم بوده است. همچنین پتانسیل بالاتر مهاررادیکال‌آزادممکن‌است‌به دلیل کوچکتر بودن پپتیدهای حاصل از هیدرولیز و جداسازی یا غلظت بیشتر مواد دهنده الکترون‌درهیدرولیزتوسط‌آنزیم‌آلکالازباشد (۳۳، ۳۴).میزان فعالیت رادیکال آزاد DPPH در بین وزن مولکولی‌های مختلف اختلاف‌معنی‌داری‌باهم‌داشتند ($P<0/05$). با افزایش وزن مولکولی مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH کاهش یافت. به‌طوری‌که‌پروتئین‌هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز باوزن‌مولکولی‌کمتراز۳کیلودالتون‌بالاترین‌فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی را دارا بود (۹۰/۳۵ درصد). علت این امر شاید به دلیل وزن مولکولی‌کم‌پپتیدهای‌آن باشد. پپتیدهای کم مولکولی بیشتر در معرض‌زنجیره‌جانبی‌باقی‌مانده قرار دارند و مسئول تسهیل واکنش‌بین پپتیدها ورادیکال‌های آزاد هستند بنابراین فعالیت مهار رادیکال DPPH را افزایش می دهند (۱۵).

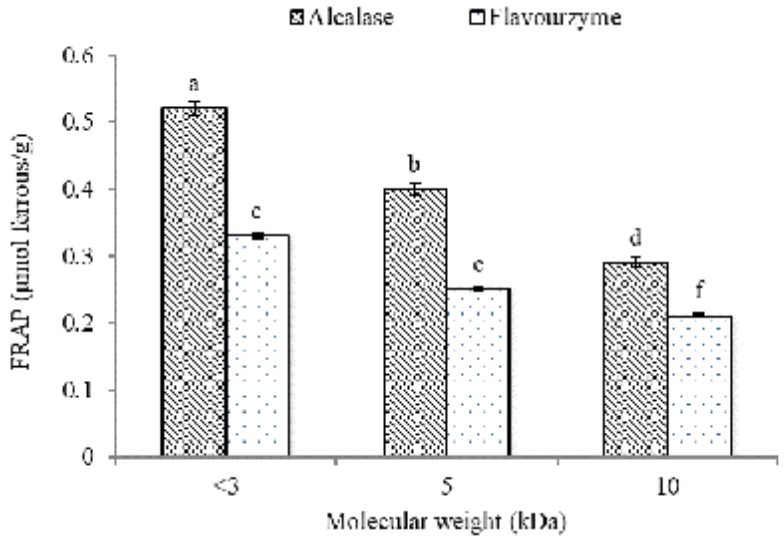


شکل۱-فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

۳-۵-۲-قدرت احیا کنندگی فریک

نتایج مربوط به مطالعه حاضرنشان داد تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای قدرت احیای آهن (شکل ۲) دارا بودند دارابودن توانایی قدرت احیای‌آهن در پروتئین هیدرولیزشده‌جلبک‌کلرلاولگاریس‌توسط Abdel-Karim و همکاران(۲۰۲۰) و Taghavi و همکاران (۲۰۱۹)، Irene و همکاران (۲۰۲۰b) نیز، گزارش شد (۱، ۳۴، ۱۴). قدرت احیاکنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. گروه‌های ایندول، فنولی و تیروزین نقش مهمی‌دراهدای هیدروژن در یک سیستم اکسیداسیون دارند. به طورکلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز پروتئین جلبک معمولاً با ترکیب، دنباله و آبگریزی اسیدهای آمینه همراه است که افزایش قدرت‌کاهندگی پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز ممکن است به دلیل مطالب بیان شده

باشد (۳۶). با افزایش‌وزن‌مولکولی‌مقادیرقدرت‌احیا کنندگی یون آهن کاهش یافت($P<0/05$). فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود (۰/۴۳ میکرومول فروس/گرم) ($P<0/05$). قدرت احیای بیشتربه‌دست‌آمده‌توسط۳ کیلو دالتون به دلیل وزن مولکولی کمتر می‌باشد که دارای مقادیر اسید آمینه آبگریز بالاتر در مقایسه با وزن مولکولی بالا است که با سهولت بیشتری می تواند یک الکترون و اتم هیدروژن برای ثبات Fe2 اهدا کند(۱۵). افزایش‌قدرت‌احیای آهن با کاهش وزن مولکولی پپتیدها نشان می‌دهدکه پتانسیل کاهش الکترون بیشتر ناشی از زنجیره‌های پپتیدی کوتاه می‌باشد است (۳۷).

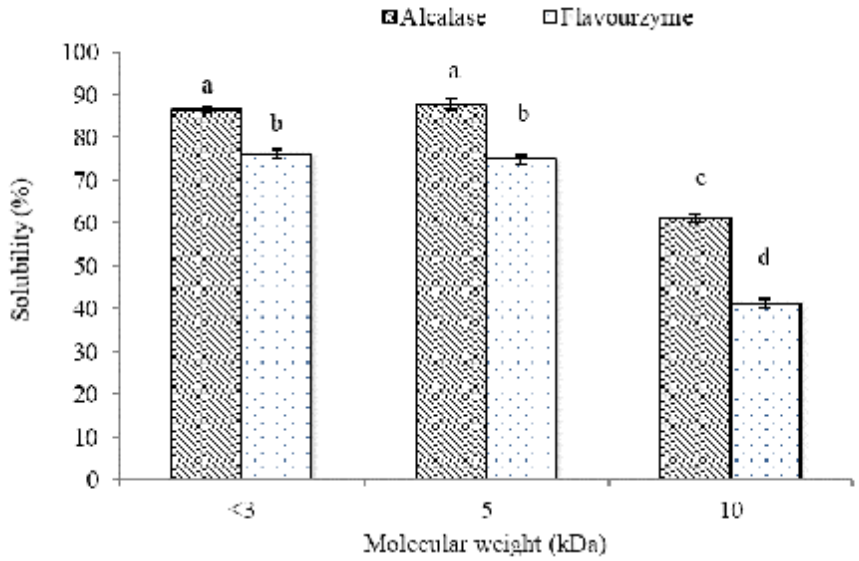


شکل۲- قدرت کاهش آهن (FRAP) هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

۳-۶-خواص عملکردی

۳-۶-۱-حلالیت

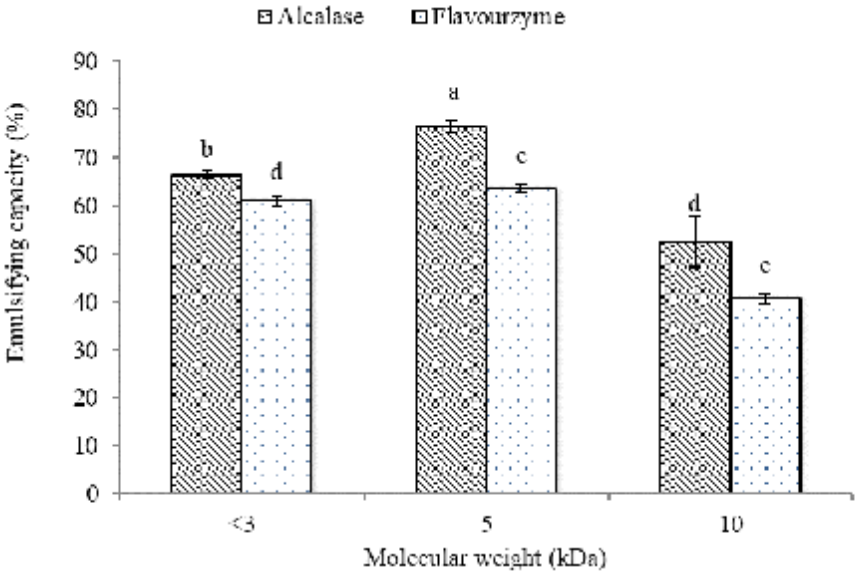
از بین تمام خواص عملکردی پروتئین‌ها، حلالیت بیشترین تأثیررا در ارتباط با سودمندی پروتئین هیدرولیزشده در سیستم‌های‌غذایی را نشان می‌دهد. سایر خصوصیات خواص عملکردی مانند کف و امولسیون و ویژگی‌های ژل سازی معمولاً به محلول بودن پروتئین در محیط مربوطه نیاز دارند. بنابراین، به‌نظرمی‌رسد، پروتئین‌های نامحلول پتانسیل کاربرد بسیارکمی درمواد غذایی دارند (۳۸). با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های‌هیدرولیزشده‌ازحلالیت(شکل۳)بالایی برخوردار بودند وحلالیت پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود. میزان حلالیت در بین‌وزن‌مولکولی‌های‌مختلف‌اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($P<0/05$). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن‌مولکولی۵کیلو دالتون و کمتر از ۳ کیلو دالتون بالاترین حلالیت را دارا بود (۸۷/۸۳ و۸۷/۶۰ درصد) ($P<0/05$). این ممکن است به دلیل وجود اسید آمینه آب دوست بیشتر در معرض آب، منجر به تشکیل پیوندهای هیدروژن با آب وافزایش‌شاخص حلالیت آن باشد و همچنین به علت مقادیر بالاتر اسیدآمینه HAAدرپروتئین‌هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالازباشد(۳۹). به گفته Wu و همکاران (۱۹۹۸) هنگامی که اسیدهای‌آمینه در معرض‌آن‌ها قرارمی‌گیرند، از طریق پیوندهای‌هیدروژنی و برهم کنش الکترواستاتیک با مولکول های آب در تعامل خواهند بود و بنابراین هیدرولیزات را حل می‌کنند (۳۸، ۴۰).



شکل۳-حلالیت هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

۳-٦-۲-خواص امولسیون‌کنندگی

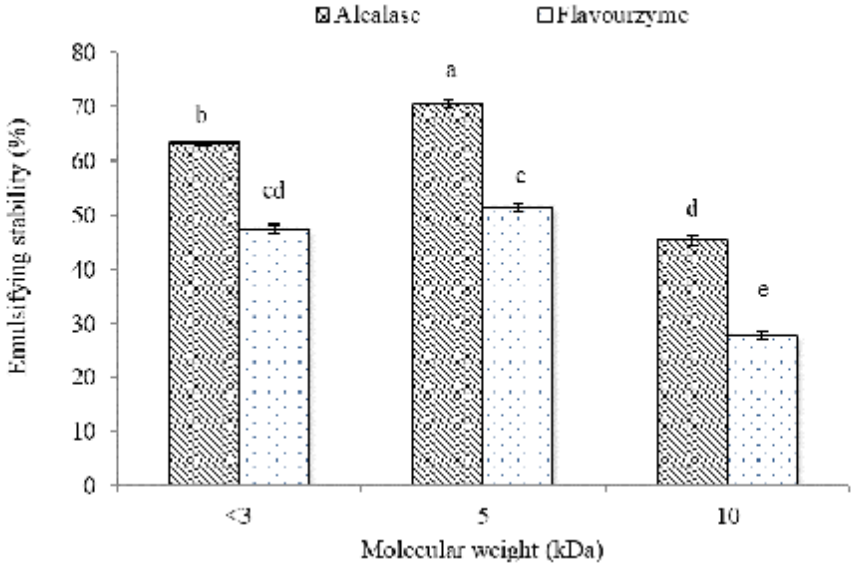
ظرفیت امولسیون پروتئین‌هیدرولیزشده (شکل ۴) و پایداری امولسیون (شکل۵) توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود در مجموع وجود برخی از پروتئین‌ها می‌تواند به نوبه خود سبب افزایش ویسکوزیته و پایداری امولسیون‌ها شود (۴۱). که ممکن است پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکلاز این ویژگی مثبت را دارا باشد.



شکل٤-ظرفیت امولسیون کنندگی هیدرولیز پروتئین‌کلرلا ولگاریس

مقادیر ویژگی‌های مولسیون تحت تاثیر وزن مولکولی بود پروتئین هیدرولیز شده توسط‌آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۵کیلودالتون‌بالاترین‌پایداری‌امولسیون‌رادارابود(۷۰/۵۶درصد). به‌طوری‌که‌خواص‌امولسیون در وزن مولکولی۳ کیلو دالتون کمتر از ۵ کیلو دالتون بود. پپتیدهای با وزن مولکولی‌کمتر درمقایسه‌با پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر به دلیل پپتیدهای کوچک دارای زنجیره‌کوتاه اسیدآمینه است‌که‌منجر به عدم بازشدن‌دررابطه‌می‌شود و در مقایسه با پپتید بزرگ مولکولی

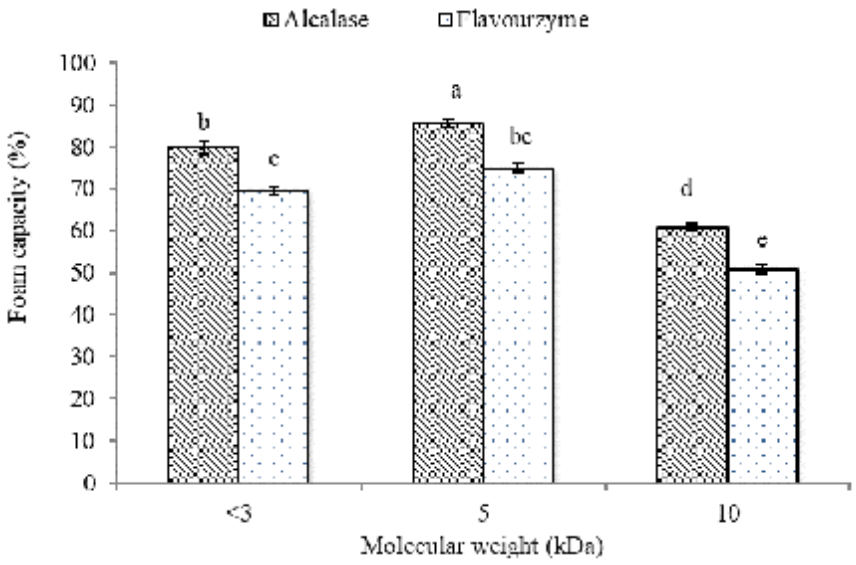
دارای‌راندمان پایین درکاهش‌کشش سطحی است. به منظور نمایش‌فعالیت‌های‌امولسیونی بهتر، پروتئین‌ها و یا پپتیدها باید به سرعت به رابط آب/ روغن مهاجرت کنند، جایی که آنها به سرعت باز می‌شوند و رابط را دوباره مرتب می‌کنند (۱۵، ۳۷). این نتایج مشابه نتایج Nasir و Sarbon (۲۰۱۹) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده اسکلت ماهی ده باله هندی (*Decapterus macrosoma*) می‌باشد، آن‌ها نیز اعلام نمودند پروتئین‌هیدرولیزشده با وزن‌مولکولی‌کمتر از ۳ کیلو دالتون خواص امولسیون کنندگی کمتری دارند (۲۰).



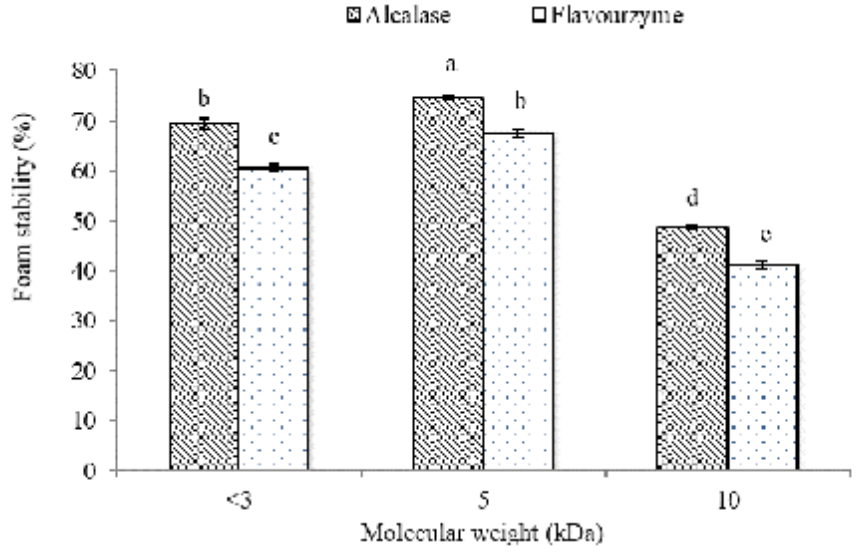
شکل۵-پایداری امولسیون کننده هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

۳-۶-۳-خواص کف‌کنندگی

نتایج مربوط به ظرفیت کف‌کنندگی(نمودار۶) و پایداری کف (نمودار۷)، باهم هم خوانی داشت. تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده ازکف‌کنندگی بالایی برخوردار بودند وکف کنندگی پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم‌آلکالاز بالاتر بود. میزان ظرفیت کف کنندگی در بین وزن مولکولی‌های مختلف‌اختلاف معنی‌داری باهم داشتند ($P<۰/۰۵$). پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون بالاترین‌ظرفیت‌کف‌کنندگی را دارا بود. کاهش وزن مولکولی پپتید منجر به کاهش ظرفیت کف‌سازی می‌شود زیراپپتیدهای‌کوچک‌توانایی‌تثبیت‌سلول‌های کف را ندارند. علاوه بر این، پپتیدهای کوچکتر اجازه جذب سریع آب را می‌دهند بنابراین کشش سطحی را کاهش می‌دهند. مطالعه انجام‌شده‌توسط Razali و همکاران (۲۰۱۵) در مورد ژلاتین هیدرولیزشده‌پوست‌ماهی‌کوبانیز نشان داد، بالاترین ظرفیت کف مربوط به هیدرولیز ژلاتین ۵ کیلو دالتون و به دنبال آن ۱۰کیلودالتون و۳ کیلو دالتون بود. بنابراین بر ظرفیت کف پروتئین‌هیدرولیزات‌دروزن مولکولی مختلف تأثیر می‌گذارد (۲۷).



شکل٦- ظرفیت کف کردن هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس



شکل۷-پایداری کف هیدرولیز پروتئین کلرلا ولگاریس

٤- نتیجه‌گیری

دراین پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پپتیدهای تخلیص‌شده‌ازهیدرولیزآنزیمی‌جلبک کلرلا ولگاریس تعیین شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیزشده نشان داد که از میان آنزیم آلکالازو فلاورزایم، آنزیم‌آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئین‌بالایی‌تولیدکند وهمچنین‌افزایش‌زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت. سپس خاصیت آنتی‌اکسیدانی وعملکردی این پروتئین با وزن‌های مولکولی ۳، ۵ و۱۰کیلودالتون سنجیده شد. نتایج نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی۳ کیلو دالتون بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود و همچنین از خواص عملکردی مناسبی نیز برخوردار بود، اما خاصیت عملکردی پروتئین با وزن مولکولی ۵ کیلو دالتون بالاتر بود. بنابراین می‌توان از پروتئین هیدرولیزشده جلبک کلرلا ولگاریس توسط‌آنزیم‌آلکالازبا وزن مولکولی۳ کیلودالتون

به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در صنعت غذا و دارو و با وزن مولکولی ۵ کیلودالتون به‌عنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود.

۵- منابع

1. Abdel-Karim, O., Gheda, S., Ahmed Ismail, G. and Abo-Shady, A., 2020. Phytochemical Screening and antioxidant activity of Chlorella vulgaris. *Delta Journal of Science*, 41, pp. 81- 91.
2. Aderinola, T., Fagbemi, T., Enujiugha, V., Monisola Alashi, A. and Emmanuel Aluko, R., 2018. Amino acid composition and antioxidant properties of Moringa oleifera seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*, 4 (10), pp.870-887.
3. AOAC., 2005. Official Method of Analgsis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.
4. Bera, M.B. and Mukherjee, R.K., 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci*, 54(1).,142-145.
5. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114, pp.1198-1205.
6. Camila Da Costa, D., Karina Oliveira, L., Caio Hendrix, L., Fabíola Helena, D., Da Rocha, M. and Prentice, P., 2019. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activity of Protein Hydrolysates and Peptide Fractions Derived from Colossomamacropomum and Their Effect on Ground Beef Lipid Oxidation. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 28(6), pp. 677-688.
7. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G. F., 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*, 15, pp.301-313.
8. Chia, SR., Chew, KW., Zaid, HFM., Chu, D-T., Tao, Y. and Show, PL., 2019. Microalgal Protein Extraction From Chlorella vulgaris FSP-E Using Triphasic Partitioning Technique With Sonication. Front. Bioeng. *Biotechnol*, 7, p.396.
9. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B. A., 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3), pp. 1207-1214.
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. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M. J., 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein. *science of food and agriculture*, 15, pp. 3165–3176.
12. Fradique, M., Batista, A. P., Nunes, M. C., Gouveia, L., Bandarra, N. M. and Raymundo, A., 2010. Incorporation of Chlorella vulgaris and Spirulina maxima biomass in pasta products. Part 1: Preparation and evaluation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(10), pp. 1656-1664.
13. Hamzeh, A., Rezaei, M. and Khodabandeh, S., 2019. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measure*, 12, pp.721–727.
14. Irene Kai Ru, Tiong., Thilahgavani, Nagappan., Mohd Effendy, Abdul Wahid., Tengku Sifzizul Tengku, Muhammad., Toda, Tatsuki., Woro Hastuti, Satyantini., Gunanti, Mahasri., Patrick, Sorgeloos., Yeong Yik, Sung., 2020b. Antioxidant capacity of five microalgae species and their effect on heat shock protein 70 expression in the brine shrimp

hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2), pp. 460-465.
23. Pezeshk, S., Ojagh, S., Rezaei, M. and Shabanpour, B.,2019. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. *Journal of Genetic Resources*, 3(2), pp.103-112.
24. Phelan, M., Aherne, A., FitzGerald, R. and O'Brien, N., 2009. Caseinderived bioactive peptides: biological effects, uses, safety aspects and regulatory status. *International Dairy Journal*,19(11), pp. 643-654.
25. Prasad, K.N., Xie, H., Hao, J., Yang, B., Qiu, S., Wei, X., Chen, F. and Jiang, Y., 2010. Antioxidant and anticancer activities of 8-hydroxypsoralen isolated from wampee [Clausena lansium (Lour.) Skeels] peel. *Food Chemistry*, 118, pp. 62-66.
26. Rajabzadeh, M., Pourashouri, P., Shabanpour, B. and Alishahi, A., 2017. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout *(Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Science & Technology*, 53(2), pp.313–319.
27. Razali, A.N., Amin, A.M. and Sarbon, N.M., 2015. Antioxidant activity and functional properties of fractionated cobia skin gelatin hydrolysate at different molecular weight. *International Food R esearch Journal*, 22(2), pp. 651–660.
28. Saallah, S., Ishak, N.H. and Sarbon, N.M., 2020. Effect of different molecular weight on the antioxidant activity and physicochemical properties of golden apple snail (*Ampullariidae*) protein hydrolysates. *Food Research*, 4 (4), pp. 1363–1370.
29. Safi, C., Zebib, B., Merah, O. and Pontalier, P., 2014. Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, pp.265–278.
30. Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S. Z. and Najafian, L., 2020. Effects of enzyme Artemia, Aquaculture Reports, 18, pp.100433, ISSN 2352-5134,
15. Irene Tiong, Kai Ru., Yeong, Yik Sung., Malinna, Jusoh., Mohd Effendy Abdul Wahid. and Thilahgavani, Nagappan., 2020a. Chlorella vulgaris: a perspective on its potential for combining high biomass with high value bioproducts, *Applied Phycology*, pp. 2- 11.
16. Jacob-Lopes, E., Ramírez Mérida, L. G., Queiroz, M. I., Zepka, L. Q., 2015. Microalgal biorefineries. In E. Jacob-Lopes & L. Q. Zepka (Eds.), Biomass production and uses. London: IntechOpen.
17. Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W. and Luo, L., 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119, pp. 336–42.
18. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. and Espe, M., 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatichydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry*, 37, pp.1263–1269.
19. Mohamed, B. E., Abo-El-Khair, M., Samah, M. and Shalaby, G., 2013. Quality of Novel Healthy Processed Cheese Analogue Enhanced with Marine Microalgae Chlorella vulgaris Biomass. *World Applied Sciences Journal,* 23 (7), pp. 914-925
20. Nasir, S.N.A.M .and 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, pp.101254.
21. 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), pp. 950-956.
22. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012. Chemical and biochemical

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), pp. 256-270.

31. Shahidi, F. and Onodenalore, A., 1995. Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53, pp.51-54.
32. Sheng, L., Olsen, S.A., Hu, J., Yue, W., Means, W.J. and Zhu, M.J., 2016, Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC "top-six" non-O157 Shiga toxin producing E. coli. *International Journal of Food Microbiology*. 229, pp. 24-32.
33. Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T., 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44, pp. 668-677.
34. Taghavi Takyar, M.B., Khajavi, S. H. and Safari, R., 2019. Evaluation of antioxidant properties of Chlorella vulgaris and Spirulina platensis and their application in order to extend the shelf life of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fillets during refrigerated storage. *LWT*, 100, pp. 244- 249.
35. Taheri, A., Anvar, S., Ahari, H. and Fogliano, V., 2013. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout . *IJFS*, 12(1), pp. 154-169
36. Varedesara, M.S., Ariaii, P. and 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, pp. 2180–2190.
37. Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K. and Delcour, J.A., 2016. Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein Hydrolysates in food systems. *Compr Rev Food Sci Food Saf*, 15, pp.786– 800.
38. Wu, W.U., Hettiarachchy, N.S. and Qi, M., 1998. Hydrophobicity, solubility, and emulsifying properties of soy protein peptides prepared by papain modification and ultrafiltration. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 75(7), pp.845–850.
39. 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, pp.625–632.
40. Ye, N., Hu, P., Xu, S., Chen, M., Wang, S., Hong, J. and Cai, T., 2018. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. Journal of Food Quality, 15 (2), pp. 1–9.
41. Zielinska, E., Kara´s, M. and Baraniak, B., 2018. Comparison of functional properties of edible insects and protein preparations thereof. *LWT*, 91, pp.168–174.

(Original Research Paper)

Evaluation of Antioxidant and Functional Properties of Hydrolyzed Protein from Chlorella Vulgaris by Enzymatic Hydrolysis

Shima Taghdiri[1], Mojgan Emteyazjoo[2*], Mohammad Hossein Azizi[3] , Peiman Ariayi[4], Marjaneh Sedaghati[5]

1-PhD Student, Department of Food Science and Technology,Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2-Associate Professor, Faculty of Marine Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Associate Professor,Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
5- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received:05/03/2022 Accepted:23/05/2022

Abstract

Microalgae are one of the oldest inhabitants of the oceans and freshwaters. One of the most famous is the green seaweed Chlorella vulgaris. In this study, the antioxidant and functional properties of the hydrolyzed protein of Chlorella vulgaris were determined. For this purpose, the hydrolyzed protein of Chlorella vulgaris was produced by commercial enzymes alcalase and flavourzyme at intervals of 10, 20 and 30 minutes. The results related to the properties of hydrolyzed protein showed that the protein hydrolyzed by alcalase had a higher degree of hydrolysis than the enzyme flavourzyme. As well as, increasing the hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ($p < 0.05$). The highest values of degree of hydrolysis and protein recovery were observed by alcalase at 30 minutes (37.63% and 18.44%, respectively). Chlorella vulgaris was high in essential amino acids. Then, the antioxidant and functional properties of proteins (by both enzymes at 30 minutes) were measured with molecular weights of 3, 5 and 10 kDa. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase enzyme with a molecular weight of 3 kDa had the highest antioxidant activity ($p < 0.05$) and also had good functional properties. Therefore, the hydrolyzed protein derived from the alga Chlorella vulgaris (by the enzyme alcalase) can be used as a substitute for animal proteins in the diet as well as functional compounds in food formulations.

Keywords: Antioxidant, Alcalase and Flavourzyme Enzyme, Hydrolyzed Protein, Chlorella Vulgaris.

*Corresponding Author: moz_emtyazjoo@yahoo.com