(مقاله پژوهشی)

ارزیابی‌خواص‌آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی‌پپتیدهای‌تخلیص‌شده از هیدرولیز آنزیمی‌دانه‌انگور

مهناز صمدی وارده سرا[۱]، پیمان آریایی[۲*]، جواد حصاری[۳]

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

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

۳-گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۲۱ تاریخ پذیرش:۱۳۹۹/۱۰/۲۱

چکیده

در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه انگور با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز میکروبی تعیین شد. پروتئین هیدرولیز در سه زمان مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، با استفاده از آنزیم‌های تجاری آلکالاز و فلاورزایم در pH های ۸/۵ و ۷ (pH بهینه فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم) به نسبت ۱ درصد آنزیم به پروتئین نمونه اولیه، در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم آلکالاز و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم فلاورزایم تولید شد. نتایج نشان که با افزایش زمان هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). همچنین مقادیر پارامترهای مذکورتوسط‌آنزیم‌آلکالاز به طورمعنی‌داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود ($p<۰/۰۵$). بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (خنثی‌سازی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی فریک و خنثی‌سازی رادیکال آزاد ABTS) و خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) در پروتئین هیدرولیز شده تولیدی توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد. با توجه به بهتر بودن این تیمار (آنزیم آلکالاز و زمان ۳۰ دقیقه) پروفایل اسید آمینه‌ای آن تعیین شد، بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری، والین ۷/۹۸ درصد و پس از آن اسید آمینه لوسین ۷/۱۱ درصد و بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری گلوتامیک اسید ۱۹/۵۵ درصد و پس از آن اسید آمینه گلایسین ۱۲/۵۵ درصد بوده است. در مجموع به‌نظر می‌رسد که پروتئین هیدرولیز شده دانه انگور دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی بالاست، که می‌تواند به عنوان مکمل‌های پروتئینی در مواد غذایی و در فرمول‌های رژیم غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، آنزیم‌های تجاری، پروفایل اسید آمینه، رادیکال آزاد DPPH، سرطان کولون.

* مسئول مکاتبات: p.aryaye@yahoo.com

۱- مقدمه

پپتیدهای زیست فعال بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و دارای ۲۰-۲ آمینواسید می‌باشند این پپتیدها درساختار پروتئینی اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند. از جمله این تأثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدفشار خون و ضدسرطان اشاره نمود (۲۴). این پپتیدها به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می‌شوند (۲۰)، در این میان هیدرولیز آنزیمی از روش‌های جدید در بیوتکنولوژی غذایی می‌باشد که فرآیندی قابل کنترل و ملایم است و منجر به نابودی آمینواسیدهای آزاد نمی‌شود (۱۳). هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها یکی از روش های بهبود خصوصیات پروتئین‌هاست. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولید شده تعیین می‌شود و این موارد بستگی به ویژگی پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز به‌ویژه دما و pH دارد. فرآیند هیدرولیز آنزیمی می‌تواند با استفاده از آنزیم‌ها با منشا داخلی (فرآیند اتولیز) و نیز آنزیم‌های تجاری انجام شود. فرآیند کاربرد آنزیم‌های تجاری به جای فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است. زیرا کل فرآیند هیدرولیزاسیون کاملا تحت کنترل است، در نتیجه محصول و فرآورده‌های با خواص مشخص تولید می‌شود. یکی از فاکتورهای تعیین کننده و مهم در هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های تجاری، انتخاب آنزیم پروتئاز می‌باشد. آنزیم‌های که برای هیدرولیز پروتئین‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند، حداقل باید دارای یک ویژگی مشترک باشند، آن‌ها باید از ارزش غذایی برخوردار باشند و اگر منشأ میکروبی دارند، ارگانیزم تولیدکننده آن‌ها باید غیر بیماری‌زا باشد (۲). آنزیم‌های‌مختلف‌مانند آلکالاز (دارای فعالیت اندوپروتئازی در شرایط قلیایی)، بروملین (اندوپپتیداز سیستئین با ویژگی‌های متعدد)، فلاورزایم (مخلوطی از اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز)، پروتامکس (پروتئاز باکتریایی دارای مخلوطی از اندو و اگزوپپتیداز) جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خصوصیات کاربردی و آنتی‌اکسیدانی به کار می‌روند (۲۹). مهم‌ترین آنزیم‌هایی که طی تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است شامل آنزیم آلکالاز و فلاورزایم می باشد (۲۸). در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص‌آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری مانند شیر، لوبیای سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده‌ی تخم مرغ، جاندار دریایی blood clams، صدف‌خوراکی و ضایعات ماهی و میگو تولید شده‌اند (۱۰). در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیزشده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱۷). در این میان دانه انگور (*Vitis vinifera*)که از فرآورده‌های جانبی کارخانه‌های‌آب‌میوه‌می‌باشد. دارای ترکیبی از چربی، پروتئین، کربوهیدرات و ۵ الی ۸ درصد پلی‌فنول است و مقادیر آن بسته به گونه و جنس انگور متفاوت است (۱۸). میزان پروتئین در۱۰۰گرم پودر دانه انگور ۱۴درصد می‌باشد (۱۶). پلی‌فنول‌های موجود در دانه انگور شامل فلاونوئیدها، اسید گالیک، مونومریک فلاوان-۳کاتچین، اپی‌کاتچین۳-گالیت‌ودیمریک، مونومریک و پلی‌مریک پروآنتوسیانیدین می‌باشد(۳۱). مطالعات نشان می دهد که ترکیبات دانه انگور دارای پتانسیل بسیار بالایی در از بین بردن رادیکال های آزاد، مهار استرس اکسیداتیو و ضد سرطانی بوده و در موارد انفارکتوس‌های قلبی و ایسکمی برقراری مجدد گردش خون بافتی، نقش مهاری آن در برابر استرس اکسیداتیو به اثبات رسیده است (۸). سازمان غذا و دارو آمریکا (FDA) دانه انگور را به عنوان افزودنی مواد غذایی تصویب و تایید کرده و به طور کلی به عنوان GRAS[1]به رسمیت شناخته است (۳۸). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین هیدرولیز شده و با توجه به اینکه در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده هسته انگور تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید

1-Generally Recognized As Safe

پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه انگور توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این پپتیدها می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

انگور مورد استفاده از خانواده ویتیس وینی‌فرا (*Vitis vinifera*) بوده است، گونه انگور ایرانی از بازار محلی شهرستان گیلان تهیه و به تأییدگروه کشت و توسعه انستیتو گیاهان دارویی تهران رسید. بعد از خریداری انگور قرمز، اقدام به جداسازی دانه‌ها از تفاله انگور قرمز به طور دستی شد. دانه‌ها پس از شستشو، در آون تحت خلأ با درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه خشک شد. دانه‌های خشک شده توسط خردکن کاملاً پودر شدند و تا شروع آزمایشات در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.آنزیم‌آلکالازوفلاورزایم‌ازشرکت‌نووازیم (دانمارک) تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. میزان فعالیت آنزیمی به‌صورت واحدآنسون‌به‌ازای‌هرکیلوگرم پروتئین به سوبسترا (Au/kg protein) ارائه شد.

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

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

به منظور از بین بردن ترکیبات پلی فنولی از دانه ها، دانه‌های انگور به مدت ۲ ساعت در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد در محلول ۴درصد NH4OH (v:w ۱:۴) خیسانده شد این کار ۳ مرتبه تکرار شد تا زمانی که محلول حاصل بی رنگ شد، سپس دانه‌ها چندین بار با آب شیر شسته شدند و سپس دانه‌ها در آفتاب خشک شدند. دانه‌های انگور به منظور استخراج پروتئین با استفاده از آسیاب خانگی پودر شدند. پودر دانه انگور فاقد چربی در محلول Nacl ۱ mol/ L (w:v ۱:۸) در دمای محیط برای ۳۰ دقیقه‌همزده شد و سپس pH آن روی ۵/۹ توسط NaOH ۱ mol/ L تنظیم شد. بعد از ۳۰ دقیقه همزدن، سوسپانسیون در ۸۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه‌دردمای۴درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (مدل Z36HK، هامبورگ، آلمان) شد. مایع رویی در pH=۴ با استفاده از Hcl ۱ mol/ L جهت رسوب‌پروتئین‌ها افزوده شد و مجددا در ۸۰۰rpm به مدت ۲۰دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. رسوبات چندین بار با آب مقطر شسته شدند و در آب‌مقطر حاوی NaOH ۰/۱ mol/ L تا pH ۷ افزوده شد. ذرات پراکنده با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Operon FDB-550، کره جنوبی) خشک شد (۳).

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

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایراضافه‌گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲دقیقه هموژنیزه شد. سپس 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 در دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم آلکالاز و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم فلاورزایم برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ rpm قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به‌آن‌اضافه شد و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه‌سانتریفوژ شد، مایع شناورجمع‌آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر (دمای ۲۰- درجه سانتی گراد) نگهداری شد و سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی به‌صورت پودر درآمد (۱۴).

۲-۳ -درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به‌کل‌پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی لیتر از نمونه با ۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و

زمان ۱۰دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۲۸).

فرمول ۱

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

۲-٤- میزان بازیافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت‌تعیین شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شد. شدت جذب نور در طول موج ۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل T80ساخت کشور انگلستان قرائت شد. میزان بازیافت پروتئینی از رابطه زیر محاسبه گردید (۳۰).

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

۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۵-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین‌منظور۱ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه شد و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد.تمامی‌این مراحل در مورد BHA[1] به‌عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد انجام گرفت (۹).

فرمول ۲

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

۲-۵-۲-اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن(FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougatef و همکاران (۹) 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.

۲-۵-۳- بررسی‌مهار رادیکال‌آزاد (ABTS)

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با روش Bougatefوهمکاران(۹) تعیین‌شد.محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی‌لیتر از ABTS ۷ میلی‌مولار و ۸۸ میکرومولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط درتاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول موجود با۴۰ میلی‌لیتر (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۷/۴، حاوی Nacl ۰/۲ مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS بتواند در۷۳۴ نانومتر عدد ۰/۰۲ ±۰/۷۰ به‌دست آید. ۶۵ میکرو مولار نمونه محلول با ۶۵ میکرو مولار بافر فسفات ترکیب، ۶۶/۶۷ میکرو مولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از ۱۰دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر قرائت شد

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه می شود

فرمول۳

۱۰۰×[(میزان جذب کنترل / میزان جذب نمونه)- ۱] =درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS

۲-٦- خصوصیات ضدسرطانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-٦-۱-کشت سلولی

سلول‌های SW742 (سلول های سرطان کولون) از انستیتو پاستورایران- تهران تهیه گردید، سپس در محیط DMEM[2] به همراه ۵ درصد سرم جنین‌گوساله (FCS[3]) پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر کشت گردید. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد و در رطوبت ۹۰ درصد و CO_2 ۵۶درصد قرار گرفت. سلول‌های‌نرمال (Mouse C34/An connective tissue) L929 در FCS ۱۰درصد قرار گرفت. بعد از ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت سلول‌ها در معرض پروتئین هیدرولیز شده قرار گرفت. زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT (۵، ۴، ۳ دی متیل تیازول ۲ یل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. به‌طور خلاصه سلول‌ها به تعداد ۵ هزار در پلیت ۹۶ خانه ای قرار گرفت و در زمان‌های ۲۴

1- Butylated hydroxyanisole

2-Dulbecco's Modified Eagle Medium
3-Fetal Calf Serom

ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن عصاره به سلول‌ها محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها در محلول MTT (۵میلی‌گرم / میلی لیتر در بافر فسفات سالین (PBS[1]) به مدت ۴ ساعت قرار گرفت و پس از محلول سازی فرمازان (تبدیل رنگ به بنفش ارغوانی) توسط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[2]جذب‌نوری‌در ۵۷۰نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (۱۹).

۲-۷-ترکیب اسید آمینه

پس از انجام آزمایش‌های فوق پروفایل اسیدآمینه بهترین پروتئین تیمار اندازگیری شد. پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ساعت‌در دمای ۱۱۰درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد(۲۸). سپس با استفاده از فنیل ایزوتیوسیانات (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای‌آمینه کل‌با استفاده از دستگاهHPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد.

۲-۸ -تجزیه و تحلیل آماری

کلیه‌آزمایش‌هادرطرح‌آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس(ANOVA) بااستفاده از نرم‌افزار(version 18 SPSS) صورت‌گرفت. برای بیان اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون‌دانکن‌درسطح ۰/۰۵استفاده شد و نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از مهم‌ترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده است که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیز می باشد (۳۵). با توجه به نتایج با افزایش زمان هیدرولیزاسیون (جدول ۱)، درجه هیدرولیز افزایش یافت ($P<0/05$) به طوریکه در ارتباط با آنزیم آلکالاز در زمان۱۰دقیقه برابر با ۱۱/۰۹٪ بود و در زمان ۳۰ دقیقه ۲۱/۵۱٪ بوده است و در ارتباط با آنزیم فلاورزایم در زمان ۱۰ دقیقه برابر با ۸/۳۸٪ بود و در زمان ۳۰ دقیقه ۱۵/۸۰٪ بوده است. دلیل این افزایش می‌تواند این باشد که در مدت زمان هیدرولیز بیشتر فعالیت آنزیمی بیشتری صورت گرفته و باندهای پپتیدی مدت زمان بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند و دچار شکست بیشتری می‌شوند که حاصل شکست بیشتر باندهای پپتیدی و در نتیجه درجه هیدرولیز بالاتر را در پی دارد (۴). همچنین درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است انتخاب آنزیم نقش بسیار مهمی در تولید پروتئین هیدرولیز شده دارد، زیرا هر آنزیم دارای الگوی متفاوتی در شکستن باندهای پپتیدی می‌باشد که ترکیب آمینو اسیدی، وزن ملکولی و فعالیت زیستی پپتیدهای تولید شده را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۲۳). آلکالاز به دلیل تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم، به طور مکرر توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۲۱، ۲۸). نتایج مشابهی توسط Sbroggio و همکاران (۲۰۱۶) بیان شد، آن‌ها به بررسی تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم شامل آلکالاز و فلاورزایم بر درجه هیدورلیزاسیون پروتئین هیدرولیزشده اوکارا[3] (محصول جانبی کم ارزش سویا) پرداختند، آن‌ها نیز اعلام نمودند، با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدورلیز افزایش و بالاترین مقادیر درجه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز مشاهده شد (۳۴).

1-Phosphate Buffered Saline
2-Dimethyl SulfoXid
3-kara

جدول ۱-مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم	آلکالاز	فلاورزایم
زمان هیدرولیزاسیون (دقیقه)		
۱۰	۱۱/۰۹±۰/۱٤^{Ac}	۸/۳۸±۰/۳۸^{Bc}
۲۰	۱۷/۵٤±۰/۵۱^{Ab}	۱۲/٦۵±۰/۵۸^{Bb}
۳۰	۲۱/۵۱±۰/۵۵^{Aa}	۱۵/۸۰±۱/۰٤^{Ba}

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

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

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

۳-۲- بررسی مقادیر بازیافت پروتئینی

بازیافت‌نیتروژنی‌یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیرمحلول و در نتیجه میزان بازدهی فرآیند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (جدول۲) که بازیافت پروتئینی توسط آلکالاز به طور معنی داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بوده است (P<۰/۰۵) به طوریکه در ارتباط با آنزیم‌آلکالاز در زمان ۱۰ دقیقه برابر با ۵۷/۴۳٪ بود و در زمان ۳۰ دقیقه ۸۰/۸۱٪ بوده است و در ارتباط با آنزیم فلاورزایم در زمان ۱۰ دقیقه برابر با ۴۰/۹۵٪ بود و در زمان ۳۰ دقیقه ۶۷/۳۹٪ بوده است. دلیل آنزیم آلکالاز یک آنزیم پروتئاز قلیایی Endoproteinase می‌باشد که دارای منشاء میکروبی بوده و به همین جهت، خواص مناسب پروتئازی را از خود نشان می‌دهد (۱). با افزایش زمان هیدرولیزمقادیر بازیافت پروتئینی به طور معنی داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). نتایج تحقیق حاکی از ارتباط و ضریب همبستگی بین بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز بود. این یافته حاکی از آن بود که افزایش درجه هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی نیز افزایش می یابد. مشخص شده است که همبستگی زیادی بین درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی وجود دارد (۳۱). نتایج مشابهی توسط Nematiو همکاران (۲۰۱۲) گزارش شده است، آن‌ها نیز گزارش نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر بازیافت پروتئین افزایش یافت و همچنین آنزیم آلکالاز آنزیم موثرتری نسبت به سایر آنزیم‌ها بود (۲۸).

جدول ۲- مقادیر بازیافت پروتئینی پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم	آلکالاز	فلاورزایم
زمان هیدرولیزاسیون (دقیقه)		
۱۰	۵۷/۴۳±۲/۱۳^{Ac}	٤۰/۹۵±۰/۷۱^{Bc}
۲۰	٦٤/٦٦±۰/۵۰^{Ab}	۵۳/۵۸±۰/۵٤^{Bb}
۳۰	۸۰/۸۱±۱/۲٤^{Aa}	٦۷/۳۹±۱/۲۲^{Ba}

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

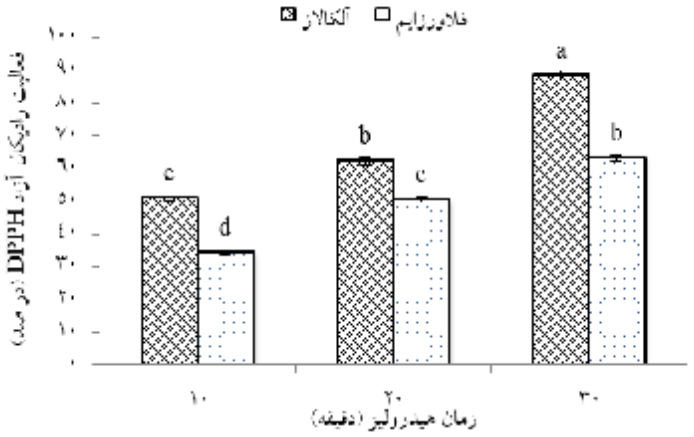
*اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

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

۳-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-۳-۱-فعالیت رادیکال آزاد DPPH

آزمون‌فعالیت‌رادیکال‌آزادDPPH معمولاً برای اندازه‌گیری توانایی مهار رادیکال آزاد یک نمونه استفاده می‌شود(۵). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل ۱) تمامی پروتئین‌های‌هیدرولیزشده‌توانایی‌بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPHدارابودند. مقادیر فعالیت رادیکال‌آزاد DPPH برای‌آنزیم‌آلکالاز در زمان‌های‌مختف مابین ۵۰/۹۶- ۸۸/۶۸ درصد بوده است و برای آنزیم فلاورزایم در زمان‌های مختف مابین ۳۴/۵۱- ۶۳/۲۸ درصد بوده است. پپتیدهای زیست فعال موجود درپروتئین‌های هیدرولیز شده فعالیت آنتی اکسیدانی خود را از طریق مکانیسم‌های مختلف همچون مهار پرواکسیداسیون لیپید، مهار رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن یون‌های فلزی اعمال میکنند (۱۱). دارا بودن توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی نظیر بذر هویج (۴۰)، جوانه گندم(۳)، گزروغنی (*Moringa oleifera*)(۵)، دانه کینوآ (۲۷)وگیاه‌آشلانتوس (*Amaranthus cruentus*) (۳۳) نیز گزارش شد.

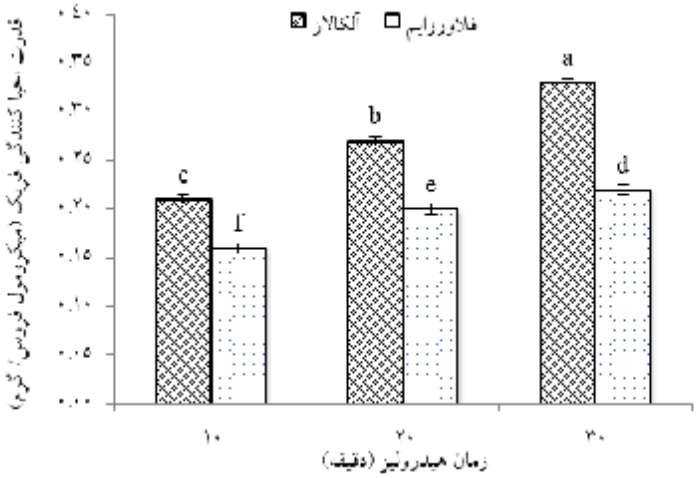


شکل۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

اعتقاد بر این است که نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای مؤثر بر فعالیت‌های بیولوژیکی به شمار می روند (۲۱) و نتایج این تحقیق نشان داد که شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز پروتئین‌هسته‌انگورتأثیرگذارمی‌باشدو فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود (P<۰/۰۵). به‌طوری‌که فعالیت آنتی اکسیدانی برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در زمان ۳۰دقیقه به ترتیب برابر با ۸۸/۶۸ و ۶۳/۲۸ درصد بوده است. به منظور تولید پپتیدهای ضداکسایش در جریان هیدرولیزپروتئین‌ها،آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره پروتئینی باشد که در این مطالعه آلکالاز توانست پیوندهای پپتیدی بهتری ایجاد نماید (۱۲). این نتایج با نتایج Ovissipour و همکاران (۲۰۱۳) هم خوانی دارد، آن‌ها نیز اعلام کردند پورتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به فلاورزایم‌دارامی‌باشد (۳۰).همچنین با نتایج Mahdavi-Yekta وهمکاران، (۲۰۱۹) هم‌خوانی دارد، آن‌ها نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز (تا ۱۵۰ دقیقه) مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کینوآ افزایش‌یافت (۲۷). متغیرهای‌مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت‌آنزیم‌داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای‌نهایی‌مؤثرند.بنابراین‌ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آن‌ها ارائه میدهد.

۳-۳-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

روش سنجش قدرت احیاء آهن پتانسیل اهدای الکترون یک ترکیب آنتی اکسیدانی مانند پپتیدها را ارزیابی می کند که در نتیجه Fe^{3+} به یون Fe^{2+} کاهش می‌یابد (۵). نتایج مربوط به مطالعه‌حاضرنشان‌داد (شکل۲) تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده توانایی بالایی برای قدرت احیای آهن دارا بودند مقادیر قدرت‌احیاءآهن برای‌آنزیم‌آلکالازدرزمان‌های مختلف مابین۰/۲۱- ۰/۳۳ میکرومول فروس/ گرم بوده است و برای‌آنزیم فلاورزایم در زمان‌های مختلف مابین ۰/۱۶- ۰/۲۲ میکرومول فروس/ گرم بوده است. پروتئین هیدرولیز شده دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشد رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می‌گردد، هرچه رنگ سبز قوی‌تر باشد و میزان جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر بالاتر باشد، نشان دهنده فعالیت کاهندگی بالاتر است (۵). دارا بودن توانایی قدرت احیای آهن در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی‌نظیربذرهویج(۴۰)،گزروغنی (*Moringa oleifera*)(۵) وگیاه‌آشلانتوس(*Amaranthus cruentus*) (۳۳) نیز گزارش‌شد. قدرت احیاءکنندگی یون‌آهن پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر قدرت احیا کنندگی یون آهن به طور معنی‌داری افزایش یافت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده توسط‌آنزیم آلکالاز با زمان ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌رادارابود (P<۰/۰۵) (۰/۳۳ میکرومول فروس/گرم). تفاوت‌قدرت‌احیاکنندگی‌آهن‌بین‌پروتئین‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم‌های مختلف را می توان به دلیل حضور پپتیدهای خاص با توالی آمینواسیدی خاص و وزن مولکولی معین دانست . برای مثال گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با وزن مولکولی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون قوی‌تر از پپتیدها با وزن مولکولی بالاتر از وزن مولکولی ۱۵۰۰ و پپتیدهای پایین تر از ۵۰۰ دالتون می‌باشد (۳۸). همچنین‌گزارش شده است که حضور اسیدهای آمینه هیدروفوب(آروماتیک یاشاخه‌دار) در توالی پپتید و حضور یکی یا تعداد بیشتری از باقی مانده‌های هیستیدین، پرولین، سیستئین، تیروزین، تریپتوفان، فنیل آلانین یا متیونین احتمالا فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (۳). با افزایش زمان هیدرولیز وکاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد برطبق گزارش Lahart و همکاران (۲۰۱۱) در مورد هیدرولیز کازئین،باپیشرفت‌هیدرولیز،وزن مولکولی‌هیدرولیزشده های حاصل کاهش یافت و هیدرولیزشده‌هایی با وزن مولکولی کمتر فعالیت ضداکسایش قویتری بروز دادند (۲۵).

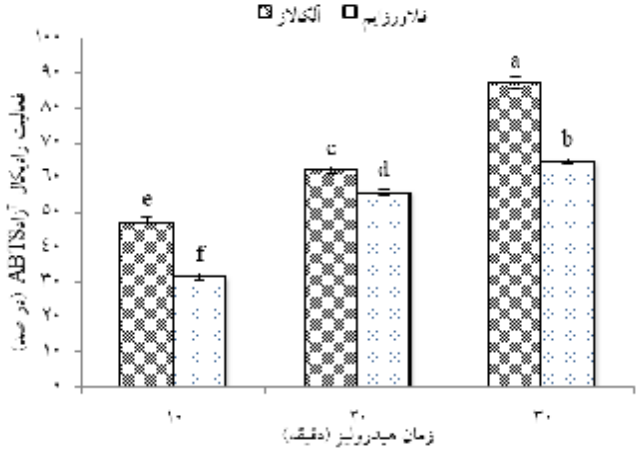


شکل ۲- مقادیر قدرت احیا کنندگی آهن

۳-۳-۳-فعالیت رادیکال آزاد ABTS

یکی دیگر از روش های سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، ارزیابی قدرت مهار رادیکال ABTS است که این روش بر اساس جذب رادیکال نسبتا پایدار سبزآبی ABTS و تبدیل آن به یک محصول بی رنگ می‌باشد (۴۰). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل۳) تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده توانایی‌بالایی‌برای‌حذف رادیکال آزاد ABTS دارا بودند. مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTSبرای‌آنزیم‌آلکالازدرزمان‌های‌مختف مابین ۴۷/۴۷-۸۷/۵۵ درصد بوده است و برای آنزیم فلاورزایم‌در زمان‌های مختف مابین ۳۱/۶۶-۶۴/۸۰ درصد بوده است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به‌طور معنی داری بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود ($P<0/05$). به‌طورکلی،همه‌پروتئین‌های‌هیدرولیزشده حاوی پپتیدها هستند که اهدا کننده هیدروژن بوده و می‌توانند با رادیکال‌ها برای تبدیل محصولات غیرقابل پیش‌بینی واکنش نشان دهند، بنابراین واکنش زنجیره رادیکال آزاد را خاتمه می‌دهند (۳۰). دارا بودن توانایی حذف رادیکال آزاد ABTS در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی نظیربذرهویج(۴۰)، جوانه‌گندم (۳)، گز روغنی (*Moringa oleifera*)(۵)وگیاه‌آشلانتوس(*Amaranthus cruentus*) (۳۳) نیز گزارش شده است.

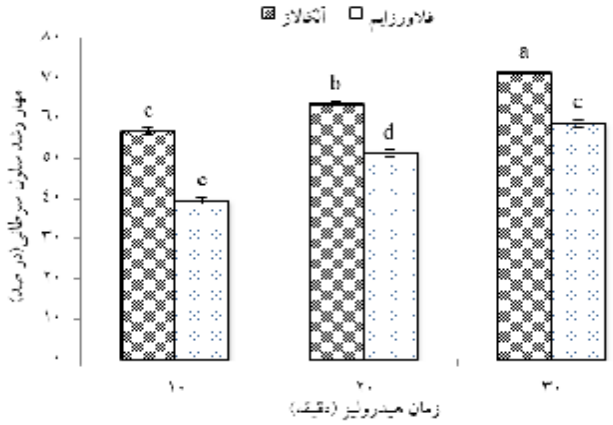


شکل۳- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS

با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS افزایش یافت. به طوری‌که پروتئین هیدرولیزشده توسط‌آنزیم آلکالاز با زمان۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌را دارا بود (۸۷/۵۵ درصد) تخریب ساختمان طبیعی پروتئین‌ها توسط آنزیم منجر به معرض‌گیری گونه‌های فعال آمینواسیدی با قابلیت ضد اکسایشی میگردد که بسته به نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، شرایط محیطی و پیش تیمارهای اعمال شده بر ماده اولیه متفاوت خواهد بود (۳۶). احتمالاً هیدرولیز شده‌های تولید شده آنزیم آلکالاز با زمان ۳۰ دقیقه حاوی آمینواسیدهای خاص و ترکیبات الکترون دهنده‌ای با قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد بوده‌اند. به علاوه ممکن است میزان تولید آمینواسید سیستئین که دارای خاصیت پرو اکسیدانی است، تحت این شرایط کمتر بوده باشد (۳۷). گزارش شده است که افزایش غلظت پروتئین‌های هیدرولیز شده میتواند اثر ضد اکسایشی را به یک حد بیشینه برساند و پس از افزایش غلظت مزبور، اثر ضداکسایشی به پرو اکسیدانی تبدیل گردد (۳۶).

۳-٤- فعالیت ضد سرطانی

سرطان یکی از علل عمده مرگ و میر در سراسر جهان است و رخدادهای سرطان به سرعت، سال به سال در حال افزایش است. از آنجا که گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) در توسعه سرطان نقش دارند، ترکیبات با خاصیت کاهش فعالیت ROS بالا به احتمال زیاد قادر به جلوگیری از بروز سرطان هستند (۶). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد (شکل ۴) تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای خاصیت ضد سرطانی بودند. مقادیر خاصیت ضد سرطانی برای آنزیم آلکالاز در زمان‌های مختف مابین ۷۱/۴۵- ۵۶/۸۸ درصد بوده است و برای آنزیم فلاورزایم در زمان‌های مختف مابین ۳۹/۵۸- ۵۸/۸۴ درصد بوده است. دارا بودن خاصیت ضد سرطانی در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی‌نظیرپروتین‌ذرت(۲۶)وگیاه‌آشلانتوس (*Amaranthus cruentus*)(۳۳) نیزگزارش شده است.



شکل٤- مقادیر فعالیت ضد سرطانی علیه سلول های سرطان کولون

با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر فعالیت ضد سرطانی نیز به طورمعنی‌داری افزایش‌یافت ($P<0/05$). به‌طوری‌که پروتئین هیدرولیزشده توسط‌آنزیم‌آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۷۱/۴۵درصد) ($P<0/05$).گزارش‌شده‌است که آلکالاز می تواند پیوندهای پپتیدی را در قسمت داخلی زنجیره پلی پپتید به عنوان یک آندوپپتیداز برش دهد و برخی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی با اندازه کوچک و متوسط تولید کند (۴۱). Kim (۲۰۱۱) گزارش داد که بخش‌های پپتید با وزن مولکولی کمتری دارای تحرک بیشتر وزن مولکولی و تعامل بیشتر با اجزای

موجود در سلول سرطانی هستند که نتیجه آن فعالیت ضدسرطان بیشتری است (۲۲). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد مابین فعالیت آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی ارتباط مستقیم وجود دارد. دارا بودن ارتباط بین فعالیت آنتی اکسیدان و ضد سرطانی قبلاً نیز گزارش شده است (۱۹، ۳۳).

۳-۵- ترکیب اسید آمینه

نتایج مربوط به مقادیر اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز (جدول ۳) نشان داد، بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه غیر ضروری والین ۷/۹۸ درصد و پس از آن اسیدآمینه لوسین ۷/۱۱ درصد بوده است، بالاترین مقادیر اسید آمینه در مطالعه حاضر اسید آمینه ضروری گلوتامیک اسید ۱۹/۵۵ درصد و پس از آن اسیدآمینه گلایسین ۱۲/۵۵ درصد بوده است .Ding و همکاران (۲۰۱۵)، بالاترین‌مقادیراسیدآمینه ضروری پروتئین هیدرولیزشده هسته انگور را تروئنین، والین و لوسین واسید آمینه‌غیرضروری گلوتامیک اسید، پرولین و گلایسین اعلام نمودند (۱۴). اسیدهای آمینه، رادیکال های آزاد را با اهدای پروتون خنثی می‌کنند، رادیکال‌های آزاد محلول در چربی (رادیکال‌های پراکسیل)که در سراسر اکسیداسیون اسیدهای چرب‌اشباع نشده‌تولیدمی‌شوند.توسط‌اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین، والین، آلانین و پرولین خنثی می‌شوند (۳۲). بنابراین، می توان ادعا کرد که پروتئین‌های هیدرولیز شده به دلیل‌وجود اسیدهای‌آمینه مختلف ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند. با توجه به FAO/WHO (۱۹۹۰) نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید امینه ها نباید کمتر از ۴۰ درصد باشد و همچنین میزان اسیدآمینه ضروری به غیرضروری نبایدکمتر از ۰/۶ باشد (۱۵). با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیزشده از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری برابر با ۱/۷۴ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه موجود برابر با ۶۳/۶۲ است.

جدول ۳-ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز
هیستدین[1]	٤/٢٥
ایزو لوسین[1]	٢/٩٨
لوسین[1]	٧/١١
لایزین[1]	٢/١٦
متیونین[1]	١/٠٥
فنیل آلانین[1]	٢/٤٥
تروئنین[1]	٦/٩٨
والین[1]	٧/٩٨
آسپارتیک اسید	١٠/٢٥
آرژنین	٥/٩٨
پرولین	٢/٩٨
سرین	٣/٩٥
آلانین	١/٩٥
سیستئین	١/٠٩
گلوتامیک اسید	١٩/٥٥
تیروزین	٤/٥٩
گلایسین	١٢/٥٥
نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه	٦٣/٦٢
نسبت اسید امینه ضروری به اسید امینه غیرضروری	١/٧٤
میزان اسید امینه کل	٩٨/٨٥

[1]اسیدآمینه ضروری

٤- نتیجه گیری

پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی از منابع گیاهی دارای خواص سلامت بخشی از قبیل اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطانی و ضدمیکروبی را نشان داده‌اند. در این پژوهش اثر خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه انگور ابتدا تعیین شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدسرطانی بالاتری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت. در مجموع به نظر می‌رسد پروتئین هیدرولیز شده دانه انگور توسط آنزیم آلکالاز و زمان ۳۰ دقیقه می‌تواند به عنوان منبع خوبی از پپتیدها و اسیدهای آمینه با کیفیت در سیستم های غذایی به عنوان یک افزودنی طبیعی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی استفاده شود.

٥- منابع

١. اویسی‌پور، م.، عابدیان کناری، ع. م.، معتمد زادگان، ع. و نظری، ر. م. ١٣٨٩. بررسی خواص‌پروتئین‌های‌هیدرولیزشده امعاء و احشاء ماهی‌تون‌زردباله(albacares Thunnus) بااستفاده از آنزیم‌های تجاری. نشریه‌پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی‌ایران، دوره٦، شماره١، ٧٦-٦٨.

٢. اویسی‌پور، م.، قمی، م. ر. ١٣٨٧. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.

٣. کرمی،ز.، پیغمبردوست، س.ه.، حصاری، ج. و اکبری‌ادرگانی، ب. ١٣٩٧. جداسازی و شناسایی پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی از پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم پپسین. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، دوره١٣، شماره٤، ٥٠-٣٩. .

٤. نعمتی. م.، جوادیان. ر. و کشاورز. م. ١٣٩٨. تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) با استفاده از آنزیم آلکالاز. *زیست شناسی دریا*، *دوره*١١، *شماره*٣، ٨٧-٩٥.

5. 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) e00877.
6. Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44: 1044–1051.
7. AOAC. 2005. Official Method of Analysis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.
8. Behfar, S., Tababeiyazdi, F., Alizade, A., Kaviani, M. and Irajifar, M. 2013. Effect of grape seed extract polyphenols on growth of bacteria. 21st Iranian Food Science and Technology Congress. Tehran, Iran.
9. 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*, 114:1198-1205.
10. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., Ding, G. F. 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*,15:301-313.
11. Correa, A. P., Daroit, D. J., Coelho, J., Meira, S. M., Lopes, F.C., Segalin, J. 2011. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 91(12): 2247-54.

antioxidant peptides. *Food Chemistry*. 204:427-436.

21. Kamau, S. and Lu, R-R. 2011. The effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. Current Research in Dairy Sciences. 25-35.
22. Kim, S. M. 2011. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). Food Science and Biotechnology. 20(4):1075–1085.
23. Ko, J. Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. and Jeon, Y.J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology. 52(1): 113–120.
24. Korhonen, H., Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal, 16(9):945-960.
25. Lahart, N., O'Callaghan, Y., Aherne, S. A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R. J. and O'Brien, N. M. 2011. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: Evaluation using the human Jurkat T cell line. International Dairy Journal. 21(10): 777- 82.
26. Li, J. T., Zhang, J. L., He, H., Ma, Z. L., Nie, Z. K., Wang, Z. Z. and Xu, X. G. 2013. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. Food and Chemical Toxicology. 51: 297-305.
27. Mahdavi-Yekta, M., Nouri, L. and Azizi, M. H. 2019. The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from quinoa. Food Science & Nutrition. 7: 930–936.
28. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa *(Alosa caspia)* by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*,18 (7): 950-956.
12. De Castro, R. J. S. and Sato, H. H. 2015 A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4(1):55-62.
13. Dey, S. S., Dora, K. C. 2014. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science and Technology*.51(3): 449-457.
14. Ding, Q., T. Zhang, S. Niu, F. Cao, R. A. Wu-Chen, L. Luo and H. Ma. 2018. Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. *Ultrasonund Sonochem*, 42:704-713.
15. 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.
16. FAO. 2016. FaoStat: agriculture data: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
17. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., Varidi, M. J. 2015. Extraction optimization of fenugreek seed protein, *Science of Food and Agriculture*. 15:3165–3176.
18. Irina, C. C., Marius, I. U. and Adriana, M. 2009. Antioxidant effects of grape seed extract in a rat model of diabetes mellitus. *Diabetes and Vascular Research*. 6(3): 200-204.
19. Jahanbani, J., Ghaffari, S., Salami, M., Vahdati, K., Sepehri, H., Namazi Sarvestani, N., Sheibani, N. and Moosavi-Movahedi. A. 2016. Antioxidant and Anticancer Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) Protein Hydrolysates Using Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition*. 71: 402–409.
20. Jin, D., Liu, X., Zheng, X., Wang, X. and He, J. 2016. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates purification and evaluation of three novel corn

29. Ngo, D. H., Vo, T. S., Ngo, D. N.,Wijesekara, I. and Kim, S.K. 2012. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 51(4):378-383.
30. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis)* prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of Food Science and Agriculture*, 93, 1718–1726.
31. Poiana, M. A. 2012. Enhancing Oxidative Stability of Sunflower Oil during Convective and Microwave Heating Using Grape Seed Extract. *International Journal of Molecular Sciences*, 13:9240-925.
32. Rabiei, Sana., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M. and Rafieian-Kopaei, M. 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55:e18304, 1-10.
33. Ramkisson, Shanece., D , Depika., Venter, S. and Mellem, J. 2020. In vitro anticancer and antioxidant potential of Amaranthus cruentus protein and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*,40 (2): 634-639
34. Sbroggio, M. F., Montilha, M. S., Figueiredo, V. R. G., Georgetti, S. R. and Kurozawa, L. E. 2016. Influence of the degree of hydrolysis and type of enzyme on antioxidant activity ofokara protein hydrolysates. *Food Sci Technol*, 36: 375-381.
35. Šližyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storr, I. and Rustad, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40: 2021–2033.
36. Sun, Q., Shen, H. and Luo, Y. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 48: 1.53-60.
37. Taha, S. F., Mohamed, S. S., Wagdy M. S. and Mohamed, F. G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal*, 21: 651-658.
38. 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*, 229:24-32.
39. Xiu-xia, L., Lu-jia, H. and Long-jian C. 2008. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88(9):1660-6.
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*, 1–9.
41. Zhang, M., Mu, T.H. and Sun, M. J. 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7: 191–200.

(Original Research Paper)

Evaluation Of Antioxidant And Anti-cancer Properties Of Purified Peptides From Enzymatic Hydrolysis Of Grape Seed

Mahnaz Samadi Varedehsara[1], Peyman Ariayi[1*], Javad Hesari[2]

1-PhD student of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3-Department of Food and Technology, Faculty of Agriculture, university of Tabriz, Tabriz, Iran.

Received:12/10/2020 Accepted:10/01/2021

Abstract

In this study, the antioxidant and anti-cancer properties of bioactive peptides resulting from enzymatic hydrolysis of grape seed were determined using the microbial protease enzymes alcalase and flavourzyme. Protein hydrolysis was produced at three different times (10, 20 and 30 minutes), using commercial alcalase and flavourzyme enzymes at pHs of 8.5 and 7 (optimal pH of alcalase and flavourzyme enzymes) and in a ratio of 1 percentage of enzyme to the protein at a temperature of 50 ° C. The results showed that with increasing the hydrolysis time, the amount of protein recovery and the degree of hydrolysis increased and also the values of the mentioned parameters by the alcalase enzyme were significantly higher than the flavourzyme enzyme ($p < 0.05$). The highest antioxidant activity (DPPH free radical scavenging activity, ferric regenerative power and ABTS free radical scavenging activity) and anti-cancer properties against SW742 cells (colon cancer cells) was observed in the protein hydrolyzed by alcalase enzyme and in 30 minutes ($p < 0.05$). Due to the bitterness of this treatment (alcalase enzyme at time 30 minutes) its amino acid profile was determined, the highest levels of essential amino acid, valine 7.98% and then the amino acid leucine 7.11% and the highest un-essential amino acid glutamic acid was 19.55% and then the amino acid glycine was 12.55%. Overall, the hydrolyzed grape seed protein appears to have high antioxidant and anti-cancer activity, which may be useful ingredients in food and formulated diets applications.

Keywords: Hydrolyzed Protein, Commercial Enzymes, Amino Acid Profile, DPPH Free Radical, Colon Cancer

*Corresponding Author: p.aryaye@yahoo.com