

(مقاله پژوهشی)

**بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده شاهدانه**شیوا گنجی جامه شورانی<sup>۱</sup>، علی محمدی ثانی<sup>۱\*</sup>، الهام مهدیان<sup>۱</sup>، زهرا سیدالنگی<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران.

۲- گروه شیمی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۶/۰۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۱۱/۲۳

**چکیده**

در بین ترکیبات فراسودمند، پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها با دارا بودن ویژگی‌های بسیاری مانند آلرژی‌زایی کم، کاهش فشارخون، نقش ضد دیابت، ضد سرطان، منبع طبیعی و کارآمد آنتی اکسیدان‌ها با فعالیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و بسیاری مزایای سلامتی بخش دیگر قرار دارند. شاهدانه با نام علمی *Cannabis sativa L.* از قدیم نقش مهمی در تولید فرمولاسیون‌های غذایی، دارو و فیبر داشته است. در این پژوهش، استخراج پروتئین از تفاله حاصل از روغن‌کشی شاهدانه انجام شد. سپس، اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز (۳۰۰-۶۰ min) بر درجه هیدرولیز، مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS، مهار رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیاء‌کنندگی هیدرولیز شده‌ها بررسی گردید. ارزیابی آماری نتایج با استفاده از طرح فاکتوریل و مقایسه میانگین‌ها در ۳ تکرار با آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) انجام شد. نتایج هیدرولیز آنزیمی حاکی از افزایش درجه هیدرولیز با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بودند. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS، هیدروکسیل و قدرت احیاء‌کنندگی پروتئین شاهدانه پس از هیدرولیز آنزیمی به ترتیب از ۷/۸۵ به ۵۲/۰۴، از ۴۷/۱۳ به ۸۰/۰۳، از ۳۰/۱۳ به ۷۲/۹۶ و از ۰/۵۵ به ۰/۷۹ درصد افزایش یافتند. بطور کلی، هیدرولیز آنزیمی پروتئین خام تا ۲۴۰ دقیقه حاکی از تاثیر مثبت فرآیند هیدرولیز بر افزایش ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و مهار انواع رادیکال‌های آزاد بود.

**واژه های کلیدی:** پپتید زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی، فعالیت آنتی اکسیدانی، شاهدانه.

## ۱- مقدمه

امروزه با افزایش مشکلات جدی پیش رو بشر نظیر انواع بیماری‌های قلبی-عروقی<sup>۱</sup>، چاقی، دیابت و سرطان، محققین به ارتباط هر چه بیشتر و نزدیک‌تر بین غذا و سلامتی پی برده‌اند. از این رو، تحقیقات گسترده‌ای در خصوص غنی‌سازی محصولات غذایی و نوشیدنی‌ها با انواع ترکیبات سلامتی بخش (نظیر انواع مواد غذا-دارو<sup>۲</sup>) و تولید غذاهای فراسودمند<sup>۳</sup> صورت گرفته است. غذاهای فراسودمند، غذاهایی هستند که علاوه بر اثرات تغذیه‌ای، موجب بهبود سلامت مصرف‌کننده و کاهش خطر برخی بیماری‌های شوند. این نوع غذاها ممکن است با افزودن ترکیبات زیست فعال و یا حذف برخی ترکیبات مضر و نامطلوب تولید شوند (۱۱). در سیستم‌های غذایی به ویژه در روغن‌ها و محصولات غذایی برپایه روغن، اکسیداسیون روغن‌ها و چربی در طول فرآوری و نگهداری موجب افت شدید کیفیت و ارزش تغذیه‌ای آن‌ها می‌شود. مصرف این محصولات موجب بروز بیماری‌های بسیاری می‌شود. اکسیداسیون لیپیدها در مواد غذایی با تجزیه اسیدهای چرب و تولید بو و طعم اکسیده موجب از بین رفتن کیفیت، قابلیت استفاده و ماندگاری مواد غذایی می‌شود. در این بین، تخریب اکسیداتیو اسیدهای چرب چند غیراشباع به دلیل مستعد بودن به اکسیداسیون، چالشی در طراحی و تولید غذاهای پایدار فرآیند شده ایجاد کرده است (۲). برای ممانعت یا به حداقل رساندن اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی و طبیعی استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مقرون به صرفه و کارآمد هستند. اما اثرات سمی و خطرات ناشی از استفاده مداوم آن‌ها میل به استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی را افزایش داده است (۲۱). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با دارا بودن حداکثر ایمنی و حفظ سلامتی مصرف‌کننده از کارایی مطلوبی به عنوان جایگزین ضد اکسیدان‌های سنتزی در فرمولاسیون غذاهای مختلف برخوردارند. یکی از این منابع

تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی می‌توان به پروتئین‌ها اشاره کرد. اما استفاده از پروتئین‌ها طبیعی در مواد غذایی به عنوان شلاته‌کننده‌های فلزی با مشکلاتی همراه است. به علت دناتوراسیون پروتئین‌ها، ویژگی‌های اتصال به فلزات آن‌ها تغییر و با از دست رفتن حلالیت و تشکیل توده‌های پروتئینی موجب تغییر ویژگی‌های کیفی مواد غذایی می‌شود (۱۷). یکی از راه‌های کاهش و به حداقل رساندن این مشکل، اصلاح آنزیمی پروتئین‌هاست. از مزایای این روش می‌توان به بهبود قابلیت جذب، هضم‌پذیری و ویژگی‌های عملکردی مانند حلالیت اشاره کرد که کاربرد آن‌ها را در طیف وسیع‌تری از مواد غذایی و فرمولاسیون‌های مختلف میسر ساخته است (۱۴). در صنایع غذایی چالش‌ها و افزایش روز افزون تقاضا برای تولید غذاهای سلامتی‌بخش و استفاده از ترکیبات ریزمغذی و زیست فعال موجب گسترش چشم‌گیر استفاده از فناوری ریزپوشانی برای غنی‌سازی و حفظ ترکیبات در فرمولاسیون‌های غذایی شده است. یکی از این ترکیبات زیست فعال، پروتئین‌ها و پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی منابع مختلف حیوانی و گیاهی هستند. اما استفاده از این ترکیبات در تولید غذاهای فراسودمند و عملگرا به دلیل چالش‌هایی مانند طعم تلخ<sup>۴</sup>، جاذب‌الرطوبه بودن<sup>۵</sup>، آب‌گریزی<sup>۶</sup>، واکنش با ماتریکس غذا، ناسازگاری<sup>۷</sup>، محدودیت زیست دسترسی<sup>۸</sup> و زیست پایداری<sup>۹</sup> محدود شده است (۲۲). مزایای زیست فعالی پپتیدها تحت تاثیر شاخص‌های زیست دسترسی و زیست پایداری آن‌ها قرار می‌گیرد. چندین سال است ریزپوشانی ترکیبات مختلف زیست فعال (مانند پلی‌فنول‌ها، کاروتنوئیدها و اسیدهای چرب امگا-۳) با هدف رسانش هدفمند و غنی‌سازی فرمولاسیون‌های غذایی مختلف در صنایع غذایی انجام می‌شود (۹). در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیزشده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و

4- Bitter Tast  
5- Hygroscopicity  
6- Hydrophobicity  
7- Incompatibility  
8- Bioavailability  
9- Biostability

1- Cardiovascular Diseases  
2- Nutraceutical  
3- Functional Food

فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. نتایج نشان دهنده اثر قابل توجه نوع آنزیم بردرجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها است. همچنین اثر غلظت‌های مختلف هیدرولیز شده بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بررسی شد و بالاترین درجه هیدرولیز مربوط به آلکالاز بود. فعالیت مهار رادیکال DPPH وابسته به غلظت هیدرولیز شده‌ها و بالاترین درصد آن مربوط به هیدرولیز شده‌های فلورزایم بود (۱۵). از آن جایی که یکی از مهم‌ترین ویژگی آنزیم‌ها، اختصاصی عملکردن آن‌ها و فعالیت در شرایط واکنش ملایم است، با در نظر گرفتن مزایا و کاربردهای چشمگیر و روزافزون تولید و استفاده از پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی، هدف از این پژوهش، بررسی امکان استخراج پروتئین از تفاله حاصل از روغن کشتی شاهدانه می‌باشد. همچنین تاثیر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین شاهدانه با آنزیم آلکالاز بر شاخص‌هایی مانند درجه هیدرولیز، مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال کاتیونی ABTS، مهار رادیکال هیدروکسیل، قدرت احیاء کنندگی پپتیدها بررسی شدند.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- تهیه مواد اولیه

دانه شاهدانه از بازار محلی خریداری شد. مواد شیمیایی مورد استفاده نیز از شرکت مرک آلمان تهیه گردیدند. آلکالاز (۲.۴ L)، تری‌کلرواستیک اسید<sup>۱</sup> (TCA)، کوماسی بلو (G250)، پتاسیم پرسولفات، ترلوکس، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، آلفا-داکسی ریبوز، دی‌کلرید آهن، فروزین، سولفات مس، پیریدین، پیروکاتکول ویولت، اسکوربیک اسید و تیوباربتوریک اسید<sup>۲</sup> (TBA) از سیگما خریداری شدند.

### ۲-۲- آماده سازی مواد اولیه

#### ۲-۱-۱- استخراج پروتئین

به منظور چربی‌زدایی، تفاله خشک حاصل به نسبت ۱:۴ (وزنی/حجمی) با هگزان مخلوط می‌شود و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق همزده می‌شود. سپس با استفاده از کیف

آلرژمی‌زایی کم‌تر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند. شاهدانه (*Cannabis sativa L.*) به عنوان یک گیاه مهم کشاورزی و منبع با ارزش غذایی، فیبر و دارویی محسوب می‌شود. دانه شاهدانه منبع با ارزشی از فیبر، روغن (حدود ۳۰ درصد) و پروتئین (۲۵ درصد) است. روغن شاهدانه نیز غنی از اسیدهای چرب چند غیر اشباع است. همچنین این دانه منبع غنی از پروتئین با کیفیت بالا و آمینواسیدهای ضروری به حساب می‌شود. پروتئین‌های شاهدانه به طور عمده از گلوبولین و آلبومین تشکیل شده است (۲۵). در رابطه با ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها و تاثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی، ژای و همکاران (۲۰۱۹) ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئین ماش<sup>۱</sup> رو بررسی کردند. در بین نمونه‌های مختلف، هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز بالاترین درجه هیدرولیز را نسبت به نوتراز<sup>۲</sup> و پاپاین<sup>۳</sup> داشتند. همچنین، مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS پس از هیدرولیز آنزیمی پروتئین خام به طور قابل توجهی افزایش یافت (۲۴). همچنین آمیگا پلن و همکاران (۲۰۱۵) هیدرولیز پروتئین‌های موجود در آرد هسته خرما را با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلورزایم<sup>۴</sup> و ترمولیزین<sup>۵</sup> به صورت مجزا یا در ترکیب با هم انجام دادند. در بین تیمارهای مختلف، نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز از کم‌ترین قدرت احیاء کنندگی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS برخوردار بودند؛ در حالی که بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسنین و مهار رادیکال هیدروکسیل بیشتری داشتند. در بین همه تیمارها، نمونه‌های هیدرولیز شده با ترکیب آلکالاز و فلورزایم از بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی برخوردار بودند (۳). در تحقیق لی و همکاران (۲۰۱۵)، هیدرولیز دانه کاملیا<sup>۶</sup> با فلورزایم، تریپسین، نوتراز، آلکالاز و پاپاین انجام شد. نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز بالاترین درجه هیدرولیز و

- 1- Mung Bean
- 2- Neutrase
- 3- Papain
- 4- Flavourzyme
- 5- Thermolysin
- 6- *Camellia Oleifera*

7- Trichoroacetic Acid  
1-Thio Barbituric Acid

### ۲-۲-۳- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴M) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش بردفورد تعیین شد (۴).

### ۲-۲-۴- مهار رادیکال آزاد DPPH

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش وو و همکاران (۲۰۰۳) با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای پروتئین شاهدانه هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰mg/ml) حل می شوند. سپس، ۱/۵ ml از هر نمونه با ۱/۵ ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۲ mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس می شود. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و سپس ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده می شود. سپس درصد مهار رادیکال آزاد با استفاده از معادله شماره ۱ محاسبه گردید (۲۳).

$$AA (\%) = \left[ \frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

در اینجا،  $A_{blank}$  (جذب نمونه شاهد) و  $A_{sample}$  (جذب نمونه هیدرولیز شده) هستند.

### ۲-۲-۵- فعالیت مهار رادیکال ABTS

فعالیت مهار رادیکال ABTS پودرهای پروتئین شاهدانه هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط یو و همکاران (۲۰۱۰) با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال  $ABTS^+$  با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ mM و ۲/۴۵ mM پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۶-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال  $ABTS^+$  به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می گیرد. قبل از آزمون، محلول  $ABTS^+$  با استفاده از (۰/۲ M, pH 7.4) PBS<sup>۱</sup> تا جذب  $0.7 \pm 0.2$

بوخنر هگزان جدا شده و آرد حاصل در دمای اتاق خشک می گردد و از الک با مش ۴۰ عبور داده می شود. برای استخراج پروتئین، پودر چربی زدایی شده به نسبت ۱:۱۰ با محلول ۰/۳۳NaCl مولار، pH=۹/۲۵ مخلوط شده و به مدت ۲ ساعت همزده می شود، سپس محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ خواهد شد. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در pH=۴/۵ (pH ایزوالکتریک پروتئین) تنظیم خواهد شد. سپس در جهت رسوب پروتئین ها، محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ می شود. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در ۴۵۰۰×g، به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می شود و با تنظیم pH=۷/۲ با افزودن NaOH ۱ مولار، دوباره به حالت محلول تبدیل شد. سپس ایزوله پروتئین حاصل با فریز درایر خشک شده و در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری می شود (۱۰).

### ۲-۲-۲- هیدرولیز آنزیمی پروتئین

برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، پروتئین استخراج شده از تفاله شاهدانه روغن گیری شده را در غلظت (W/V) ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۲M مولار (pH=۸) حل نموده و امکان هیدراته شدن کامل آن در حین هم زدن مداوم به مدت ۳۰min در دمای محیط محیا شد. سپس آنزیم آلکالاژ در نسبت آنزیم به پروتئین سوستر (W/W) ۲درصد به محلول حاوی پروتئین شاهدانه افزودن می شود. دمای واکنش ۵۰ °C و زمان واکنش در شرایط هم زدن مداوم با دور rpm ۲۰۰ بین ۶۰ الی ۳۰۰ دقیقه متغیر در نظر گرفته شد. پس از اتمام فرآیند هیدرولیز، برای غیرفعال کردن واکنش و فعالیت آنزیم، محیط واکنش در حمام آب ۹۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۱۵ min قرار داده شد. پس از آن، محلول تا دمای محیط خنک گردید. محلول در دور rpm ۵۰۰۰ به مدت ۱۰min سانتریفوژ شد. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد نگهداری گردید (۲۰).

### ۲-۲-۷- فعالیت قدرت احیاکنندگی

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۵ ml بافر فسفات ۰/۲ M (pH= 6.6) و ۰/۵ ml پتاسیم فری سیانید (W/V) ۱ درصد مخلوط شد. مخلوط در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه گردید. سپس، ۰/۵ ml محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ ml سوپرناتانت با ۱ ml آب مقطر و ۰/۲ ml فریک کلراید (W/V) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در ۴۰۵ nm ۷۰۰ پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (۱).

### ۲-۳- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شد. میانگین و انحراف معیار (SD) داده‌ها محاسبه شدند. اثر هر یک از متغیرهای فرآیند (زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی شامل ۶۰؛ ۱۲۰؛ ۱۸۰؛ ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه) با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه و نرم افزار SPSS نسخه ۱۹ مورد ارزیابی قرار گرفتند تا فاکتورهای مؤثر از لحاظ آماری شناسایی شوند. سپس مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی دار بودن اثر متغیرها در ( $P < 0.05$ ) انجام گردید.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز شاخص بسیار مهمی است که ویژگی‌هایی مانند اندازه و ترکیب اسید آمینه‌های پپتیدها، فعالیت بیولوژیکی و همچنین طعم پروتئین‌های هیدرولیز شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد (۱۲). شکل ۱ اثر زمان فرآیند بر درجه هیدرولیز پپتیدهای حاصل از پروتئین شاهدانه را نشان می‌دهد. نتایج حاکی از افزایش مقدار این شاخص در نتیجه افزایش زمان فعالیت آنزیم می‌باشند ( $P < 0.05$ ). بدین شکل که پس

در ۷۳۴ nm رقیق گردید. سپس ۴۰ μl از هر نمونه (حاوی ۴ mg protein/mL) به ۴ ml محلول رقیق شده ABTS<sup>+</sup> افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس و به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳۴ nm اندازه‌گیری گردید. منحنی استاندارد با واکنش ۴۰ μl ترولوکس<sup>۱</sup> (۵۰، ۱۰۰، ۲۵۰، ۵۰۰، ۷۵۰، ۱۰۰۰ μM) با ۴ ml محلول رقیق شده ABTS<sup>+</sup> تهیه شد. فعالیت مهار رادیکال ABTS<sup>+</sup> بر اساس منحنی استاندارد ترولوکس به شکل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترولوکس<sup>۲</sup> (TEAC, mM) و با استفاده از معادله  $y = 0.0359x + 4.4819$  با  $R^2 = 0.9975$  تعیین گردید (۲۷).

#### ۲-۲-۶- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از اکسیداسیون ۲-داکسی ریبوز<sup>۳</sup> بر طبق روش کیم و مینامیکاوا (۱۹۹۷) و با اندکی اصلاحات تعیین شد. برای این آزمون، ۰/۲ ml از مخلوط ۱۰ mM (FeSO<sub>4</sub>-EDTA)، ۰/۵ ml (۱۰ mM) آلفاداکسی ریبوز، ۰/۲ ml نمونه هیدرولیز شده، ۰/۹ ml سدیم فسفات بافر ۰/۲ M (pH 7.4) و ۰/۲ ml پراکسید هیدروژن (۱۰ mM) با هم مخلوط شدند. مخلوط در ۳۷ درجه سانتی‌گراد برای ۱ ساعت انکوبه شد. سپس، ۱ ml تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲/۸ درصد برای توقف واکنش به مخلوط افزوده گردید. مخلوط برای ۱۵ دقیقه ابتدا در حمام آب جوش و سپس در یخ سرد شده، قرار گرفت. جذب مخلوط در ۵۳۲ nm با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه شاهد استفاده گردید. فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل به شکل سرعت مهار اکسیداسیون آلفاداکسی ریبوز به وسیله رادیکال‌های هیدروکسیل و با استفاده از معادله ۱، ارزیابی می‌شود (۱۳).

1- Trolox Rolox

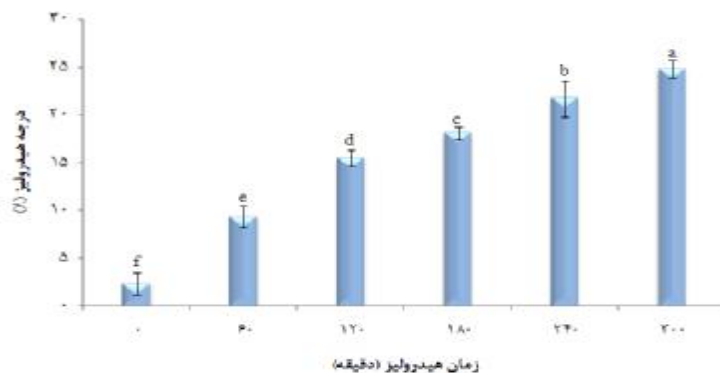
2- Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

3- Deoxyribose

4- Standard Deviation (SD)

موجب طولانی تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می گردد (۱۲ و ۲۷).

از ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز، مقدار این شاخص به حدود ۲۵ درصد رسید. این نتایج نشان می دهند که افزایش زمان فرآیند

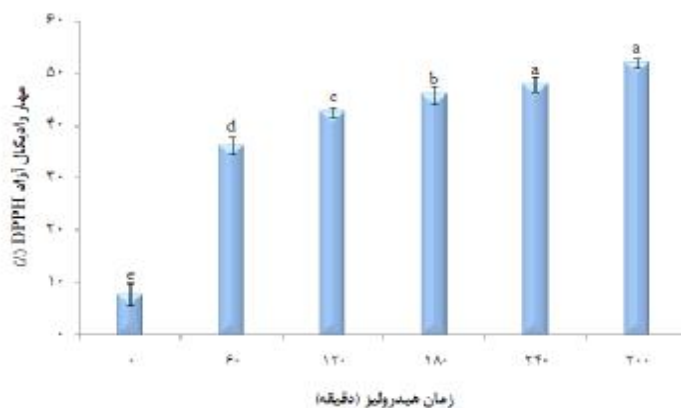


شکل ۱- اثر زمان فرآیند هضم آنزیمی بر درجه هیدرولیز پپتیدها

### ۳-۲- مهار رادیکال آزاد DPPH

با توجه به اهمیت این شاخص در مطالعات مختلف، رادیکال آزاد DPPH به طور گسترده برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف احیاء کننده به کار می رود (۲۶). نتایج حاصل از ارزیابی اثر زمان هیدرولیز آنزیمی بر درصد مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۲ مورد بررسی قرار گرفت.

در تحقیقی، یو و همکاران (۲۰۰۹) اثر زمان فرآیند هیدرولیز با آنزیم های پاپائین و پرتامکس را بر درجه هیدرولیز و ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده ماهی تیان<sup>۱</sup> بررسی کردند. آن ها گزارش کردند که با افزایش زمان فرآیند از ۲ به ۴ و سپس ۶ ساعت، درجه هیدرولیز نمونه ها به ترتیب از ۱۸ درصد به ۲۳ و ۲۸ درصد افزایش یافت (۲۶).



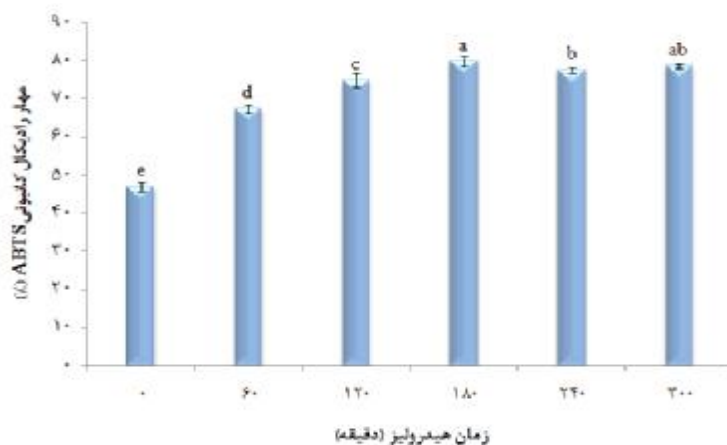
شکل ۲- اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر مهار رادیکال آزاد DPPH در پروتئین شاهدانه

می‌شود. افزایش قطبیت موجب دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال محلول در لیپید DPPH می‌شود (۲۷). درخصوص عدم افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیز شده‌های حاصل از زمان‌های طولانی‌تر نیز یافته‌های مشابهی گزارش گردید. در تحقیق مشابهی، با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۲۳ درصد، مهار رادیکال آزاد DPPH از ۸۳/۵ به ۹۵/۵ درصد افزایش یافت. اما با افزایش درجه هیدرولیز به بیش از ۲۳ درصد، از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته شد (۲۶).

### ۳-۳- مهار رادیکال آزاد ABTS

یکی دیگر از شاخص‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، مهار رادیکال کاتیونی ABTS و ارزیابی ظرفیت مهار رادیکال آزاد معادل ترولوکس است. فعالیت ضد اکسایشی و قابلیت مهار رادیکال کاتیونی و محلول در آب ABTS نیز مانند سایر شاخص‌ها به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز و ترکیب اسید آمینه‌ای پپتیدها وابسته است. شکل ۳ نشان‌دهنده اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز بر فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS است. نتایج حاکی از اثر قابل ملاحظه فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر این شاخص داشتند. مقدار این شاخص در پروتئین اولیه پس از ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز از حدود ۴۷ به ۸۰ درصد افزایش یافت. اگرچه افزایش زمان هیدرولیز تاثیر مثبتی بر مقدار این شاخص نشان نداد ( $P < 0.05$ ).

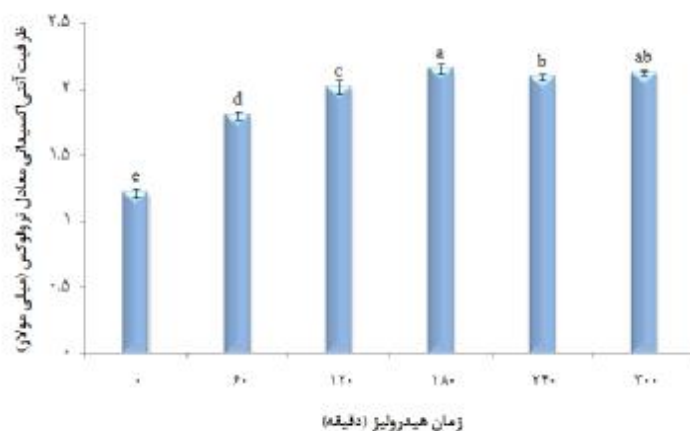
این نتایج حاکی از تاثیر قابل ملاحظه هیدرولیز آنزیمی بر تولید پپتیدهایی با فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بودند. به طور مثال، تنها ۶۰ دقیقه هیدرولیز پروتئین شاهدانه موجب افزایش مقدار این شاخص از حدود ۸ به ۳۶ درصد (بیش از ۴ برابر) گردید ( $P < 0.05$ ). روند افزایشی این شاخص تا ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز نیز ادامه یافت. اما هیدرولیز آنزیمی بیش از این مقدار، تاثیری بر فعالیت پپتیدها در مهار این رادیکال نداشت. عوامل مختلفی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH موثر هستند که از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به زمان فرآیند، درجه هیدرولیز و عملکرد هر آنزیم بر تولید پپتیدهای فعال و رهایش اسیدهای آمینه آنتی‌اکسیدان لیپوفیل اشاره کرد. در مورد اثر زمان فرآیند و در نتیجه درجه هیدرولیز، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌گردد (۱۲). از آنجایی که واکنش پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب تولید شده تحت تاثیر فعالیت آلکالاز با رادیکال لیپوفیل DPPH با سرعت بیشتری انجام می‌پذیرد، لذا این ترکیبات از قابلیت بالاتری در مهار این رادیکال در مقایسه با انواع هیدروفیل برخوردار هستند. علت کاهش در قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نتیجه افزایش زیاد درجه هیدرولیز را می‌توان به هیدرولیز کامل پپتیدها نسبت داد که منجر به رهایش کامل و دسترسی بالای آمینواسیدهای هیدروفیل



شکل ۳- اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در پروتئین شاهدانه

میلی مولار ترلوکس در پپتیدهای حاصل از ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز به دست آمد (شکل ۴).

همچنین یافته‌های مشابهی در ارزیابی اثر فرآیند و زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترلوکس در پپتیدها مشاهده گردید. بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ۲/۱۶



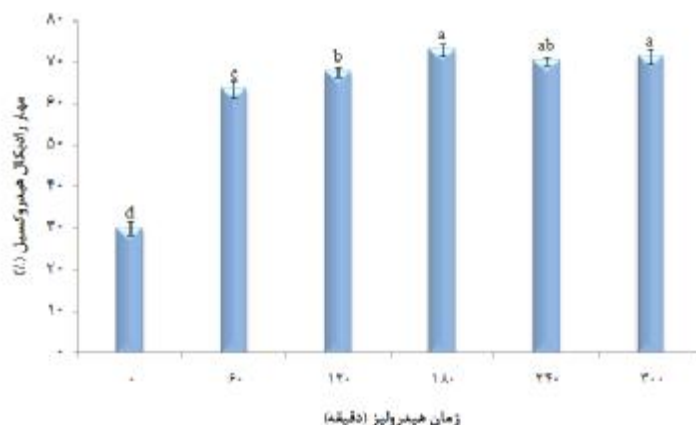
شکل ۴- اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی معادل ترلوکس در پروتئین شاهدانه

### ۳-۴- مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل

یکی از گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در بدن انسان، رادیکال هیدروکسیل است که به سهولت می‌تواند با مولکول‌های زیستی مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش، و در نتیجه موجب اختلالات فیزیولوژیکی شود (۵). از این رو، حذف رادیکال هیدروکسیل موجب حفاظت بدن در برابر رادیکال هیدروکسیل می‌شود. نتایج حاصل از ارزیابی اثر فرآیند و زمان هیدرولیز آنزیمی بر تولید پپتیدهای با قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل بررسی شدند (شکل ۵). این یافته‌ها حاکی از اثر قابل توجه هیدرولیز بر تولید پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند. تنها ۶۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی پروتئین شاهدانه موجب افزایش بیش از دو برابری (از ۳۰ به ۶۳ درصد) مهار رادیکال هیدروکسیل گردید ( $P < 0.05$ ). افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه منجر به افزایش مقدار این شاخص (حدود ۷۳ درصد) در هیدرولیز شده‌ها گردید. اگرچه زمان بالاتر فرآیند هیدرولیز آنزیمی تاثیری بر مقدار این شاخص نشان نداد.

با توجه به این‌که تفاوت کاملی از لحاظ نوع حلالیت بین رادیکال‌های DPPH (محلول در چربی) و ABTS (محلول در آب) وجود دارد، لذا نوع ترکیب اسید آمینه‌ای بر مهار هر یک از این رادیکال‌ها موثر هستند. بنابراین علت این تغییرات را می‌توان به افزایش رهایش آمینواسیدهای هیدروفوب و کاهش دسترسی آنتی‌اکسیدان‌های هیدروفیل برای واکنش با رادیکال ABTS نسبت داد (۲۶). در این راستا، یو و همکاران (۲۰۰۹) افزایش و سپس کاهش فعالیت مهار رادیکال ABTS را در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان گزارش کردند. همچنین در تحقیق مشابهی، اثر هیدرولیز پروتئین استخراج شده از عضله نوعی ماهی با پیسین (تا درجه هیدرولیز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد) بر مهار رادیکال آزاد ABTS بررسی شد. در بین نمونه‌های مختلف، هیدرولیز شده‌های با درجه هیدرولیز ۲۰ درصد از بالاترین درصد مهار رادیکال آزاد ABTS برخوردار بودند (۲۶). همچنین، هضم ثانویه با پانکراتین نیز موجب بهبود فعالیت هیدرولیز شده‌ها در مهار این رادیکال گردید (۱۸).





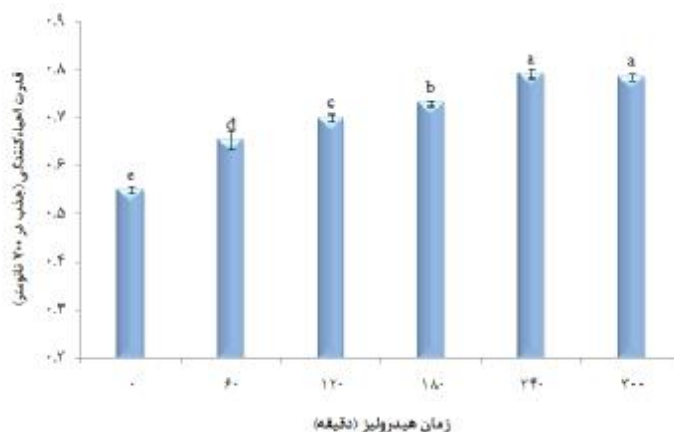
شکل ۵- اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین شاهدانه

غذایی هستند (۷). نتایج حاصل از این تحقیق در تطابق با یافته‌های یو و همکاران (۲۰۰۹) است که گزارش کردند با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۲۳ درصد، مهار رادیکال هیدروکسیل از ۴۵/۵ به ۶۵/۱ درصد افزایش یافت، اما افزایش بیشتر درجه هیدرولیز از ۲۳ به ۳۳ درصد موجب کاهش درصد فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل گردید (۲۶).

### ۳-۵- قدرت احیاءکنندگی

یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدان‌ها در نمونه‌های غذایی، احیاء کمپلکس فری سیانید ( $Fe^{3+}$ ) به شکل فرس ( $Fe^{2+}$ ) است (۸). قدرت احیاءکنندگی یکی دیگر از شاخص‌ها نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و دیگر ترکیبات آنتی‌اکسیدان است.

توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در جلوگیری از ایجاد تغییرات مخرب ناشی از اکسیداسیون لیپیدها بسته به ماهیت و ترکیب قسمت‌های مختلف پپتیدی، همچنین ویژگی‌های پروتئاز مورد استفاده متفاوت است. افزایش آمینواسیدها و گروه‌های فعال پس از هیدرولیز آنزیمی موجب افزایش خاصیت ضداکسایشی پروتئین‌هایی شوند. اسیدهای آمینه‌ای مانند تیروزین و سیستین در پروتئین‌های شیر و آب پنیر قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد را دارند (۱۹). همچنین، مطالعات انجام گرفته بر روی پپتیدهای حاوی هیستیدین نشان دادند که این پپتیدها به‌عنوان شلاته‌کننده‌یون‌های فلزی، خاموش‌کننده اکسیژن فعال و مهارکننده رادیکال هیدروکسیل هستند. از طرف دیگر، آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان نیز با قابلیت پروتون‌دهی به رادیکال‌های آزاد دارای فعالیت ضداکسایشی در سیستم‌های



شکل ۶- اثر زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر قدرت احیاءکنندگی در پروتئین شاهدانه

هیدرولیز شده شاهدانه علاوه بر این که موجب استفاده بهینه از این منبع گیاهی می‌گردد، می‌تواند به عنوان یک جزء غذایی دارای خواص عملکردی مناسب و حاوی پپتیدهای زیست فعال با خواص ویژه از جمله فعالیت آنتی اکسیدانی، در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار بگیرد.

#### ۵- منابع

1. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food chemistry*, 105 (1): 57-64.
2. Akoh, C.C. ed. 2017. Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. CRC press.
3. Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S. and Shahidi, F. 2015. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Foods*, 18: 1125-1137.
4. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72 (1-2): 248-254.
5. Cacciuto, M. A., Trinh, L., Lumpkin, J. A. and Rao, G. 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 14(3): 267-276.
6. Champagne, C.P. and Fustier, P. 2007. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 184-190.
7. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 49-53.
8. Dorman, H. D., Koşar, M., Kahlos, K., Holm, Y. and Hiltunen, R. 2003. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(16): 4563-4569.
9. Fathi, M., Martín, Á. and McClements, D. J. 2014. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. *Trends in Food Science and Technology*, 39: 18-39.

افزایش قدرت احیاء کنندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین شاهدانه با افزایش زمان فرآیند تا ۲۴۰ دقیقه مشاهده گردید. نتایج حاصل از این تحقیق بر کارایی فرآیند هیدرولیز در تولید پپتیدهایی با قدرت احیاء کنندگی بالا، دلالت داشتند (شکل ۶). شاخص احیاء کنندگی نیز همانند سایر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تحت تاثیر نوع پپتید، درجه هیدرولیز و عملکرد آنزیم‌ها بر رهایش اسیدهای آمینه خاص قرار می‌گیرد. به طور مثال، محققین بیان کردند که آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی و احیاء کنندگی خوبی برخوردار هستند. در نتیجه رهایش بیشتر این آمینواسیدها در طول زمان فرآیند هیدرولیز، تحت تاثیر عملکرد هر آنزیم بر قدرت احیاء کنندگی محصول نهایی موثر است. نتایج تحقیقات مختلف، حاکی از فعالیت ضد اکسایشی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های مختلف بود. علت افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده را می‌توان به شکست زنجیره پپتیدی، افزایش رهایش آمینواسیدهای با فعالیت ضد اکسایشی (مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین) و قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد نسبت داد (۱۲).

#### ۴- نتیجه گیری

امروزه اهمیت تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از منابع مختلف با قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد، تاثیرات درمانی و سلامتی بخش بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و منجر به تحقیقاتی در زمینه بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده، گردیده است. مهم‌ترین هدف از تولید پروتئین هیدرولیز شده، استفاده بهینه از بخش پروتئینی مواد غذایی، افزایش جذب و هضم این ترکیبات از طریق کاهش اندازه آن‌ها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی آن‌ها می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده شاهدانه یک مهارکننده آنتی‌اکسیدانی می‌باشد و در شرایط مختلف هیدرولیز تحت تاثیر فاکتورهایی مانند زمان فرآیند قرار می‌گیرد. با توجه به مجموع نتایج حاصل از این پژوهش، تولید پروتئین

20. Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishekar, H., Ghorbani, M. and Jafari, S. M. 2018. Microencapsulation of casein hydrolysates: Physicochemical, antioxidant and microstructure properties. *Journal of food engineering*, 237: 86-95.
21. Shahidi, F. and Zhong, Y. 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, 18: 757-781.
22. Udenigwe, C. C. 2014. Bioinformatics approaches, prospects and challenges of food bioactive peptide research. *Trends in Food Science and Technology*, 36: 137-143.
23. Wu, H. C., Chen, H. M. and Shiau, C. Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberaustriasicus*). *Food research international*, 36: 949-957.
24. Xie, J., Du, M., Shen, M., Wu, T. and Lin, L. 2019. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin- I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiata*). *Food chemistry*, 270: 243-250.
25. Yin, S. W., Tang, C. H., Cao, J. S., Hu, E. K., Wen, Q. B. and Yang, X. Q. 2008. Effects of limited enzymatic hydrolysis with trypsin on the functional properties of hemp (*Cannabis sativa* L.) protein isolate. *Food chemistry*, 106 (3): 1004-1013.
26. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 235-240.
27. You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. and Ren, J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 120: 810-816.
10. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M. J. 2015. Fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Society of Chemical Industry*, 15:3165-3176.
11. Gibson, G. R. and Williams, C. M. 2005. Functional foods. IFIS Publishing.
12. Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121(1): 178-184.
13. Kim, J. W. and Minamikawa, T. 1997. Hydroxyl radical-scavenging effects of spices and scavengers from brown mustard (*Brassica nigra*). *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 61(1): 118-123.
14. Kristinsson, H. G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43-81.
15. Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R. and Ding, C. 2015. Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted *Camellia oleifera* seed cake. *Journal of food science and technology*, 52 (9): 5681-5690.
16. Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J. and Singh, H. 2015. Behaviour of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chemistry*, 175: 16-24.
17. Mao, X. Y., Cheng, X., Wang, X. and Wu, S. J. 2011. Free-radical-scavenging and anti-inflammatory effect of yak milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 126: 484-490.
18. Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354-1362.
19. Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16: 1306-1314.

(Original Research Paper)  
**Evaluation of Antioxidant Activity of Cannabis Hydrolyzed Protein**

Shiva Ganji Jameh Shourani<sup>1</sup>, Ali Mohammadi Sani<sup>1\*</sup>, Elham Mahdian<sup>1</sup>, Seyyedeh Zahra Seyyed Alangi<sup>2</sup>

1- Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

2- Department of Chemistry, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran.

Received: 12/02/2020

Accepted: 29/08/2020

**Abstract**

Among the beneficial compounds, bioactive peptides from enzymatic hydrolysis of proteins have many properties such as low allergenicity, lowering blood pressure, anti-diabetic, anti-cancer role, natural and efficient source of antioxidants with chelating activity of metal ions and many other health benefits. Cannabis, scientifically known as *Cannabis sativa* L., has long played an important role in the production of dietary formulations, drugs and fiber. In this study, protein was extracted from the pulp of hemp oil. Then, the effect of time of enzymatic hydrolysis process with alkalase (60-300 min) on the degree of hydrolysis, inhibition of free radical DPPH, ABTS, inhibition of hydroxyl radical and regenerative power of hydrolyzates were investigated. Statistical evaluation of the results was performed using factorial design and comparison of means in 3 replications with one-way analysis of variance (ANOVA). The results of enzymatic hydrolysis showed an increase in the degree of hydrolysis with increasing time of enzymatic hydrolysis process. Free radical scavenging activity of DPPH, ABTS, hydroxyl and cannabis protein reducing power after enzymatic hydrolysis from 7.85 to 52.04, from 47.13 to 80.03, from 30.13 to 72.96 and from 55, respectively. Increased to 0.79%. In general, enzymatic hydrolysis of crude protein for up to 240 minutes showed a positive effect of the hydrolysis process on increasing the antioxidant properties and inhibition of free radicals.

**Keywords:** Bioactive Peptides, Enzymatic Hydrolysis, Antioxidant Activity, Cannabis.

---

\*Corresponding Author: [mohamadisani@yahoo.com](mailto:mohamadisani@yahoo.com)