

(Original Research Paper)

Evaluation of the Effect of Microbial Enzymes and Molecular Weight on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Barley Grain Hydrolyzed Protein

Negar Tajik¹, Peiman Ariayi^{2*}, Leila Najafian³

1-PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

3- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Branch, Islamic Azad University, Sari, Iran.

Received:29/09/2022

Accepted:30/11/2022

Doi: [10.71810/jfst.2025.1004682](https://doi.org/10.71810/jfst.2025.1004682)

Abstract

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

Keywords: Hydrolyzed Protein, Antioxidant, Barley Seed, Molecular Weight, Antimicrobial.

*Corresponding Author: p.aryaye@yahoo.com

(مقاله پژوهشی)

ارزیابی تاثیر آنزیم های میکروبی و وزن مولکولی بر خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده دانه جو

نگار تاجیک^۱، پیمان آریایی^{۲*}، لیلا نجفیان^۳

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

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

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۹/۰۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۰۷

Doi: [10.71810/jfst.2025.1004682](https://doi.org/10.71810/jfst.2025.1004682)

چکیده

یکی از منابع جدید آنتی اکسیدان های طبیعی، پروتئین های هیدرولیز شده از منابع گیاهی می باشد. جو با توجه به سازگاری بالا به شرایط اقلیمی مختلف و قابلیت رشد در زمین های فقیر و نامساعد و همچنین به علت دارا بودن ویتامین های A، E، B₁، B₂، B₁₂ و مواد معدنی و درصد پروتئین نسبتا بالا مورد توجه خاص است. بنابر این هدف از این تحقیق بررسی آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده دانه جو بوده است. بنابر این در این مطالعه پروتئین هیدرولیز شده دانه جو با استفاده از آنزیم های تجاری آلکالاز و فلاورزایم، هیدرولیز و پپتیدهای زیست فعال که با استفاده از روش اولترافیلتراسیون غشایی با سه فرکشن شامل کمتر از ۳ کیلو دالتون، ۳-۱۰ کیلو دالتون و ۱۰-۳۰ کیلو دالتون جدا گردید. خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و ضد میکروبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از میزان پروتئین و درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم برخوردار بود ($p < 0.05$). نتایج نشان داد که فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS و قدرت احیا کنندگی آهن در پروتئین هیدرولیز شده دانه جو توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده فلاورزایم بود ($p < 0.05$)، همچنین این پروتئین خاصیت ضد میکروبی بالاتری بر روی باکتری های پاتوژن داشت و خاصیت ضد میکروبی علیه باکتری استافیلوکوکوس/ارئوس بالاتر از شیرشیا کلی بود. پروتئین هیدرولیز شده دانه جو با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی را دارا بود ($p < 0.05$). نتایج کلی نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده دانه جو دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالقوه بوده و می تواند یک منبع ایمن خوراکی و غنی از پروتئین جهت استفاده در صنایع غذایی، غذاهای فراسودمند و خوراک دام توصیه شود.

واژه های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، آنتی اکسیدان، دانه جو، وزن مولکولی، ضد میکروبی.

۱- مقدمه

هر روز اثرات زیان آور نگهدارنده های شیمیایی از جمله عوارض سرطان زایی و خواص ترانوژنیک و نیز باقی مانده سمی بر سلامت انسان به اثبات می رسد و تقاضا برای مصرف مواد غذایی که عمر ماندگاری آنها به صورت طبیعی افزایش یافته، بیشتر می شود (۸). محققین مواد غذایی درصدد جایگزینی آنها با نمونه های طبیعی شده اند. یکی از منابع جدید آنتی اکسیدان های طبیعی، پروتئین های هیدرولیز شده از منابع گیاهی و جانوری می باشد. پروتئین های هیدرولیز شده، ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می شوند (۲۸). پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء پروتئینی شناخته می شوند که در ساختمان پروتئین غیر فعال بوده و پس از آزاد شدن از طریق هیدرولیز، تخمیر، هضم شدن توسط آنزیم های گوارشی و... اثرات متعددی بروز می دهند. پپتیدهای زیست فعال حاوی ۲۰-۲ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون هستند که اثرات مثبتی بر سلامت مصرف کننده دارند. امروزه پپتیدهای زیست فعال به علت قابلیت استفاده در تهیه مواد غذایی فراسودمند مورد علاقه و توجه هستند. این پپتیدها به عنوان ترکیبات ضد اکسایش، ضد میکروب، ضد سرطان، ضد فشار خون، ضد ترمبوز و... به شمار می روند و علاوه بر خواص سلامت بخشی، واجد ویژگی های عملکردی مانند امولسیون کنندگی و کف کنندگی، جذب آب و جذب روغن و ژل سازی می باشند (۳۲). این پپتیدها به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می شوند، در این میان هیدرولیز آنزیمی از روش های جدید در بیوتکنولوژی غذایی می باشد که فرآیندی قابل کنترل و ملایم است و منجر به نابودی آمینواسیدهای آزاد نمی شود (۲۲، ۲۸). پروتئین های هیدرولیز شده گیاهی همانند هسته انگور، دانه جو، شبدرد، جوانه گندم کنجاله کنجد و کلزا و ... به دلیل قیمت مناسب و آلرژی زایی کم، در مطالعات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است (۱۲، ۱۳، ۱۹، ۲۰، ۳۱).

گیاه جو به تیره ی گندمیان و جنس *Hordeum* تعلق دارد این جنس حدود ۲۵ گونه زراعی و وحشی دارد. جو از نظر میزان تولید رتبه ی پنجم را در میان غلات در دنیا دارد. ولی از نظر اهمیت، پس از گندم، ذرت و برنج چهارمین غله مهم دنیا به شمار می رود. از نظر علوفه ای به عنوان دومین گیاه در نظر گرفته می شود (۶). جو با توجه به سازگاری بالا به شرایط اقلیمی مختلف و قابلیت رشد در زمین های فقیر و نامساعد، نیاز کم به رطوبت و مصارف مختلفی که دارد، مورد توجه خاص است. دانه ی جو علاوه بر مصرف تغذیه ای انسان در کشورهای فقیر مانند کشورهای شمال آفریقا، در صنعت داروسازی و کارخانجات نشاسته سازی مورد استفاده قرار می گیرد. دانه ی این گیاه به عنوان منبع اصلی انرژی، پروتئین و فیبر برای نشخوار کنندگان و تقویت تولید تخم در مرغان تخم گذار به کار می رود. همچنین به علت دارا بودن ویتامین های A، E، B₁، B₂، B₁₂ و مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، سدیم، منگنز، منیزیم، آهن و روی، و درصد پروتئین نسبتا بالا (۸ تا ۳۰ درصد) به اهمیت آن افزوده شده است. جو نسبت به سایر غلات برای دامنه ی وسیعی از شرایط محیطی سازگار می باشد، بنابراین در مناطقی که شرایط محیطی برای تولید سایر غلات عامل محدود کننده ای است، جو می تواند محصول قابل قبولی تولید کند (۶، ۱۸).

با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین هیدرولیز شده و در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده دانه جو تا بحال مطالعه ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه جو توسط آنزیم های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی این پپتیدها می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد اولیه

دانه جو (رقم صحرا) از مرکز تحقیقات کشاورزی استان گلستان خریداری شد و به آزمایشگاه منتقل گردید. آنزیم آلکالاز و فلاورزایم (جدول ۱) از شرکت نوازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴

درجه سانتی گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجه آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

جدول ۱- آنزیم های مورد استفاده در آزمایش

نام تجاری	منبع	دامنه pH	دامنه دما	میزان فعالیت (واحد آنسون)
آلکالاز	<i>Bacillus licheniformis</i>	۶-۱۰	۵۵-۷۰	۲/۴
فلاورزایم	<i>Aspergillus oryzae</i>	۵-۷	۵۰-۷۰	۱/۵

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

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

دانه جو توسط آسیاب برقی (مدل کنوود، ساخت چین) پودر شد. سپس به منظور تهیه ایزوله پروتئینی ابتدا ۲۰۰ گرم پودر با ۱۰۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردید. سپس pH در ۹ و با استفاده از سود ۰/۱ مولار تنظیم و مخلوط به مدت ۱ ساعت در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد همزده و با دور ۸۰۰× ۱۰۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ (Z36 HK, Labnet, Germany) و فاز رویی جمع آوری شد. pH فاز رویی با اسید هیدروکلریک ۱ مولار در ۳/۴ تنظیم و مخلوط در ۱۰۰۰۰× g به مدت ۱۵ دقیقه، در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ شد. در انتها رسوبها جمع آوری شدند و مجدداً در آب به صورت سوسپانسیون در آمده و برای هیدرولیز آنزیمی در شرایط سرما نگهداری شد (۹).

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

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیمها (آلکالاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک (Comecta، اسپانیا) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و

۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشور کره) به صورت پودر در آمد (۳۱).

۲-۳- اندازه‌گیری میزان پروتئین دانه جو

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

۲-۴- درجه هیدرولیز

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

فرمول (۱)

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

۲-۵- ترکیب اسید آمینه

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

۲-۶- جداسازی پپتیدها

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

فرمول (۲)

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

۲-۷- اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۷-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

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

۲-۷-۲- اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش آنتی اکسیدان ها نقش احیاء کنندگی دارند و باعث احیا آهن فریک به آهن فرو می شود. بسته به قدرت احیاء کنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می یابد (۴).

۲-۷-۳- بررسی مهار رادیکال آزاد (ABTS)

محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از ABTS، ۷ میلی مولار و ۸۸ میکرو مولار پتاسیم پروسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط در تاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی لیتر از محلول موجود با ۴۰ میلی لیتر (بافر فسفات ۵ میلی مولار، pH ۷/۴، حاوی

NaCl ۰/۲ مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS بتواند در ۷۳۴ نانومتر عدد 0.02 ± 0.07 به دست آمد، ترکیب می شود. ۶۵ میکرو مولار نمونه محلول با ۶۵ میکرو مولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرو مولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ فرمول (۳)

$$100 \times (\text{جذب شاهد} / \text{جذب شاهد-جذب نمونه}) = \text{درصد مهار رادیکال آزاد ABTS}$$

رشد)، با مشخص شدن جذب نوری که معادل تقریباً 10^8 CFU/g باکتری در هر میلی لیتر بود، لوله کووت حاوی تقریباً 10^8 CFU/g باکتری در میلی لیتر مشخص گردید (۱۴).

۲-۸-۲-۲- حد اقل غلظت مهارکنندگی و حد اقل غلظت کشندگی پپتید

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

۸-۲-۸-۲- خصوصیات ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده میکروارگانیزم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: شریشیاکلی ۱۳۹۹:PTCC و استافیلوکوکوس اورئوس ۱۱۱۲:PTCC که از مرکز تحقیقات و پژوهش علمی صنعتی ایران تهیه شد.

۲-۸-۱- آماده سازی باکتری

سویه استاندارد و لیوفیلیزه باکتری‌ها از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه و تا زمان انجام آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. ابتدا طبق دستورالعمل و تحت شرایط استریل سر ویال‌ها شکسته و محتوی داخل محیط مایع مغذی محیط براث ۱ تخلیه و سپس در لوله‌ها با پنبه پوشانده شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها رشد کرده و کدورت ایجاد کنند. پس از گذشت مدت زمان مورد نظر با کمک آنس استریل از محیط مایع برداشت کرده و روی محیط جامد مغذی نوترینت آگار کشت داده شد. پلیت‌ها به صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت دیگر در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا کلنی‌های لازم ایجاد شدند. از این کلنی برای تهیه سوسپانسیون‌های استاندارد استفاده گردید. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی استاندارد از کلنی‌های رشد یافته ۲۴ ساعت بر روی محیط نوترینت آگار استفاده شد. سوسپانسیون حاصل برای مطابقت با نیم مک فارلند توسط اسپکتوفتومتر در طول ۶۲۵ نانومتر سنجیده شد. بدین ترتیب در هر بار انجام آزمایش (تعیین لگاریتم درصد احتمال

۹-۲- تجزیه و تحلیل آماری

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

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر پروتئین

میزان پروتئین اولیه دانه جو برابر با $12/71 \pm 0/49$ درصد و میزان پروتئین اولیه ایزوله دانه جو برابر با $45/24 \pm 0/93$ بوده است. همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف مابین $60/43 - 93/35$ درصد بوده است. بنابراین ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده به علت دارا بودن مقادیر

بالایی از پروتئین، دارای ارزش افزوده بوده و می‌تواند در فرمولاسیون غذای دام و همچنین در صنعت غذایی و دارویی استفاده شود (۱). همچنین مقادیر بالاتر پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با ایزوله دانه جو، به علت تجزیه پروتئین در حین فرآیند هیدرولیز می‌باشد و همچنین انجام سانتریفیوژ در حین فرآیند هیدرولیز، سبب جداسازی قسمت‌های غیر پروتئین نمونه می‌شود (۱۲). Guo و همکاران (۲۰۱۶) مقادیر پروتئین اولیه دو رقم مختلف جو را مابین $11/6 - 13/3$ درصد اعلام نمودند که نتایج آن‌ها با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی داشت (۱۵). Houde و همکاران (۲۰۱۸) به اندازه‌گیری مقادیر پروتئین کنسانتره آرد جو بدون چربی با استفاده از روش‌های قلیایی و آنزیمی پرداختند. آنها اعلام نمودند تیمار آنزیمی کنسانتره پروتئین با بالاترین محتوای پروتئین (۴۹/۰ درصد) تولید نمودند (۱۷). Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر پروتئین جو را $9/56$ درصد اعلام نمودند (۱۸).

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

آلکالاز	فلاورزایم	آنزیم
		زمان هیدرولیز (دقیقه)
$75/56 \pm 0/53^{Ac}$	$60/43 \pm 0/55^{Bc}$	۱۰
$83/67 \pm 0/46^{Ab}$	$70/43 \pm 0/56^{Bb}$	۲۰
$93/35 \pm 0/85^{Aa}$	$83/08 \pm 0/53^{Ba}$	۳۰

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین $\pm$ انحراف از معیار)

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

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

۳-۲- بررسی مقادیر درجه هیدرولیز

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز نشان داد که نوع آنزیم و زمان فرآیند تأثیر مستقیمی بر روند افزایشی درجه هیدرولیز داشت ($p < 0/05$). به طوریکه مقادیر درجه هیدرولیز توسط هر دو آنزیم به طور پیوسته افزایش یافت، درجه هیدرولیز به طور قابل توجهی تحت تأثیر زمان فرآیند بود و طول زنجیره

پپتیدی با درجه هیدرولیز نسبت عکس دارد بنابراین افزایش درجه هیدرولیز باعث کوتاه‌تر شدن طول زنجیره پپتیدی و کاهش توزیع وزن مولکولی می‌شود و در نتیجه باعث شکسته شدن نوارهای پپتیدی و افزایش اسیدهای آمینه آزاد می‌شود (۲، ۲۷). در بین دو آنزیم، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز درجه هیدرولیز بالاتری را در تمامی

زمان‌های هیدرولیز نشان داد ($p < 0.05$). علت این امر ممکن است عملکرد دو آنزیم را در قابلیت آلکالاز در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد بیان کرد (۲۲، ۲۹).

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

فلاورزایم	آلکالاز	آنزیم
		زمان هیدرولیز (دقیقه)
10.75 ± 0.42^{Bc}	14.10 ± 0.44^{Ac}	۱۰
16.19 ± 0.17^{Bb}	20.24 ± 0.80^{Ab}	۲۰
20.40 ± 0.55^{Ba}	28.94 ± 0.86^{Aa}	۳۰

(۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین $\pm$ انحراف از معیار)

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

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

۳-۳- ترکیب اسید آمینه

آنزیم‌های پروتئولیتیک پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچک متشکل از ۲-۲۰ اسید آمینه تجزیه می‌کند. وزن مولکولی، طول و توالی پپتیدها و ترکیب اسید آمینه آن‌ها بر خواص پپتیدهای زیست فعال تأثیر می‌گذارد. هیدرولیزهای پروتئینی شامل آمینو اسیدهای آزاد و پپتیدهای با زنجیره کوتاه هستند که دارای ارزش غذایی و خواص زیستی مفیدی دارد (۲۵). عملکرد پروتئین‌های هیدرولیز شده به ترکیب اسید آمینه آن بستگی دارد. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد، که میزان اسیدهای آمینه آبگریز آزاد (HAA) تحت تأثیر نوع پروتئاز قرار دارد. به طوری که مقادیر HAA در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز برابر با ۴۱/۹۴ درصد و برای آنزیم فلاورزایم برابر با ۳۹/۵۲ درصد بوده است. در مجموع اسیدهای آمینه‌ای که دارای خواص آبگریز هستند، نقش مهمی در روند بازدارندگی رادیکال‌های آزاد دارند. این امر به دلیل توانایی اسیدهای آمینه آبگریز در افزایش دسترسی به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش دسترسی رادیکال‌های آزاد در

سلول‌های هدف رخ می‌دهد (۱۱). Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر HAA پروتئین جو را ۳۷/۸۶ درصد اعلام نمودند که به نظر می‌رسد پس از هیدرولیز پروتئین مقادیر HAA افزایش می‌یابد (۱۸). بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری در ارتباط با هر دو آنزیم، لوسین (آنزیم آلکالاز ۶/۹۹ درصد و آنزیم فلاورزایم ۶/۱۵ درصد) و بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری گلوتامیک اسید (آنزیم آلکالاز ۱۹/۲۵ درصد و آنزیم فلاورزایم ۱۸/۷۵ درصد) بود. Jaeger و همکاران (۲۰۲۱) مقادیر لوسین و گلوتامیک اسید، پروتئین جو را به ترتیب ۳/۱۳ و ۸/۸۹ درصد اعلام نمودند (۱۸). بر اساس توصیه های (FAO/WHO 1990) در مورد پروتئین‌های هیدرولیز شده تنها اسیدهای آمینه لایزین و فنیل آلانین دارای محدودیت نسبت به پروتئین حیوانی بود (۱۰)، بنابراین پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنگد از کیفیت غذایی مناسبی برخوردار باشد و می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئین در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند (۲۰).

جدول ۴- ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	فلاورزایم	FAO/ WHO, 1990
هیستدین ^۱	۲/۹۹	۲/۵۵	
ایزو لوسین ^۱	۳/۵۸	۳/۲۵	۲/۸۰
لوسین ^۱	۶/۹۹	۶/۱۵	۶/۶۰
لایزین ^۱	۴/۹۹	۴/۵۸	۵/۸۰
متیونین ^۱	۲/۵۶	۲/۴۱	
فنیل آلانین ^۱	۵/۹۹	۵/۵۵	۶/۳۰
تروئین ^۱	۳/۵۹	۳/۴۵	۳/۴
والین ^۱	۴/۵۵	۴/۰۱	۳/۵
آسپارتیک اسید	۷/۳۵	۷/۹۹	
آرژنین	۴/۵۹	۴/۷۹	
پرولین	۱۰/۹۷	۱۰/۱۱	
سرین	۷/۵۵	۸/۵۹	
آلانین	۴/۲۵	۴/۰۵	
سیستئین	۲/۲۹	۳/۵۵	
گلو تامیک اسید	۱۹/۲۵	۱۸/۷۵	
تیروزین	۳/۰۵	۳/۹۹	۱/۱
گلايسین	۵/۲۵	۴/۹۹	
HAA ^۱	۴۱/۹۴	۳۹/۵۲	
میزان اسید آمینه کل	۹۹/۷۹	۹۸/۷۶	

^۱ اسید آمینه ضروری

^۲ مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تربتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۴-۳- خاصیت آنتی اکسیدانی

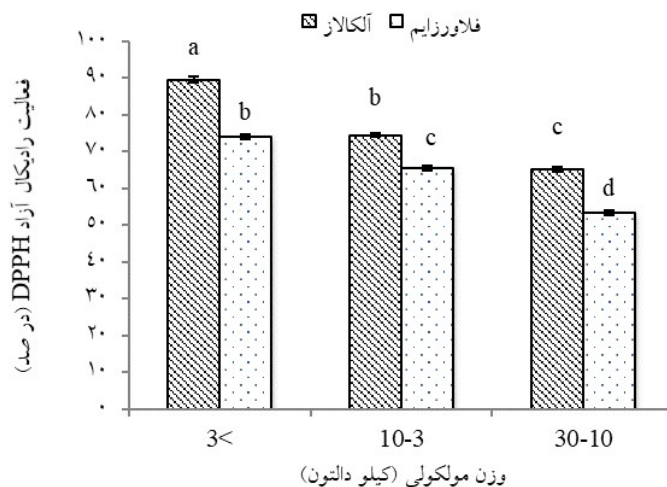
۴-۳-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

تمامی پروتئین های هیدرولیز شده دارای فعالیت آنتی - اکسیدانی بودند اما فعالیت مهار رادیکال DPPH ارتباط مستقیمی و معنی داری با وزن مولکولی و نوع آنزیم داشت ($p < 0.05$). اگر رادیکال های DPPH با یک سوبسترای پروتئینی مانند یک آنتی اکسیدان برخورد کنند، رادیکال ها پاک می شوند و جذب کاهش می یابد. کاهش جذب به عنوان معیاری برای فعالیت مهار رادیکال آزاد، در نظر گرفته شده است. پروتئین هیدرولیز شده جو، حاوی دهنده هیدروژن است که با واکنش با رادیکال های آزاد تثبیت می شوند زیرا اسیدهای آمینه با باقی مانده های زنجیره

جانبی آبگریز می توانند سبب انتقال الکترون از پپتیدها به رادیکال DPPH شوند (۲۱). همچنین فعالیت مهار رادیکال DPPH، پروتئین جو تولیدی توسط آنزیم آلکالاز به طور معنی داری بالاتر از فلاورزایم بود ($p < 0.05$). ممکن است به علت بالاتر بودن HAA در این پروتئین باشد، اسیدهای آمینه آبگریز بالاتر سبب افزایش دسترسی بیشتر به رادیکال های آزاد و در نتیجه کاهش دسترسی رادیکال- های آزاد در سلول های هدف رخ می دهد (۱۱). پپتیدهای آنتی اکسیدانی در صنایع غذایی اهمیت ویژه ای دارند، به طوری که کیفیت محصول را با جلوگیری از اکسیداسیون پروتئین ها، لیپیدها و اسیدهای نوکلئیک حفظ می کنند (۲۶). این نتایج با نتایج Ovissipour و همکاران (۲۰۱۳)

(پروتئین ماهی کیلکا) و Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) پروتئین هسته انگور) هم خوانی دارد (۲۳ و ۳۱)، آنها نیز اعلام کردند پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به فلاورزایم دارا می‌باشد. با توجه به نتایج مربوط به فعالیت مهار رادیکال DPPH، بالاترین مقادیر به ترتیب در وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون، سپس کمتر از ۱۰ کیلو دالتون و در انتهای مابین ۱۰-۳۰ کیلو دالتون مشاهده شد ($p < 0.05$). وزن مولکولی کمتر از ۱۰-۳۰ کیلو دالتون فعالیت مهار DPPH بسیار پایینی را نشان داد. پروتئین جو با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون، حاوی پپتیدها/اسیدهای آمینه، بالاتری می‌باید که می‌تواند به عنوان دهنده‌های

هیدروژن، رادیکال‌های آزاد تثبیت را تثبیت نمایند. نتایج مشابهی توسط Nasir and Sarbon (۲۰۱۹) نیز گزارش نمودند پروتئین هیدرولیز شده اسکلت ماهی (*Decapterus macrosoma*) با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا بود (۲۱). Taheri و Bakhshizadeh (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده *skipjack tuna* با اندازه مولکولی ۳ کیلو دالتون بالاترین مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان داده است (۳۳). بر اساس این گزارش‌ها، پپتیدهای کوچکتر به عنوان اهداکنندگان پروتون مناسب با هیدرولیز گسترده پروتئین‌ها تولید می‌شوند.



شکل ۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

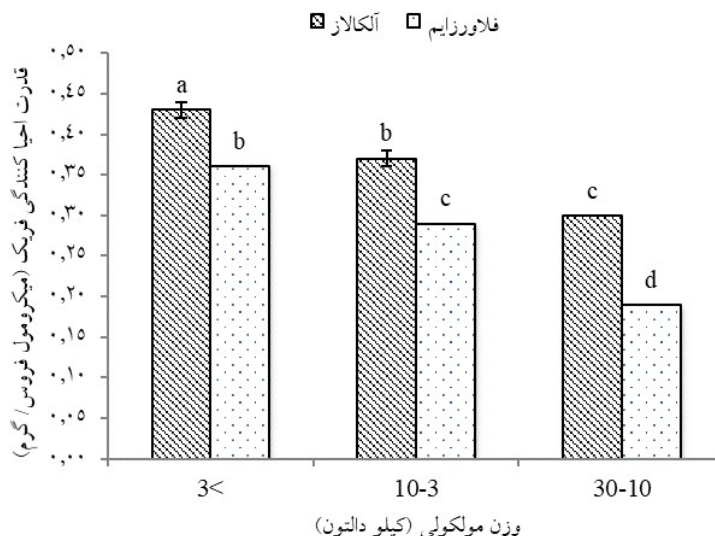
۳-۴-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

قدرت احیا کنندگی فریک پروتئین‌های هیدرولیز شده (شکل ۲) به طور معنی داری تحت تاثیر پارامترهای فرآیند (نوع آنزیم و وزن مولکولی) بوده است. بیشترین قدرت احیا کنندگی فریک، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بود (۴۳/۰ میکرومول فروس/ گرم) ($p < 0.05$). در حالی که کمترین مقادیر مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم با وزن مولکولی ۱۰-۳۰ کیلو دالتون بود

(۱۹/۰ میکرومول فروس/ گرم). ترکیبات با قدرت کاهش بالتر توانایی بهتری برای اهدای الکترون یا هیدروژن دارند و پتانسیل قابل توجهی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی دارند (۵). پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون احتمالاً حاوی بالاترین سطوح پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد است که قادر به اهدای الکترون به رادیکال‌های آزاد و پایان دادن به واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون هستند (۳۴). Aondona و همکاران، (۲۰۲۰) پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد

نشان داده است (۳۳). بنابر این بر اساس این دو مطالعه، قدرت کاهنده نیز مشابه مطالعه حاضر وابسته به وزن مولکولی بوده است.

بالاترین توانایی کاهندگی در کمترین وزن مولکولی مشاهده شد (۱) Taheri و Bakhshizadeh (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده *skipjack tuna* با اندازه مولکولی ۳ کیلو دالتون بالاترین توانایی کاهندگی را

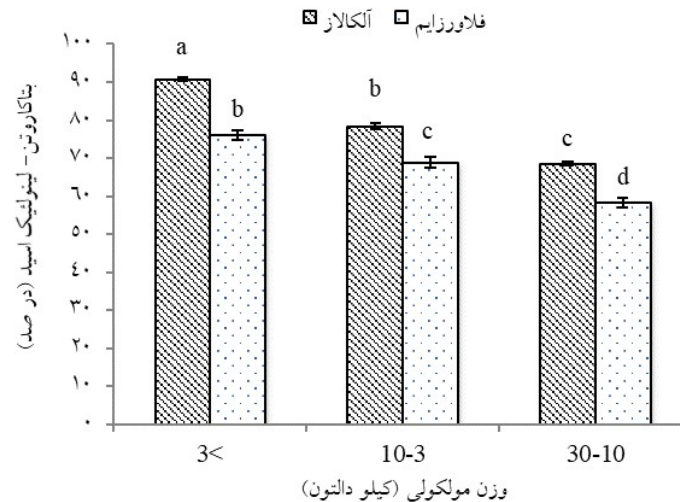


شکل ۲- مقادیر قدرت احیا کنندگی آهن

توسط آنزیم فلاورنایم با وزن مولکولی ۱۰-۳۰ کیلو دالتون بود (۵۸/۳۶ درصد). خاصیت آنتی اکسیدانی، توانایی مهار رادیکال کاتیونی و محلول در آب ABTS، مانند سایر شاخص ها، به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز و ترکیب اسید آمینه پپتیدها بستگی دارد و همچنین اندازه پپتیدها می تواند عامل کلیدی در توانایی حذف رادیکال ABTS باشد (۲۷). Shahosseini و همکاران (۲۰۲۲) نیز نتایج مشابهی را در مورد پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیاح گزارش نموده و بیان داشته اند نوع آنزیم مورد استفاده برای هیدرولیز و اندازه پپتیدها می تواند تاثیر بسزایی در توانایی حذف رادیکال ABTS بگذارد (۲۹).

۳-۴-۳- فعالیت رادیکال آزاد ABTS

ارزیابی مهار رادیکال محلول در آب ABTS یکی دیگر از شاخص های تعیین قدرت ترکیبات آنتی اکسیدان و اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر این شاخص است. عملکرد هر آنزیم از نظر نوع رهایش اسیدهای آمینه خاص (لیوفیل یا هیدروفیل) می تواند بر مهار رادیکال های آزاد مؤثر باشد. این پپتیدها از طریق اهداء اتم هیدروژن به رادیکال های آزاد موجب توقف با کاهش سرعت فرآیند اکسیداسیون می شوند. بیشترین مهار رادیکال محلول در آب ABTS (شکل ۳)، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بود (۹۰/۷۲ درصد). در حالی که کمترین مقادیر مربوط به پروتئین هیدرولیز شده



شکل ۳- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد ABTS

۳-۵- فعالیت ضد میکروبی

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

الکتروشیمیایی و در نهایت مرگ سلولی می‌شود (۳). همچنین توالی اسید آمینه، ساختار ثانویه، طول و وزن مولکولی بر فعالیت ضد میکروبی پپتیدها تأثیر گذار می‌باشد (۳۳). با توجه به نتایج باکتری گرم مثبت /استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت پایین‌تری نسبت به باکتری /شیرشیاکلی داشت. علت این امر، حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره سلولی لیپیدی ساکاریدی است که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد (۷). عملکرد ضد باکتریایی پپتیدها به گونه‌های باکتریایی بستگی دارد. اول، پپتیدها ممکن است به صورت الکترواستاتیکی به غشاهای باکتری متصل شوند. بنابراین، ساختارها و فرآیندهای بین سلولی، مانند سنتز دیواره سلولی، DNA، RNA و سنتز پروتئین ممکن است تحت تأثیر قرار گیرند و غشای پلاسما ممکن است قطع شود (۲۶).

جدول ۵- مقادیر MIC پروتئین های هیدرولیز شده علیه باکتری های مختلف

تیما	باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس / شیرشیکلی	
		استافیلوکوکوس اورئوس	شیرشیکلی
آلکالاز (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)		۳۵۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bb}	۵۲۵/۰۰±۲۵/۰۰ ^{Ab}
آلکالاز (۳-۱۰ کیلو دالتون)		۲۸۳/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bc}	۴۶۶/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Ac}
آلکالاز (<۳ کیلو دالتون)		۲۰۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bd}	۳۵۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ac}
فلاورزایم (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)		۴۰۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ba}	۶۲۵/۰۰±۲۵/۰۰ ^{Aa}
فلاورزایم (۳-۱۰ کیلو دالتون)		۳۵۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bb}	۵۰۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ab}
فلاورزایم (<۳ کیلو دالتون)		۳۰۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bc}	۴۳۳/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ad}

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

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

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

جدول ۶- مقادیر MBC پروتئین های هیدرولیز شده علیه باکتری های مختلف

تیما	باکتری	استافیلوکوکوس اورئوس / شیرشیکلی	
		استافیلوکوکوس اورئوس	شیرشیکلی
آلکالاز (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)		۴۱۶/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Bb}	۶۰۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ab}
آلکالاز (۳-۱۰ کیلو دالتون)		۳۵۸/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Bc}	۵۳۳/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ac}
آلکالاز (<۳ کیلو دالتون)		۲۶۶/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Bd}	۴۳۳/۳۳±۱۴/۴۳ ^{Ac}
فلاورزایم (۱۰-۳۰ کیلو دالتون)		۴۹۱/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Ba}	۷۱۶/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Aa}
فلاورزایم (۳-۱۰ کیلو دالتون)		۴۴۱/۶۶±۱۴/۴۳ ^{Bb}	۶۲۵/۰۰±۲۵/۰۰ ^{Ab}
فلاورزایم (<۳ کیلو دالتون)		۳۷۵/۰۰±۲۵/۰۰ ^{Bc}	۵۰۰/۰۰±۲۵/۰۰ ^{Ad}

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

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

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

۴- نتیجه گیری

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

۵- منابع

1. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*. 2007 105 (1): 57-64.
2. Aondona M, Ikya J. K, Ukeyima M.T, Gborigo J. A, Aluko R. E, Girgih A.T. 2021. In vitro antioxidant and antihypertensive properties of sesame seed enzymatic protein hydrolysate and ultrafiltration peptide fractions. *Journal of Food Biochemistry*. 2021: 45: 1056-1073.
3. Borrajo P, Pateiro M, Gagaoua M, Franco D, Zhang W, Lorenzo J. M. Evaluation of the Antioxidant and Antimicrobial Activities of Porcine Liver Protein Hydrolysates Obtained Using Alcalase, Bromelain, and Papain. *Appl. Sci*. 2020; 10: 22-33.
4. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 2009; 114: 1198-1205.
5. Chalamaiiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. 2012; 135(4): 3020-3038.
6. Cozzolino D, Roumeliotis S, Eglinton J. 2015. Relationships between fatty acid contents of barley grain, malt, and wort with malt quality measurements. *Cereal Chemistry*. 92: 93-97.
7. Da Rocha M, Alemán A, Romani V. P, López-Caballero M. E, Gómez-Guillén M. C, Montero P, Prentice C. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food Hydrocolloids*. 2018; 81: 351-363.
8. Davidson, P. M., Taylor, T.M. and Schmidt, S .E. 2013. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds, in Food microbiology. American Society of Microbiology, 22: 765-801.
9. DECastro R. J. S, Cason V. G, Sato H. H. Binary mixture of proteases increases the antioxidant properties of white bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein-derived peptides obtained by enzymatic hydrolysis. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2017; 10: 291-297.
10. FAO/WHO, 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.
11. Firmansyah M, Abduh M. Y. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from *Hermetia illucens*. *Heliyon*. 2019; 5(6): 25-41.
12. Ghanbarinia S. H, Ariaii P, Safari R, Najafian L. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during

21. Nasir S. N. A. M, Sarbon N. M. Angiotensin converting enzyme (ACE), antioxidant activity and functional properties of shortfin scad (*Decapterus macrosoma*) muscle protein hydrolysate at different molecular weight variations. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 2019; 20: 101-124.
22. Nemati M, Javadian S. R, Ovissipour M. Keshavarz M. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*. 2012; 18 (7): 950-956.
23. Ovissipour M, Rasco B, Shiroodi S.G, Modanlow M, Gholami S, Nemati M. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of Food Science and Agriculture*. 2013; 93: 1718–1726.
24. Rabiei S, Rezae M, Asgharzade D, Nikoo M, Rafieian-Kopaei M. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2019; 55:1-10.
25. Ryu B, Shin K. H, Kim S. K. Muscle Protein Hydrolysates and Amino Acid Composition in Fish. *Mar Drugs* Jun. 2021; 29: 11-29.
26. Saad A. M, Sitohy M. Z, Ahmed A. I, Rabie N. A, Amin S. A, Aboelenin S. M, Soliman M. M, El-Saadony M. T. Biochemical and Functional Characterization of Kidney Bean Protein Alcalase - Hydrolysates and Their Preservative Action on Stored Chicken Meat. *Molecules*. 2021; 26: 46-59.
27. Shahi Z, Sayyed-Alangi S. Z, Najafian L. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. *Heliyon*. 2020; 6(2): 55-72.
- refrigerated storage. *Animal science journal*. 2022; 93: 11-29.
13. Ghelich S, Ariaei P, Ahmadi M. Evaluation of Functional Properties of Wheat Germ Protein Hydrolysates and Its Effect on Physicochemical Properties of Frozen Yogurt. *Int J Pept Res Ther*. 2022; 28: 69-81.
14. Grisi T. C, Lira K. G. Action of nisin and high ph on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*. 2005; 36: 151-156.
15. Guo B, Luan H, Lin S, Lv C, Zhang X, Xu R. Comparative proteomic analysis of two barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) with contrasting grain protein content. *Front Plant Sci*. 2016; 7:1–11.
16. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S. 2019. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measurement*, 12: 721–727.
17. Houde M, Khodaei N, Benkerroum N, Karboune, S. Barley protein concentrates: Extraction, structural and functional properties. *Food Chemistry*. 2018; 254: 367–376.
18. Jaeger A, Emanuele Z, Aylin W, Sahin, Elke K. Arendt. Barley Protein Properties, Extraction and Applications, with a Focus on Brewers' Spent Grain Protein. *Foods*, 2021; 10(6): 13-29.
19. Mirsadeghi Darabi D, Ariaei P, Safari R, Ahmadi M. Effect of clover sprouts protein hydrolysates as an egg substitute on physicochemical and sensory properties of mayonnaise. *Food Science & Nutrition*. 2022; 10: 253–263.
20. Mirzapour Z, Ariaei P, Safari R. Evaluation the Effect Hydrolyzed Canola Meal Protein with Composite Coating on Physicochemical and Sensory Properties of Chicken Nugget. *Int J Pept Res Ther*. 2022; 28: 71-90.

(*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020; 26: 625–632.

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