بررسی پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از *آنابنا* و خواص ضداکسیدانی و ضدباکتریایی آن

مهدیه دراج[a]، مهناز سادات صادقی[b]*، مژگان امتیازجو[c]، ندا سلطانی[d]، فریبا زمانی هرگلانی[e]

[a] *دانشجوی دکتری دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست شناسی دریا، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران*
[b] *استادیار دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست شناسی دریا، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران*
[c] *استاد دانشکده علوم و فنون دریایی، گروه زیست شناسی دریا، واحد تهران شمال، دانشگاه آزاداسلامی، تهران، ایران*
[d] *استاد گروه علوم پایه – کاربردی، پژوهشکده جهاد دانشگاهی، ایران. ACECR، دانشگاه شهید بهشتی، تهران، ایران*
[e] *استادیاردانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۳/۰۷/۰۶

چکیده

مقدمه: امروزه سیانوباکتری‌ها که گروهی از جلبک‌های میکروسکوپی هستند بعنوان منبع پروتئینی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد توجه قرار گرفته‌اند. لذا هدف از مطالعه حاضر تولید پروتئین هیدرولیز شده از *آنابنا* و بررسی خواص ضداکسیدانی و ضدباکتریایی آن بود.

مواد و روش‌ها: پروتئین استخراج شده از آنابنا توسط آنزیم آلکالاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ به مدت ۸ ساعت هیدرولیز شد. پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده توسط یک سیستم RP-HPLC مورد بررسی قرار گرفت. خواص ضداکسیدانی نمونه‌های بدست آمده با روش سرکوب کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و شلاته کنندگی یون‌های فلزی سنجیده شد. در ادامه خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده تولید شده در برابر تعدادی از پاتوژن‌های بیماریزا بررسی شد.

یافته‌ها: پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده نشان داد که این نمونه حاوی مقادیر ۲/۷۵، ۴/۱۹، ۵/۴۲، ۵/۴۳، ۵/۶۵، ۵/۶۷، ۵/۶۳ و ۶/۶۳ درصد هیستیدین، ترونین، متیونین، والینریال فنیل‌آلانین، ایزولویسن، لوسین و لیسین بود که مقادیر بالاتری نسبت به نیاز روزانه آمینواسیدی کودکان و بزرگسالان می‌باشد و همچنین مقادیر مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری را نیز دارد. بالاترین درصد خنثی کنندگی در برابر رادیکال های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۸۸/۲۲٪ و ۶۸/۹۰٪ بود. بالاترین فعالیت شلاته کنندگی نمونه بدست آمده ۶۲/۶۹٪ در غلظت ۲ میلی‌گرم/میلی لیتر مشاهده شد. همچنین نتایج نشان داد بالاترین خواص ضدباکتریایی نمونه مورد بررسی در برابر باکتریهای *استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی موریوم* براساس قطر هاله عدم رشد به ترتیب ۶/۰۲، ۵/۹۰، ۶/۳۰ و ۳/۸۰ میلی متر در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر بود ($P< 0.05$).

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که پروتئین استخراج شده از آنابنا قابلیت استفاده برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی های ضداکسیدانی، ضدباکتریایی را دارد و پتانسیل استفاده در صنایع غذایی و دارویی را دارد.

واژه‌های کلیدی: *آنابنا، آلکالاز، پروتئین هیدرولیز شده، خواص ضداکسیدانی، خواص ضدباکتریایی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: mahnaz.sadeghi55@gmail.com

مقدمه

امروزه پروتئین حیوانی به عنوان پروتئین اصلی در صنایع مختلف از جمله صنایع غذایی و دارویی شناخته می‌شود، در حالی که استفاده بیش از حد از این نوع پروتئین منجر به مشکلات زیست محیطی خطرناکی نظیر بالا رفتن نرخ انتشار گازهای گلخانه‌ای، تغییرات آب و هوا، انقراض برخی از گونه‌های وحشی و کمبود تنوع زیستی شده است (Costa *et al*., 2023; Osanlou *et al*., 2022). در سال‌های اخیر به سبب افزایش سطح آگاهی عمومی درباره این چالش‌های جهانی، منابع گیاهی زمینی و دریایی بطورگسترده‌ای توسط بسیاری از دانشمندان به عنوان منابع پروتئین جایگزین با هزینه کم مورد بررسی قرار گرفته‌اند (Akbarbaglu *et al*., 2022; Costa *et al*., 2023). از همین رو، میکروجلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها به دلیل غنی بودن از ترکیبات زیستی ارزشمند نظیر پروتئین، کربوهیدرات، اسیدهای چرب اشباع نشده و رنگدانه به عنوان منبع با کیفیت برتر شناخته شده اند (Mendiola *et al*., 2008; Paliwal *et al*., 2022; Vejdani nia *et al*., 2022). در این راستا، سیانوباکتری‌ها به عنوان یک گروه متنوع از پروکاریوت‌ها هستند که به دلیل مقاومت عالی در مقابل غلظت نمک بالا و تنش خشکی همراه با توانایی منحصر به فرد در فتوسنتز در شرایط نوری نامناسب دارای مزیت‌هایی هستند (Abd El-Aty *et al*., 2014; Kini *et al*., 2020). آنابنا به دلیل تولید رنگدانه‌های خاص به‌عنوان جلبک سبز آبی شناخته می‌شود. این سیانوباکتری رشته‌ای چند سلولی را می‌توان به طور گسترده در محیط آب شیرین یافت و نقش زیادی در تثبیت نیتروژن کمپلکس نیتروژنیزه کننده حساس به اکسیژن دارد (Fadl *et al*., 2020). این گونه دارای سرعت رشد مناسب و مقاومت در برابر شوری و تابش نور زیاد در شرایط آزمایشگاهی بوده که فرآیند کشت آن مقرون به صرفه است. کشت در فضای باز آنابنا مرتبط با برخی از عوامل از جمله نور، دما، pH، شوری و تامین مواد مغذی است که تأثیر مستقیمی بر عملکرد رشد این گونه دارد (Moreno *et al*., 2003). علاوه براین، عوامل زیادی در فرآیند کشت دخیل هستند و با توجه به اینکه هر یک از عوامل می‌تواند بر عوامل دیگر تأثیر بگذارد، ارزیابی این عوامل برای بهینه‌سازی شرایط کشت نیازمند زمان و معرف‌های شیمیایی بسیار زیادی است (Amaral *et al*., 2020). از اینرو، در نظر گرفتن یک مدل بهینه‌سازی می‌تواند راه‌حلی مناسب برای کاهش چالش‌های موجود مرتبط با کشت این سیانوباکتری در شرایط آزمایشگاهی باشد (Safari *et al*., 2019). در این بین انواع مختلف مدل‌های بهینه‌سازی برای اهداف تحقیقاتی مختلف توسعه داده شده‌اند. روش سطح پاسخ (RSM)[1] یکی از این مدل‌ها است که می‌تواند حجم عظیمی از اطلاعات را در تعداد محدودی آزمایش خلاصه کند که منجر به صرفه‌جویی در زمان و هزینه می‌شود (Bezerra *et al*., 2008). همچنین طرح های مرکب مرکزی (CCD)[2] به دلیل توانایی تشخیص آنها به طرح‌های Box-Behnken (BBD) به عنوان یکی دیگر از طراحی‌های سطح پاسخ مورد توجه هستند (Bilanovic *et al*., 2009).

مانند بسیاری از سویه های سیانوباکتری، آنابنا حاوی ترکیبات متعددی از جمله لیپیدها، کلروفیل و پروتئین است که اثرات ضد باکتریایی و ضداکسیدانی را نشان می‌دهند. علاوه بر این، سه نوع خاص از فیکوبیلی‌پروتئین‌ها به نام‌های فیکواریترین‌ها، فیکوسیانین‌ها و آلوفیکوسیانین‌ها در آنابنا وجود دارد که به طور گسترده در مکمل‌های غذایی و لوازم آرایشی به عنوان ردیاب‌های فلورسنت و ضد اکسیدان‌های طبیعی استفاده می‌شوند (Johnson et al., 2014). آنابنا همچنین به دلیل دارا بودن پپتیدهای فعال زیستی و مزایای سلامتی بخشی نظیر خواص ضدباکتری، ضداکسیدان، ضدفشارخون و ضدسرطان شناخته شده است (Kini *et al*., 2020). پپتیدهای فعال زیستی در شکل اصلی خود غیرفعال هستند و برای نشان دادن فعالیت فیزیولوژیک باید هیدرولیز شوند (Kini *et al*., 2020). روش‌های متداولی برای هیدرولیز پروتئین از سیانوباکتری‌ها وجود دارد که شامل استفاده از حلال‌های آبی و آلی برای به دست آوردن عصاره پودری وجود دارد. در عین حال، این روش‌های سنتی می توانند بازده استخراج عصاره نهایی را کاهش دهند (Garcia-Moscoso *et al*., 2015). در حالی که هیدرولیز آنزیمی می‌تواند خلوص و عملکرد پروتئین بازیافت شده را در مقایسه با روش‌های سنتی بهبود ببخشد (Wahyuningtyas *et al*., 2022). این فرآیند به

[1] Response Surface Methodology

[2] Central Composite Design

طور کلی با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز انجام می‌شود و شرایط استخراج می‌تواند با تغییر برخی پارامترها از جمله دما، pH، غلظت آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا و حتی مدت زمان فرایند متفاوت باشد (Morris *et al.*, 2008). از این رو، استخراج آنزیمی یک روش انتخابی برای دستیابی به پروتئین هیدرولیز شده از جلبک‌ها و سیانوباکتری‌ها در نظر گرفته می‌شود (Samarakoon *et al.*, 2013).

در مطالعه حاضر بر اساس نتایج مطالعات قبلی در زمینه بهینه سازی شرایط کشت آنابنا، این سیانوباکتر در شرایط محیطی که بالاترین محتوای پروتئین را تولید کرده بود کشت داده شد و برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده شد. در ادامه خواص زیست فعالی نظیر ضداکسیدانی و ضدباکتریایی این پروتئین هیدرولیز شده مورد ارزیابی قرار گرفت.

- مواد و روش‌ها

- تهیه سیانوباکتری *آنابنا*

سیانوباکتری مورد مطالعه با استفاده از نتایج مطالعه قبلی کشت داده شد (Doraj *et al.*, 2023). بر اساس مطالعات قبلی مشخص گردیده بود که در شرایط pH ۵/۵، محتوای ازت ۵۰ میلی‌گرم/ لیتر، محتوای فسفر ۵۰ میلی گرم/ لیتر و شدت نور ۳۰۰۰ لوکس بالاترین مقدار تولید پروتئین بدست آمده است. لذا از این نمونه برای این تحقیق استفاده شد. سپس نمونه‌ها پودر و خشک گردید.

- استخراج پروتئین

استخراج پروتئین از آنابنا بر اساس روش Doraj و همکاران (۲۰۲۳) با کمی تغییرات انجام شد. نمونه‌های پودر بدست آمده ابتدا با آب مقطر به نسبت ۱:۲۰ مخلوط شدند. روش انجماد – ذوب (۹۰ دقیقه انجماد، ۳۰ دقیقه ذوب: ۳ بار) برای شکستن دیواره سلولی و تهیه عصاره سیانوباکتر انجام شد. برای استخراج بهتر پروتئین بعداز فرایند انجماد–ذوب از یک مرحله فرایند التراسونیکیش به مدت ۵ دقیقه در ۲۰ kHz و ۱۰۰ W استفاده شد. پس از فراصوت، نمونه‌ها با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع رویی جمع آوری شد. تری‌کلرواستیک اسید (TCA, Sigma-Aldrich 25%) سرد با نسبت ۵/۲ : ۱ به مایع رویی اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در حالیکه با یخ پوشانده شده بود باقی ماند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در ۸۰۰۰ دور در ساعت و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شدند. رسوبات باقیمانده جدا شده و با استفاده از ۵٪ TCA شسته و در همان شرایط سانتریفیوژ شدند. رسوب حاصل به عنوان عصاره پروتئینی جمع آوری شد. محتوای پروتئین محلول بر اساس روش Lowry (۱۹۵۱) (Lowry *et al.*, 1951) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA, Sigma-Aldrich) به عنوان استاندارد اندازه‌گیری شد. نمونه‌های پروتئین قبل از استفاده برای هیدرولیز در دمای یخچال نگهداری شدند.

- هیدرولیز پروتئین استخراج شده از آنابنا

هیدرولیز پروتئین با استفاده از آنزیم آلکالاز (ALCALASE® Enzyme| 126741, Merck) انجام شد. به این منظور، پس از تنظیم pH=۸، آنزیم به نمونه ها اضافه شد. سپس مخلوط حاضر به مدت ۸ ساعت در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از هضم آنزیمی، نمونه با استفاده از TCA ۲۰٪ رسوب داده شد; سپس درجه هیدرولیز تعیین شد. همچنین، پس از سانتریفیوژ، مایع رویی جدا شده و محتوای پروتئین آن بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد.

- آنالیز پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده

به منظور تعیین پروفایل اسیدهای آمینه، ابتدا هر نمونه به مدت ۲۴ ساعت با اسید کلریدریک ۶ نرمال در دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۴ ساعت با فنل ۱ درصد (v/v) هیدرولیز شدند هیدرولیز گردید و پس از سانتریفیوژ در g×12000 در دمای محیط به مدت ۳ دقیقه مشتق سازی با افتادی آلدئید (OPA) (سیگما) بر اساس آنالیز اسیدهای آمینه به روش فلوئورومتری انجام شد. پس از مشتق سازی اسیدهای آمینه با دستگاه RP-HPLC (Agilent 1200, US) با ستون C-RP ۱۸ با ابعاد ۴۶ میلی متر ×۱۵ سانتی متر به قطر ۵ میکرومتر (Teknokroma، اسپانیا) با جریان ۱/۳ میلی لیتر بر دقیقه و دیتکتور فلئورسانس (کانادا، Lab Alliance LC305) (ex.:330/em.:480) آنالیز گردید.

مقدار هر اسید آمینه در مقایسه با استاندارد اسیدهای آمینه تعیین گردید. آزمایشها در ۳ تکرار انجام گرفت (Naghdi et al., 2023a).

- فعالیت مهارکنندگی کنندگی رادیکال‌های آزاد 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH (مرک) توسط پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روشMahakhant و همکاران (۲۰۱۴) مورد بررسی قرار گرفت. محلول ۰/۱۶ میلی مولار DPPH تهیه شده و با استفاده از اتانول ۹۶ درصد رقیق شد. محلول DPPH تا زمان استفاده در جای تاریک نگهداری شد. در ادامه محلول DPPH با نمونه در نسبت ۱:۱ مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه در یک مکان تاریک نگهداری شد. پس از واکنش، جذب نمونه با استفاده از دستگاه الایزا (BioTec ELx 800, US) در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. همان نسبت DPPH و اتانول به عنوان شاهد در نظر گرفته شد و BHA در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌متر به عنوان استاندارد استفاده شد. مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده به شرح زیر اندازه گیری شد:

$$DPPH\ (\%) = ((Ac\text{-}As))/((Ac)) \times 100$$

Ac و As بترتیب میزان جذب کنترل و نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده هستند.

- فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (ABTS)

فعالیت مهار رادیکال ABTS (مرک) نمونه بدست آمده طبق روشNaghdi و همکاران (۲۰۲۳a) انجام شد. محلول استوک کاتیونی ABTS تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در مکانی تاریک در دمای محیط نگهداری شد. محلول رادیکال ABTS با بافر فسفات (۱۰۰ میلی‌مولار، pH 7.4) تا جذب ۰۰۲ ± ۰/۷۰ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس غلظت‌های ۰/۵ تا ۲ میلی‌گرم نمونه به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ABTS اضافه شد. پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در تاریکی در دمای محیط، جذب در طول موج ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار رادیکال های ABTS با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$ABTS\ (\%) = [AC\text{-}\ AS/\ Ac] \times 100$$

که در آن Ac جذب کنترل و AS جذب نمونه بود.

- توانایی شلاته کنندگی یونهای آهن

نمونه مورد بررسی با استفاده از روشی که توسط Naghdi و همکاران (۲۰۲۳) شرح داده شد، از نظر فعالیت شلاته کنندگی یون‌های آهن مورد آزمایش قرار گرفت. به طور خلاصه، ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های مختلف با ۴۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر $FeCl_2$ (۲ میلی‌مولار) مخلوط شده و به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد، ۲۰۰ میکرولیتر از محلول فروزین به مخلوط اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه به شدت تکان داده شد. همزمان در تیمار شاهد، از آب مقطر استفاده شد. در نهایت، اندازه‌گیری جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر انجام شد.

- سویه‌های باکتریایی و شرایط کشت

دو سویه باکتری گرم مثبت (استافیلوکوکوس اورئوس و لیستریا مونوسیتوژنز) و دو سویه باکتری گرم منفی (اشریشیا کلی و سالمونلا تیفی‌موریوم) برای تعیین خواص ضد باکتریایی پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده استفاده شد؛ لیستریا مونوسیتوژنز (CMCC 5407)، استافیلوکوس اورئوس (CMCC 26001)، اشرشیا کلی (O157:H7)، و سالمونلا تیفی‌موریوم (ATCC 13311). قبل از آزمایش دو بار به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رشد داده شدند.

- سنجش فعالیت ضد باکتریایی پروتئین هیدرولیز شده

فعالیت ضد باکتریایی پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های ۵۰ و ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر با استفاده از روش انتشار در آگار بررسی شد (Sadeghi *et al.*, 2018). سوسپانسیون‌های کشت باکتری که دارای جذب ۰/۰۸ در طول موج ۶۰۰ نانومتر بود تهیه شدند. سپس یک سوآپ استریل برای توزیع ۲۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون‌های تهیه شده روی محیط کشت تریپتیک سوی آگار استفاده شد. در مرحله بعد، ۵۰ میکرولیتر از محلول‌های نمونه در

صفحات پانچ شده استریل شده (قطر ۶ میلی‌متر) بارگذاری و روی ظروف پتری‌دیش حاوی محیط کشت تریپتیک سوی آگار قرار داده شد. پس از آن، پتری دیش‌ها در انکوباتور قرار گرفتند و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت انکوبه شدند. فعالیت ضدمیکروبی نمونه بر اساس ناحیه مهارکنندگی رشد اطراف آنها (قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر) ارزیابی شد. تمام آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

نسخه SPSS ۲۲ برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. تفاوت معنی‌داری بین متغیرها با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون چند دامنه‌ای دانکن ارزیابی شد. سطح معنی‌داری $p> ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

- **درجه هیدرولیز**

بر اساس نتایج بدست آمده مشخص گردید که درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده برابر با ۰/۹۲ ± ۲۲/۶۳ بود.

- **پروفایل اسید آمینه**

نتایج بررسی پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده در جدول ۱ گزارش شده است. همانطوری که از نتایج پیداست اسید آمینه‌های اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک با درصدهای 0/28 ± 11/23 و 0/22 ± 12/48 بالاترین درصد را در بین آمینواسیدهای تشکیل دهنده پروتئین هیدرولیز شده داشتند. همچنین محتوای اسید آمینه‌های ضروری و آبگریز به ترتیب 0/08± 50/03 و 0/08± ۴۳/۷۳ بود.

جدول ۱- پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده.

Table 1- Amino acid profile of the hydrolyzed protein.

Amino acid	Average (Percent)	Daily requirement according to WHO report	
		Adults	Children
Aspartic acid	11/23 ± 0/28		
Glutamic acid	12/48 ± 0/22		
Serine	4/73 ± 0/08		
Histidine	2/75 ± 0/06	1/6	1/5
Glycine	5/48 ± 0/25		
Threonine	5/43 ± 0/07	2/8	0/9
Arginine	5/57 ± 0/27		
Alanine	6/54 ± 0/07		
Tyrosine	6/11 ± 0/28		
Methionine	4/19 ± 0/16	2/2	1/7
Valine	5/65 ± 0/10	2/5	1/3
Phenylalanine	5/67 ± 0/15	2/2	1/9
Isoleucine	5/63 ± 0/08	3/1	3/1
Leucine	6/63 ± 0/17	6/1	5/9
Lysine	5/42 ± 0/15	4/8	4/5
Cysteine	2/55 ± 0/06		
Proline	3/94 ± 0/04		
Hydrophobic amino acid	43/73 ± 0/08		
Essential amino acid	50/03 ± 0/08		

Results are reported based on the average of three replicates ± SD.

- نتایج سرکوب کنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده

نتایج خواص ضداکسیدانی نمونه بدست آمده در غلظت‌های مختلف در مقایسه با ضداکسیدان صنعتی BHA در برابر رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. همانطور که از نتایج پیداست با افزایش غلظت خواص ضداکسیدانی آنها نیز افزایش یافت که مشابه با یافته های گزارش شده توسط محققین دیگر بود (Naghdi *et al.*, 2023 a,b). از طرفی در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده توانست ۸۸/۲۲ ٪ سرکوب کنندگی از خود نشان دهد که اختلاف نسبتا کمی در مقایسه با BHA داشت ($P< 0.05$).

- نتایج سرکوب کنندگی رادیکال آزاد ABTS پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده

درصدهای سرکوب کنندگی رادیکال آزاد ABTS پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ به ترتیب ۵۵/۵۲، ۶۱/۳۸، ۶۵/۴۹ و ۶۸/۹۰ ٪ بود. نتایج این بخش نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف نمونه پروتئین هیدرولیز شده در این آزمون وجود داشت و مشخص گردید که بالاترین غلظت مورد بررسی بالاترین ویژگی سرکوب کنندگی (۶۸/۹۰ ٪) بر علیه رادیکال‌های آزاد ABTS نشان داد ($P< 0.05$). بین غلظت‌های ۲ میلی‌گرم / میلی‌لیتر و ۱/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نمونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد در حالی‌که این دو غلظت با سایر غلظت‌ها اختلاف معنی‌داری نشان دادند.

- نتایج شلاته کنندگی یونهای فروزین توسط پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده

با افزایش غلظت نمونه درصد شلاته کنندگی یون‌های فروزین افزایش معنی‌داری نشان داد ($P< 0.05$). درصد شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده در تمام غلظت‌های بررسی شده در برابر BHA کمتر بود. همچنین بین غلظت‌های ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم/میلی‌لیتر نمونه پروتئین هیدرولیز شده و غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نمونه اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($P> 0.05$).

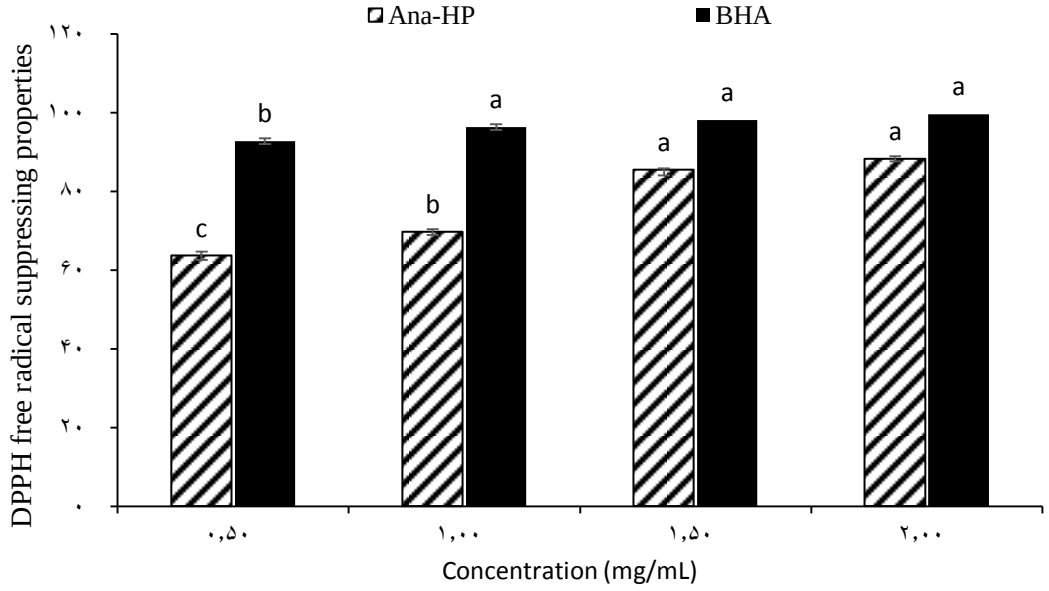

Figure 1- DPPH free radical suppressing properties of hydrolyzed protein obtained.

شکل ۱- خواص سرکوب کنندگی رادیکال های آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده

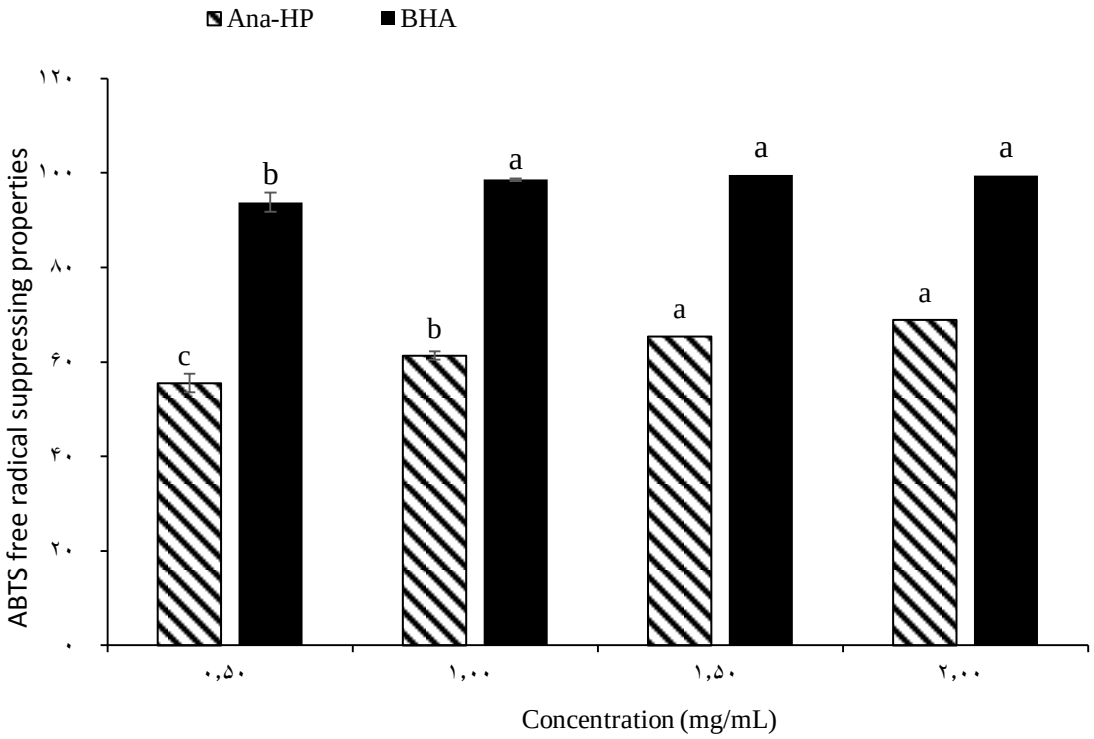

Figure 2- ABTS free radical suppressing properties of the obtained hydrolyzed protein.

شکل ۲- خواص سرکوب کنندگی رادیکال های آزاد ABTS پروتئین هیدرولیز شده.

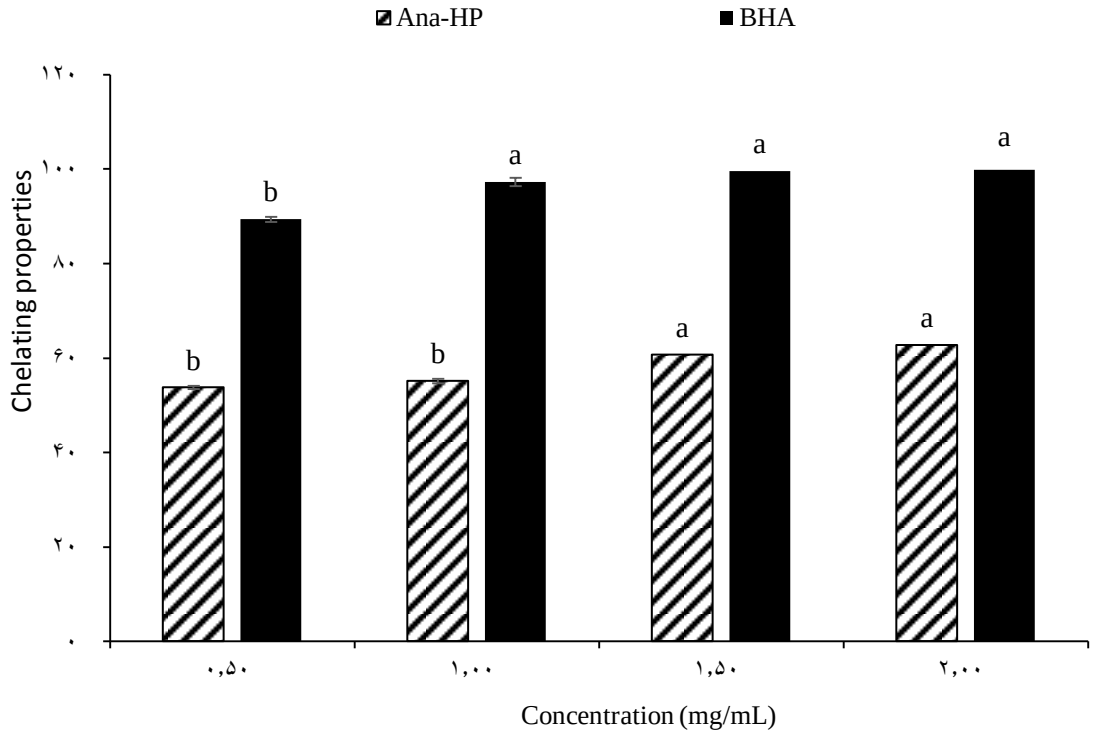

Figure 3- Chelating properties of ferrozine ions of the hydrolyzed protein.

شکل ۳ - خواص شلاته کنندگی یونهای فروزین پروتئین هیدرولیز شده.

- نتایج خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده

خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده در برابر باکتری‌های گرم مثبت (*استافیلوکوکوس اورئوس* و *لیستریا مونوسیتوژنز*) و گرم منفی (*اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی‌موریوم*) در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر نمونه بالاترین مقادیر را نشان داد. همانطور که از نتایج پیداست هاله عدم رشد بدست آمده در باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *اشریشیا کلی* و *سالمونلا تیفی موریوم* به ترتیب ۶/۰۲، ۵/۹۰، ۶/۳۰ و ۳/۸۰ میلی‌متر بود ($P< 0.05$).

بحث

از عوامل تاثیرگذار بر خواص زیست فعالی پروتئین‌های هیدرولیز شده درجه هیدورلیز می‌باشد (Akbarbaglu *et al.*, 2022). نتایج درجه هیدرولیز کمتر از نتایج بدست آمده توسط Akbarbaglu و همکاران (۲۰۲۲) بود که آنها به بررسی خواص زیست فعالی و کارکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده بدست آمده توسط پروتئازهای مختلف از اسپیرولینا پرداختند. به طور کلی، درجه هیدرولیز برای ارزیابی سرعت تجزیه (هیدرولیز) پروتئین‌ها و ارزیابی سینتیک واکنش استفاده می‌شود (Noman *et al.*, 2020). این شاخص تاحد زیادی مسئول تعیین فعالیت عملکردی و زیستی هیدرولیزها است (Akbarbaglu *et al.*, 2022). همچنین مقدار آن بدلیل عملکرد متفاوت آنزیم‌ها با سوبستراها مختلف می‌تواند متفاوت باشد (Noman *et al.*, 2020). هیدرولیز آنزیمی نیز تحت تأثیر عوامل متعددی از جمله ویژگی آنزیمی است که ممکن است این تفاوت را توجیه کند (Baharuddin *et al.*, 2016). علاوه بر این دما، غلظت آنزیم و pH بر سرعت واکنش تأثیر می‌گذارد و بنابراین به نحوی بر درجه هیدرولیز تأثیر می‌گذارند (Naghdi *et al.*, 2023a). به طور کلی، مقدار بالای این شاخص نشان می‌دهد که فرآیند هیدرولیز آنزیمی پیوندهای پپتیدی بیشتری را شکسته است (Noman *et al.*, 2020). در حال حاضر، پروتئازها برای هیدرولیز پروتئین‌ها به منظور تولید پپتیدهایی که حاوی توالی اسید آمینه‌ای و اندازه های مختلف ۲ تا ۲۰ اسید آمینه، بکار می‌روند (De Quadros *et al.*, 2019). همچنین عملکرد پپتیدها با ترکیب اسید آمینه و سطح آنها تعیین می‌شود. منابع مختلف، پروتئین‌های هیدرولیز شده متفاوتی با پروفایل‌های اسید آمینه متنوع تولید می‌کنند، که می‌توان این واقعیت را توضیح دهد که نوع سوبسترای مورد

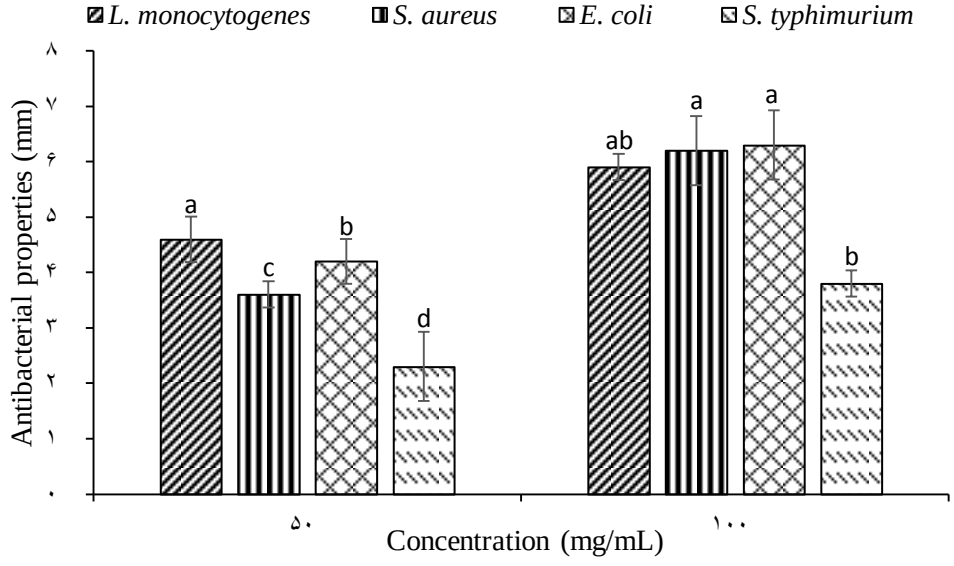

Figure 4- Antibacterial properties of hydrolyzed protein obtained against a number of food pathogens.

شکل ٤- خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده بر علیه تعدادی از پاتوژنهای غذایی.

استفاده برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده نقش عمده‌ای در تعیین پروفایل‌ها و محتوای اسید آمینه آن‌ها دارد (Baharuddin *et al.*, 2016). علاوه بر این، به خوبی ثابت شده است که عواملی مانند نوع آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، pH و غیره بر محتوای اسید آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده تأثیرگذار است (Noman *et al.*, 2020). بر اساس تحقیقات قبلی، گزارش شده است که برخی اسیدهای آمینه از جمله تیروزین، هیستیدین، متیونین و لیزین دارای توانایی مهار رادیکال قوی هستند (Akbarbaglu *et al.*, 2022)، که محتوای این اسیدهای آمینه در تحقیق حاضر به ترتیب ۰/۲۸ ± ۶/۱۱، ۰/۰۶ ± ۲/۷۵، ۰/۱۶ ± ۴/۱۹ و ۰/۱۵ ± ۵/۴۲ ٪ بود. همچنین گزارش شده است که آمینو اسیدهایی از قبیل گلیسین، آلانین، متیونین، والین، فنیل‌آلانین، ایزولوسین و پرولین با مهار رادیکال‌های دولایه‌های لیپیدی غشایی خاصیت ضداکسیدانی از خود نشان می‌دهند (Naghdi *et al.*, 2023b). علاوه بر این، حضور درصدهای بالای آمینو اسیدهای آروماتیک نظیر تیروزین، فنیل‌آلانین و تریپتوفان در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده پتانسیل ضد اکسیدانی بسیار خوبی در فعالیت شلاته کنندگی یونهای فروزین از خود نشان داده اند (Naghdi *et al.*, 2023b). با این حال، علاوه بر حضور آمینو اسیدهای خاص در پپتیدها، توالی آرایش اسید آمینه و ترکیب کلی پپتید می‌تواند به طور قابل توجهی بر پتانسیل ضداکسیدانی آنها تأثیر بگذارد (Akbarbaglu *et al.*, 2022). جالب توجه است، برخی از اسیدهای آمینه آبگریز مانند Val و Leu می‌توانند نقش مهمی در فعالیت ضداکسیدانی با واکنش با سیستم‌های لیپیدی در بدن و مواد غذایی ایفا کنند (Ruthu *et al.*, 2014). همانطور که از جدول ۱ پیداست محتوای هیستیدین، ترونین، والین، فنیل آلانین، ایزولوسین، لوسین و لیزین پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده بیشتر از مقادیر مورد نیاز مصرف روزانه کودکان و بزرگسالان است. از همین رو پروتئین هیدرولیز شده تولید شده بخوبی می‌تواند نیازهای روزانه آنها را برطرف سازد و مورد توجه صنعت غذایی و دارویی قرار بگیرد.

تعیین خواص ضداکسیدانی ترکیبات زیست فعال با استفاده از روش سرکوب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH یک روش پیشرفته و موثر در سنجش قدرت ضداکسیدانی ترکیبات است. این نشان می دهد که این نمونه پتانسیل کاربرد بعنوان ترکیب ضداکسیدان را در صنایع مختلف دارد. ویژگی سرکوب کنندگی رادیکال های آزاد توسط پروتئین های هیدرولیز شده به عوامل مختلفی نظیر وزن مولکولی، پروفایل اسید آمینه، درجه هیدرولیز و... بستگی دارد (Ktari *et al.*, 2013; Akbarbaglu *et al.*, 2022). از طرفی دیگر محتوای بالای اسید آمینه های هیدروفوبیک که شامل گلایسین، آلانین، متیونین، والین، فنیل آلانین، ایزولوسین، لوسین و پرولین است می‌تواند دلیل دیگر بالا بودن درصد سرکوب کنندگی در این مطالعه بوده باشد (Naghdi *et al.*, 2023b). چندین مطالعه گزارش کرده‌اند که چگونه فرآیند هیدرولیز با آنزیم‌ها بر خواص ضداکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی تأثیر می گذارد. این فرآیند منجر به تغییراتی در اتصالات بین مولکولی در کمپلکس‌های مختلف، مانند پروتئین–پلی ساکاریدها و پروتئین–لیپیدها می‌شود که منجر به ایجاد محلول‌های هیدرولیز پروتئین متنوع می‌شود (Chai *et al.*, 2012; Noman *et al.*, 2020). علاوه بر این، می‌توان از کارآیی پروتئین‌های هیدرولیز شده در برابر رادیکال های DPPH استنباط کرد که مخلوط پپتیدی از اسیدهای آمینه به طور موثری رادیکال های DPPH را از طریق تشکیل جفت الکترون سرکوب می‌کنند (Ktari *et al.*, 2013; Akbarbaglu *et al.*, 2022). Akbarbaglu و همکاران (۲۰۲۲) پیشنهاد کردند که تأثیر هیدرولیزها بر مهار رادیکال‌های آزاد را می توان به وجود بارهای مثبت روی پپتیدها و در نتیجه آزادسازی اسیدهای آمینه ضداکسیدانی نسبت داد. به طور خاص، اسیدهای آمینه آبگریز در DPPH عوامل مرتبط در این زمینه تلقی شدند.

گزارش شده است که پپتیدهای فعال زیستی با وزن مولکولی کم ویژگی‌های فیزیولوژیکی مناسب نظیر نفوذپذیری بالای غشاء و سازگاری ساختاری را از خود نشان داده‌اند (Naghdi *et al.*, 2023b). با این وجود، بزرگی پپتیدها عامل مهمی در قدرت زیستی آنها است. فعالیت زیستی ممکن است تحت تأثیر ترکیب و توالی اسیدهای آمینه قرار گیرد. سنجش رادیکال ABTS برای ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی به دست آمده از منابع مختلف مورد استفاده قرار می گیرد (Pezeshk *et al.*, 2019). در حال حاضر، به طور گسترده

پذیرفته شده است که ترکیبات خاصی از آنزیم ها و سوبستراها می توانند چندین پروتئین هیدرولیز شده با سطوح مختلفی از اسیدهای آمینه متمایز را تولید کنند، که ویژگی های ضداکسیدانی متمایزی را در نمونه های حاصل ایجاد می‌کنند (Sadeghi *et al.*, 2018; Heffernan *et al.*, 2021; Mousaie *et al.*, 2022). علاوه بر این، به طور گسترده شناخته شده است که عوامل مختلفی از جمله ترکیب و توالی اسید آمینه، وزن مولکولی پپتیدهای تولید شده و درجه هیدرولیز، عوامل مهمی در ایجاد فعالیت ضد رادیکال‌های آزاد مانند ABTS هستند (Gómez-Guillén *et al.*, 2010; Pezeshk *et al.*, 2019; Naghdi, Lorenzo, *et al.*, 2023). با این حال، باید توجه داشت که هر یک از عوامل ذکر شده به طور بالقوه می‌تواند نتایج متفاوتی را در بین نمونه‌های مختلف به همراه داشته باشد (Noman *et al.*, 2020). همانطور که توسط مطالعات مختلف گزارش شده است، به نظر می رسد نتایج متفاوتی در رابطه بین درجه هیدرولیز و افزایش ظرفیت جذب رادیکال آزاد وجود داشته باشد (Latorres *et al.*, 2018). به‌عنوان مثال برخی از تحقیقات افزایش ظرفیت فوق‌الذکر را با افزایش سطوح هیدرولیز نشان داده‌اند (Latorres *et al.*, 2018)، در حالی که برخی از تحقیقات نتایج مخالفی را گزارش کرده‌اند (Park *et al.*, 2014). همچنین نشان داده شده است که تری‌پپتیدهایی که دارای تریپتوفان یا تیروزین در C–پایانه خود هستند، فعالیت مهار رادیکال قابل توجهی از خود نشان می‌دهند (Senadheera *et al.*, 2021). یافته‌های تحقیقاتی Song و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند که پپتیدهای خاصی مانند Lys، Arg، His و Pro، فعالیت ضداکسیدانی برجسته‌ای از خود بروز دادند، در حالی که فراکسیون‌های پپتیدی حاوی اسیدهای آمینه اساسی قابل‌توجهی، کارآیی بیشتری در مهار کاتیون‌های رادیکال ABTS نشان دادند. تولید رادیکال‌های هیدروکسیل [OH] در سیستم‌های زیستی می‌تواند با حضور بیش از حد یون‌های فلزی، عمدتاً Fe(II)، از طریق واکنش‌های شبه فنتون ایجاد شود (Tkaczewska, 2020). زنجیره‌های جانبی شامل کربوکسیل (Glu، Asp) و گروه‌های آمینه (Lys، His، Arg)، با ممانعت از دسترسی به فلزات واسطه، به عنوان شلات‌کننده فلز عمل می‌کنند و در نتیجه واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداتیو با واسطه رادیکال را مهار می‌کنند (Ranathunga *et al.*, 2006; Klompong *et al.*, 2009).

طبق یافته‌های Nikoo و همکاران (۲۰۱۹) پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین نسبت بار منفی بیشتری نسبت به جرم خود، به ویژه از طریق حضور گروه‌های کربوکسیل نشان می‌دهند. این خاصیت آن‌ها را قادر می‌سازد تا کمپلکس‌های یون فلزی مؤثرتری را در مقایسه با پپتیدهای بزرگ‌تر تشکیل دهند، در نتیجه حساسیت آن‌ها به واکنش‌های شیمیایی، به‌ویژه اکسیداسیون لیپید را کاهش می‌دهد. Sadeghi و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که پروتئین‌های هیدرولیز شده و فراکشن به دست آمده از اسپیرولینا در برابر استافیلوکوکوس اورئوس فعالیت ضد باکتریایی بالاتری را نسبت به باکتری اشرشیا کلی نشان دادند که با نتایج ما همسو بود (Sadeghi *et al.*, 2018). فعالیت ضد میکروبی هیدرولیزهای پروتئینی تابع مجموعه‌ای از عوامل است که شامل ترکیب اسید آمینه، وزن مولکولی، توالی، ویژگی‌های ساختاری، آبگریزی، بار و نوع گونه‌های باکتری موجود است (Naghdi *et al.*, 2023). تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای ضد میکروبی معمولاً از ۵۰ تا ۱۰۰ اسید آمینه تشکیل شده‌اند که حدود ۵۰ درصد از این اسیدهای آمینه آبگریز هستند و دارای جرم مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون هستند (Zamora-Sillero *et al.*, 2018). مکانیسم دقیقی که فعالیت ضدباکتریایی پروتئین‌های هیدرولیز شده را به‌طور کامل توضیح دهد مشخص نشده است. در این راستا بیان شده است که پپتیدها ممکن است متابولیسم سلولی باکتری را مختل کنند و در نهایت منجر به مرگ باکتری شوند (Ruthu *et al.*, 2014; Mirzapour-Kouhdasht *et al.*, 2021). بر اساس یافته‌های Akbarbaglu و همکاران (۲۰۲۲)، فعالیت ضد میکروبی پپتیدها و هیدرولیزه‌ها به حضور اسیدهای آمینه آبگریز خاص یعنی هیستیدین، آرژنین، پرولین و گلیسین نسبت داده شد است. همچنین اثرات باکتریواستاتیک پپتیدهای با بار مثبت و اسیدهای آمینه آبگریز به توانایی آنها در نفوذ و واکنش با غشای سلولی باکتری نسبت داده می‌شود. بطورکلی بر اساس نتایج بدست آمده میتوان اذعان کرد که پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از سیانوباکتری آنابنا دارای

پتانسیل کاربرد بعنوان مکمل تغذیه‌ای و یا افزودنی در صنایع غذایی می‌باشد.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر *آنابنای* کشت داده شده با بیشترین محتوای پروتئین برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده شد. پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از نظر پروفایل اسید آمینه دارای محتوای مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری بود. این نمونه خواص ضداکسیدانی مناسبی در برابر رایکال‌های آزاد DPPH، ABTS و شلاته کنندگی یونه‌ای فروزین در مقایسه با BHA از خود نشان داد. علاوه بر این خواص ضدباکتریایی مناسبی در برابر تعدادی از عوامل بیماریزای غذایی مشاهده شد. بر اساس نتایج بدست آمده می‌توان اذعان کرد که پروتئین هیدرولیز شده بدست آمده از سیانوباکتری *آنابنا* دارای پتانسیل کاربرد بعنوان مکمل تغذیه‌ای و یا افزودنی در صنایع غذایی می‌باشد.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال کمال تشکر را دارند.

منابع

Abd El-Aty, A.M., Mohamed, A.A. & Samhan, F.A. (2014). In vitro antioxidant and antibacterial activities of two fresh water Cyanobacterial species, Oscillatoria agardhii and *Anabaena sphaerica*. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, *4*(7), 069-075. http://dx.doi.org/10.7324/JAPS.2014.40712

Akbarbaglu, Z., Ayaseh, A., Ghanbarzadeh, B. & Sarabandi, K. (2022). Techno-functional, biological and structural properties of Spirulina platensis peptides from different proteases. Algal Research, 66, 102755. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102755

do Amaral, S.C., Santos, A.V., da Cruz Schneider, M.P., da Silva, J.K.R. & Xavier, L.P. (2020). Determination of volatile organic compounds and antibacterial activity of the amazonian cyanobacterium Synechococcus sp. strain GFB01. Molecules, 25(20), 4744. https://doi.org/10.3390/molecules25204744

Baharuddin, N.A., Halim, N.R.A. & Sarbon, N.M. (2015). Effect of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity of eel (*Monopterus* sp.) protein hydrolysate.

Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S. & Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76(5), 965-977. https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019

Bilanovic, D., Andargatchew, A., Kroeger, T. & Shelef, G. (2009). Freshwater and marine microalgae sequestering of CO2 at different C and N concentrations–response surface methodology analysis. Energy Conversion and Management, 50(2), 262-267. https://doi.org/10.1016/j.enconman.2008.09.024

Chai, H.J., Chan, Y.L., Li, T.L., Chen, Y.C., Wu, C.H., Shiau, C.Y. & Wu, C.J. (2012). Composition characterization of Myctophids (*Benthosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates. Food Research International, 46(1), 118-126. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.008

Costa, M.M., Spínola, M.P. & Prates, J.A. (2023). Combination of Mechanical/Physical Pretreatments with Trypsin or Pancreatin on Arthrospira platensis Protein Degradation. Agriculture, 13(1), 198. https://doi.org/10.3390/agriculture13010198

Doraj, M., Emtyazjoo, M., Sadeghi, M.S., Soltani, N. & Hargelani, F.Z. (2023). Protein hydrolysate from Anabaena sp. cultured in an optimized condition designed by RSM; insight into bioactive attributes. Algal Research, 70, 103026. https://doi.org/10.1016/j.algal.2023.103026

Fadl, S.E., Elsadany, A.Y., El-Shenawy, A.M., Sakr, O.A., El Gammal, G.A., Gad, D.M., Norag, M.A.A. & Eissa, I. (2020). Efficacy of cyanobacterium Anabaena sp. as a feed supplement on productive performance and immune status in cultured Nile tilapia. Aquaculture Reports, 17, 100406. https://doi.org/10.1016/j.aqrep.2020.100406

Garcia-Moscoso, J.L., Teymouri, A. & Kumar, S. (2015). Kinetics of peptides and arginine production from microalgae (*Scenedesmus* sp.) by flash hydrolysis. Industrial & Engineering Chemistry Research, 54(7), 2048-2058. https://doi.org/10.1021/ie5047279

Guillén, G., López Caballero, M.E., Alemán, A., Lacey, A.L.D., Giménez, B. &

Montero García, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin.

Heffernan, S., Giblin, L. & O'Brien, N. (2021). Assessment of the biological activity of fish muscle protein hydrolysates using in vitro model systems. Food chemistry, 359, 129852. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.129852

Johnson, E.M., Kumar, K. & Das, D. (2014). Physicochemical parameters optimization, and purification of phycobiliproteins from the isolated Nostoc sp. Bioresource technology, 166, 541-547. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.097

Kini, S., Divyashree, M., Mani, M.K. & Mamatha, B.S. (2020). Algae and cyanobacteria as a source of novel bioactive compounds for biomedical applications. In Advances in cyanobacterial biology, 173-194. Academic Press. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819311-2.00012-7

Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F. & Hayes, K.D. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). Journal of food science, 74(2), C126-C133. https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01047.x

Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M. & Bougatef, A. (2013). Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. Journal of Aquatic Food Product Technology, 22(5), 436-448. https://doi.org/10.1080/10498850.2012.658961

Latorres, J.M., Rios, D.G., Saggiomo, G., Wasielesky, W. & Prentice-Hernandez, C. (2018). Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Journal of Food Science and Technology, 55, 721-729. https://doi.org/10.1007/s13197-017-2983-z

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951). Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent.

Bennett, G. (1992). Lowry's handbook of right-to-know emergency planning. Journal of Hazardous Materials, 30(3), 361-362. https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4

Mahakhant, A., Khanthasopa, S., Jaisai, N. & Wongsing, N. (2011). Screening of biological activities from Nostoc spp.(Cyanophyta). In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants, 1023, 271-277. https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2014.1023.39

Mendiola León, J.A., Rodríguez Meizoso, I., Señorans, F.J., Reglero, G., Cifuentes, A. & Ibáñez, E. (2008). Antioxidants in plant foods and microalgae extracted using compressed fluids. Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry.

Mirzapour-Kouhdasht, A., Moosavi-Nasab, M., Kim, Y.M. & Eun, J.B. (2021). Antioxidant mechanism, antibacterial activity, and functional characterization of peptide fractions obtained from barred mackerel gelatin with a focus on application in carbonated beverages. Food Chemistry, 342, 128339. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128339

Moreno, J., Vargas, M.Á., Rodrıguez, H., Rivas, J. & Guerrero, M.G. (2003). Outdoor cultivation of a nitrogen-fixing marine cyanobacterium, Anabaena sp. ATCC 33047. Biomolecular engineering, 20(4-6), 191-197. https://doi.org/10.1016/S1389-0344(03)00051-0

Morris, H.J., Almarales, A., Carrillo, O. & Bermúdez, R.C. (2008). Utilization of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. Bioresource technology, 99(16), 7723-7729. https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.01.080

Mousaie, M., Khodadadi, M. & Tadayoni, M. (2022). Hydrolysate protein from brown macroalgae (*Sargassum ilicifolium*): Antioxidant, antitumor, antibacterial, and ACE inhibitory activities. Journal of Food Processing and Preservation, 46(11), e17020. https://doi.org/10.1111/jfpp.17020

Naghdi, S., Lorenzo, J.M., Mirnejad, R., Ahmadvand, M. & Moosazadeh Moghaddam, M. (2023). Bioactivity evaluation of peptide fractions from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*) using alcalase and hydrolytic enzymes extracted from *Oncorhynchus mykiss* and their potential to develop the edible coats. Food and Bioprocess Technology, 16(5), 1128-1148. https://doi.org/10.1007/s11947-022-02986-y

Naghdi, S., Rezaei, M., Tabarsa, M. & Abdollahi, M., (2023). Fish Protein

protein hydrolysates and peptide fractions derived from Colossoma macropomum and their effect on ground beef lipid oxidation. Journal of Aquatic Food Product Technology, 28(6), 677-688. https://doi.org/10.1080/10498850.2019.1628152

Ranathunga, S., Rajapakse, N. & Kim, S.K. (2006). Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). European Food Research and Technology, 222, 310-315. https://doi.org/10.1007/s00217-005-0079-x

Ruthu, Murthy, P.S., Rai, A.K. & Bhaskar, N., 2014. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. Journal of food science and technology, 51, 1884-1892. https://doi.org/10.1007/s13197-012-0730-z

Sadeghi, S., Jalili, H., Ranaei Siadat, S.O. & Sedighi, M. (2018). Anticancer and antibacterial properties in peptide fractions from hydrolyzed spirulina protein. Journal of Agricultural Science and Technology, 20(4), 673-683. http://dorl.net/dor/20.1001.1.16807073.2018.20.4.4.2

Safari, M., Ahmady-Asbchin, S. & Zamanifar, P. (2019). In vitro evaluation of antimicrobial activities from aqueous and methanolic extracts of cyanobacteria. European Journal of Biological Research, 9(3), 184-192. http://dx.doi.org/10.5281/zenodo.3463632

Samarakoon, K.W., O-Nam, K., Ko, J.Y., Lee, J.H., Kang, M.C., Kim, D., Lee, J.B., Lee, J.S. & Jeon, Y.J. (2013). Purification and identification of novel angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from cultured marine microalgae (*Nannochloropsis oculata*) protein hydrolysate. Journal of Applied Phycology, 25, 1595-1606. https://doi.org/10.1007/s10811-013-9994-6

Senadheera, T.R., Dave, D. & Shahidi, F. (2021). Antioxidant potential and physicochemical properties of protein hydrolysates from body parts of North Atlantic sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). Food Production, Processing and Nutrition, 3(1), 1-22. https://doi.org/10.1186/s43014-020-00049-3

Song, W., Kong, X., Hua, Y., Li, X., Zhang, C. & Chen, Y. (2020). Antioxidant and antibacterial activity and in vitro digestion Hydrolysate from Sulfated Polysaccharides Extraction Residue of Tuna Processing By-Products with Bioactive and Functional Properties. Global Challenges, 7(4), 2200214. https://doi.org/10.1002/gch2.202200214

Naghdi, S., Rezaei, M., Tabarsa, M. & Abdollahi, M. (2023). Parallel Extraction of Sulfated polysaccharides and Protein Hydrolysate from Skipjack Tuna Head and Their Bioactive and Functional Properties. Food and Bioprocess Technology, 1-22. https://doi.org/10.1007/s11947-022-02988-w

Nikoo, M., Benjakul, S., Yasemi, M., Gavlighi, H.A. & Xu, X. (2019). Hydrolysates from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing by-product with different pretreatments: Antioxidant activity and their effect on lipid and protein oxidation of raw fish emulsion. Lwt, 108, 120-128. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.03.049

Noman, A., Ali, A.H., Wedad, Q.B. & Wenshui, X. (2020). Effect of enzyme type on the properties of Chinese sturgeon (Acipenser sinensis) protein hydrolysates produced by enzymatic hydrolysis process. American Journal of Food Science and Nutrition Research, 6(1), 10-16. http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2018.01.009

Paliwal, C., Rehmanji, M., Shaikh, K.M., Zafar, S.U. & Jutur, P.P. (2022). Green extraction processing of lutein from *Chlorella saccharophila* in water-based ionic liquids as a sustainable innovation in algal biorefineries. Algal Research, 66, 102809. https://doi.org/10.1016/j.algal.2022.102809

Park, S.Y., Ahn, C.B. & Je, J.Y. (2014). Antioxidant and anti-inflammatory activities of protein hydrolysates from *Mytilus edulis* and ultrafiltration membrane fractions. Journal of Food Biochemistry, 38(5), 460-468. https://doi.org/10.1111/jfbc.12070

Pezeshk, S., Ojagh, S.M., Rezaei, M. & Shabanpour, B. (2019). Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: investigation of antibacterial and antioxidant activities. Probiotics and antimicrobial proteins, 11, 1015-1022. https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y

De Quadros, C.D.C., Lima, K.O., Bueno, C.H.L., Fogaça, F.H.D.S., Da Rocha, M. & Prentice, C. (2019). Evaluation of the antioxidant and antimicrobial activity of

stability of cottonseed protein hydrolysates. Lwt, 118, 108724. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108724

Tkaczewska, J. (2020). Peptides and protein hydrolysates as food preservatives and bioactive components of edible films and coatings-A review. Trends in Food Science & Technology, 106, 298-311. https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.022

Wahyuningtyas, W.S., Santoso, U., Wagiman, F.X. & Ningrum, A. (2023). Functional properties of Oryctes rhinoceros larvae protein hydrolysates affected by different enzyme concentration and hydrolysis time. Journal of Insects as Food and Feed, 9(3), 339-351. https://doi.org/10.3920/JIFF2021.0146

Zamora-Sillero, J., Gharsallaoui, A. & Prentice, C. (2018). Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. Marine Biotechnology, 20, 118-130. https://doi.org/10.1007/s10126-018-9799-3

Investigating the Amino Acid Profile of the Hydrolyzed Protein Obtained from *Anabaena* sp. and its Antioxidant and Antibacterial Properties

M. Doraj[a], M. S. Sadeghi[b*], M. Emtyazjoo[c], N. Soltani[d], F. Zamani Hargelani[e]

[a] PhD Student of the Department of Marine Science and Technology, Faculty of Marine Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[b] Assistant Professor of the Department of Marine Science and Technology, Faculty of Marine Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[c] Professor of the Department of Marine Science and Technology, Faculty of Marine Biology, North Tehran Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

[d] Professor of the Department of Basic and Applied Sciences, Research institute of Applied Science; ACECR, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.

[e] Assistant Professor of the Faculty of Natural Resources and Environment, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received: 5 February 2024 Accepted: 27 September 2024

Abstract

Introduction Introduction: Nowadays, cyanobacteria, a group of microscopic algae, have gained attention as a protein source for the production of hydrolyzed protein. Therefore, this study aimed to produce hydrolyzed protein from Anabaena and to evaluate its antioxidant and antibacterial properties.
Materials and Methods: The protein extracted from *Anabaena* was hydrolyzed using alkaline enzymes at a temperature of 55 degrees Celsius and a pH of 8 for a duration of 8 hours. The amino acid profile of the hydrolyzed protein was analyzed using RP-HPLC system. The antioxidant properties of the obtained samples were assessed through DPPH and ABTS radical scavenging methods, as well as metal ion chelation. Furthermore, the antibacterial properties of the produced hydrolyzed protein were evaluated against several pathogenic bacteria.
Results: The amino acid profile of the obtained hydrolyzed protein showed that the sample contained 2.75%, 5.43%, 4.19%, 5.65%, 5.67%, 5.63%, 6.63%, and 5.42% histidine, threonine, methionine, valine, phenylalanine, isoleucine, leucine, and lysine, respectively, which were higher than the daily amino acid requirements for both children and adults, and it also contained suitable levels of essential amino acids. The highest radical scavenging percentages against DPPH and ABTS free radicals were 88.22% and 68.90%, respectively. The highest chelation activity of the obtained sample was observed at 62.69% at a concentration of 2 mg/mL. Additionally, the results indicated that the highest antibacterial properties of the sample were observed against Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Escherichia coli, and Salmonella Typhimurium, with inhibition zone diameters of 6.02 mm, 5.90 mm, 6.30 mm, and 3.80 mm, respectively, at a concentration of 100 mg/mL ($P < 0.05$).
Conclusion: Based on the obtained results, it was determined that the protein extracted from Anabaena has the potential to be used for producing hydrolyzed protein with antioxidant and antibacterial properties, indicating its potential applications in the food and pharmaceutical industries.

Keywords: *Anabaena, Alcalase, Antioxidant Properties, Antibacterial Properties, Hydrolyzed Protein.*

* Corresponding Author: mahnaz.sadeghi55@gmail.com