

(مقاله پژوهشی)

## بررسی تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر

دینا میرصادقی دارابی<sup>۱</sup>، پیمان آریایی<sup>۲\*</sup>، رضا صفری<sup>۳</sup>، محمد احمدی<sup>۴</sup>

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- پژوهشگر اکلوزی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، ساری، ایران.

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

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۹/۰۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

DOI: [10.30495/jfst.2021.1940789.1756](https://doi.org/10.30495/jfst.2021.1940789.1756)

### چکیده

در این مطالعه پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر با استفاده با استفاده از آنزیم‌های تجاری آلکالاز و فلاورزایم و در سه زمان مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از میزان پروتئین، بازیافت نیترژنی و درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تأثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ( $p < 0.05$ ). ترکیب اسیدهای آمینه نیز نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف دارای ترکیب نسبتاً مشابهی هستند. در مجموع، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیرضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم آسپارتیک اسید (۱۸/۹۹، ۱۷/۵۸ درصد) (به ترتیب) و بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای آنزیم‌های مذکور، لوسین (۷/۷۸ و ۷/۱۲ درصد) (به ترتیب) بوده است. پروتئین هیدرولیز شده تولیدی توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (خنثی‌سازی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی فریک) و خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) را دارا بود. به طور کلی نتایج نشان دادند که هیدرولیز پروتئین جوانه شبدر به وسیله آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم باعث تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی می‌شود و آنزیم آلکالاز، آنزیم موثرتری از فلاورزایم بود. بنابراین به نظر می‌رسد، پروتئین جوانه شبدر به‌عنوان یک منبع ایمن خوراکی و غنی از پروتئین، در مواد غذایی و در فرمول‌های رژیم غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

**واژه‌های کلیدی:** پروتئین هیدرولیز شده، آنزیم‌های تجاری، جوانه شبدر، رادیکال آزاد DPPH.

## ۱- مقدمه

مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی مؤثرند. پپتیدهای ضد اکسایشی از لحاظ جنبه‌های اقتصادی ترجیح داده می‌شوند، زیرا این ترکیبات در غلظت پائین نیز مؤثرند (۲۰، ۲۸). پروتئاز به آنزیم‌هایی گفته می‌شود که باعث تجزیه پروتئین‌ها می‌شوند. پروتئازها به طور پیوسته‌ای با مسیرهای مهم بیولوژیکی در ارتباط می‌باشند. بنابراین تصور اهمیت آن‌ها حتی در ارتباط با ابتدایی‌ترین ارگانسیم‌ها و نقش‌شان در سیر تکاملی دشوار نیست. پیچیدگی‌های تکاملی ارگانسیم‌های زنده دامنه گسترده‌ای از پروتئازها با عملکردهای متنوع را به وجود آورده که توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده‌است. گرچه واضح‌ترین مشخصه پروتئازها نوع عملکردشان روی سوستر است اما گاهی به دلیل پیچیدگی‌هایشان کاملاً مشخص نمی‌شود. پروتئازها بر اساس نوع فعالیت به دو دسته اگزوپپتیداز و اندوپپتیداز تقسیم می‌شوند. اندوپپتیدازها، پیوند پپتیدی را از وسط زنجیره قطع می‌کنند در حالی که اگزوپپتیدازها بر انتهای زنجیره اثر می‌کنند. مهم‌ترین آنزیم‌های که طی تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است شامل آنزیم آلکالاز (دارای فعالیت اندوپروتئازی در شرایط قلیایی) و فلاورزایم (مخلوطی از اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز) می‌باشد (۹، ۲۰، ۲۱، ۲۸، ۳۰). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین هیدرولیز شده و با توجه به اینکه در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده جوانه شیدر تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی جوانه شیدر توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این پپتیدها می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد اولیه

جوانه شیدر بانام تجاری راوک (تولیدات کشاورزی سرچین، ایران) از فروشگاه زنجیره‌ای آرین خریداری شد. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم (استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴

شیدر ایرانی (*Trifolium resupinatum* L.) یک گیاه یک ساله علوفه‌ای است که در شرایط نیمه خشک مناطق مدیترانه‌ای رشد می‌کند. پروتئین جوانه شیدر، که غنی از پروتئین‌های محلول در آب و محلول در آب نمک می‌باشد، از ویژگی‌های عملکردی مطلوبی برخوردار است که آن را تبدیل به ترکیبی سودمند برای استفاده در فرآورده‌های غذایی کرده است. فعالیت امولسیفایری، توانایی حفظ آب بالا، کف‌کنندگی و حلالیت بالا، از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند (۵، ۱۴). جوانه شیدر همچنین غنی از اسیدهای آمینه به ویژه اسیدهای آمینه ضروری که در بسیاری از دانه‌های غله‌ای کمیاب هستند، مانند لایزین، متیونین و ترئونین می‌باشد، به همین دلیل، یکی از منابع مهم و با ارزش پروتئین‌های گیاهی به شمار می‌رود. با توجه به این که جوانه شیدر با داشتن ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای بالا، اثرات مفیدی روی سلامتی انسان داشته و در عین حال منبع پروتئینی ارزان قیمت است، می‌توان پروتئین موجود در آن را که به عنوان یکی از بهترین منابع پروتئین‌های گیاهی شناخته می‌شود، به منظور مصارف انسانی، استخراج و یا هیدرولیز کرده و در فرمولاسیون مواد غذایی، به کار برد (۵، ۳۳). هدف از هرگونه واکنش هیدرولیز بر روی پروتئین‌ها جداسازی اسیدهای آمینه از ماده اولیه و بازبایی کمی این ترکیبات در طی فرآیند می‌باشد. انتخاب روش مناسب جهت هیدرولیز به نوع آنالیز نهانی محصول بستگی دارد. هیدرولیز می‌تواند به صورت شیمیایی که شامل واکنش‌های اسیدی و قلیایی می‌باشد، انجام شود و یا توسط آنزیم صورت گیرد. در مقایسه با تیمارهای شیمیایی، معمولاً تیمارهای آنزیمی ترجیح داده می‌شوند، زیرا در این حالت شرایط ملایم‌تری نیاز است و واکنش راحت‌تر کنترل می‌شود و تولید فرآورده‌های جانبی نامتناسب حداقل است (۱۷). هیدرولیز آنزیمی یک فرآیند پیچیده بوده و مطالعات اولیه فراوانی به منظور درک و ایجاد یک فرآیند آنزیمی مؤثر ضروری است. به منظور تولید پپتیدهای ضد اکسایش، آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره پروتئینی باشد. متغیرهای

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

## ۲-۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

### ۲-۲-۱- آماده‌سازی ایزوله پروتئین از جوانه شبدر

جوانه شبدر پس از تمیز شدن به مدت ۸ ساعت توسط  $\text{pH}$ - هگزان چربی‌زدایی و در دمای اتاق خشک شد. جوانه شبدر فاقد چربی با استفاده آسیاب چکشی آزمایشگاهی آسیاب و آرد حاصله پس از غربال شدن با مش ۷۰، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (۳۵).

### ۲-۲-۲- هیدرولیز ایزوله پروتئینی حاصل از جوانه شبدر

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر 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  $\text{pH}$  بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد 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 سانتی‌گراد 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 جمع‌آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشور کره) به صورت پودر در آمد (۲۸).

## ۲-۳- 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 میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر 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 رابطه ۱ محاسبه گردید (۲۰):

رابطه (۱)

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

## ۲-۴- میزان بازیافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت تعیین 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 T80 ساخت کشور انگلستان قرائت شد. میزان بازیافت پروتئینی از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید (۲۲).

رابطه (۲)

$100 \times (\text{میزان پروتئین موجود در نمونه} / \text{میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیز شده}) = \text{بازیافت پروتئینی}$

## ۲-۵- ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق‌سازی 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 (۹).

## ۲-۶- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز

شده

### ۲-۶-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و

۴ ساعت قرار گرفت و پس از محلول سازی فرمازان (تبدیل رنگ به بنفش ارغوانی) توسط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO جذب نوری در ۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (۱۲).

## ۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در 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 جوانه شبدر برابر با  $30/81 \pm 1/04$  درصد و میزان پروتئین اولیه ایزوله جوانه شبدر برابر با  $48/63 \pm 1/20$  درصد بوده است. همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف (جدول ۱) مابین  $50/85$  -  $91/24$  درصد بوده است. بر اساس نتایج، پروتئین در ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده از میزان بالایی برخوردار می‌باشد، که می‌تواند به عنوان ارزش افزوده در توسعه محصول غذایی استفاده شود یا می‌تواند برای افزایش سطح پروتئین در فرمولاسیون مواد غذایی و خوراک دام استفاده شود (۴). نمونه هیدرولیز شده دارای پروتئین بالاتری در مقایسه با ایزوله و جوانه دانه شبدر بود. علت این موضوع تجزیه شدن پروتئین در اثر هیدرولیز و به دنبال آن سانتریفیوژ بود که منجر به جداسازی قسمت‌های غیرپروتئینی از نمونه هیدرولیز شده گردید (۱۳).

به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد خوانده شد (۶).

رابطه (۳)

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

### ۲-۶-۲- اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش آنتی‌اکسیدان‌ها نقش احیاءکنندگی دارند و باعث احیا آهن فریک به آهن فرو می‌شود. بسته به قدرت احیاءکنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می‌یابد (۶).

### ۲-۷-۲- خصوصیات ضدسرطانی پروتئین هیدرولیز شده

#### ۲-۷-۲-۱- کشت سلولی

سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) از انستیتو پاستور ایران- تهران تهیه گردید، سپس در محیط DMEM<sup>۱</sup> به همراه ۵ درصد سرم جنین گوساله (FCS<sup>۲</sup>) پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر کشت گردید. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در رطوبت ۹۰ درصد و  $CO_2$  ۵ درصد قرار گرفت. سلول‌های نرمال (Mouse C34/An connective tissue) L929 در FCS ۱۰ درصد قرار گرفت. بعد از ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سلول‌ها در معرض پروتئین هیدرولیز شده قرار گرفت.

زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT (۳، ۴، ۵) دی‌متیل تیازول ۲ یل ۲، ۵ دی‌فنیل تترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه سلول‌ها به تعداد ۵ هزار در پلیت ۹۶ خانه‌ای قرار گرفت و در زمان‌های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از اضافه کردن پروتئین هیدرولیز شده به سلول‌ها محیط کشت رویی دور ریخته شد و سلول‌ها در محلول MTT (۵ میلی‌گرم / میلی‌لیتر در بافر فسفات سالین<sup>۳</sup> (PBS)) به مدت

1-Dulbecco's Modified Eagle Medium

2-Fetal Calf Serom

3-Phosphate Buffered Saline

4-Dimethyl SulfoXid

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

| فلاورزایم                | آلکالاز                  | آنزیم                 |
|--------------------------|--------------------------|-----------------------|
|                          |                          | زمان هیدرولیز (دقیقه) |
| ۵۰/۸۵±۱/۲۳ <sup>Bc</sup> | ۶۱/۲۱±۱/۰۹ <sup>Ac</sup> | ۱۰                    |
| ۶۳/۱۴±۰/۹۱ <sup>Bb</sup> | ۷۴/۸۹±۰/۹۶ <sup>Ab</sup> | ۲۰                    |
| ۷۶/۹۹±۱/۰۵ <sup>Ba</sup> | ۹۱/۲۴±۱/۳۰ <sup>Aa</sup> | ۳۰                    |

(۱) همه اعداد بر حسب درصد 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, ...)

### ۲-۳- بررسی مقادیر درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز در جدول ۲ ارائه شده است، با توجه به نتایج، کارایی هیدرولیز آنزیمی بسته به شرایط فرآیند، نوع آنزیم و زمان هیدرولیز متفاوت است. به طوری که با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر درجه هیدرولیز به طور معنی داری افزایش یافت. بر اساس نتایج به دست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان واکنش، هیدرولیز آنزیمی با یک فاز سریع آغاز می‌شود و در این مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود. همچنین، افزایش زمان فرآیند موجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد (۳۲). درجه هیدرولیز معمولاً به عنوان شاخص مهمی بین هیدرولیزهای مختلف پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرد زیرا می‌توان از آن برای تعیین تأثیری که بر خصوصیات عملکردی پپتیدها دارد استفاده کرد. به عنوان مثال، درجه هیدرولیز بالاتر منجر به پپتیدهای کوچکتر می‌شود که می‌توانند یک فعالیت بیولوژیکی مانند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

داشته باشند (۲۹). درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است. آلکالاز توانایی تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم را دارا می‌باشد (۲۸). هیدرولیز آنزیمی در پروتئین‌ها سبب ایجاد پپتیدهای با خواص عملکردی خاص می‌گردد. تأثیر زنجیره جانبی گروه فعال R آنها می‌تواند با در دسترس قرار گرفتن هرچه بیشتر گروه در آمینواسیدها مرتبط باشد. آنزیم‌های متفاوت بسیاری همانند پپسین، کیموتریپسین، آلکالاز، فلاورزایم و... برای هیدرولیز پروتئین‌های مختلف گیاهی و حیوانی مورد استفاده قرار گرفته است. نوع آنزیم‌های مصرفی بر نوع پپتیدهای تولیدی و خواص عملکردی آنها تأثیرگذار می‌باشد. همچنین نوع آنزیم استفاده شده در هیدرولیز پروتئینها نقش بسیار مهمی در تولید پپتیدهای زیست فعال ایفا می‌کنند، زیرا بر الگوی هیدرولیز پروتئین به طور مستقیم، تأثیرگذار هستند. فعالیت اختصاصی آنزیم‌ها، بر سایز، مقدار و ترکیب آمینواسیدها در توالی‌های پپتیدی تولید شده و بنابراین بر فعالیت زیستی آن موثر است (۱۱).

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

| فلاورزایم             | آلکالاز               | آنزیم                 |  |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
|                       |                       | زمان هیدرولیز (دقیقه) |  |
| $8/24 \pm 0/44^{Bc}$  | $17/17 \pm 0/73^{Ac}$ | ۱۰                    |  |
| $13/23 \pm 0/16^{Bb}$ | $26/06 \pm 0/46^{Ab}$ | ۲۰                    |  |
| $17/98 \pm 0/92^{Ba}$ | $31/90 \pm 0/79^{Aa}$ | 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, ...)

می‌باشد که دارای منشاء میکروبی بوده و به همین جهت، خواص مناسب پروتئازی را از خود نشان می‌دهد (۲۰). با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر باز یافت پروتئینی به طور معنی داری افزایش یافت. نتایج تحقیق حاکی از ارتباط و ضریب همبستگی بین باز یافت پروتئینی و درجه هیدرولیز بوده به گونه‌ای که با افزایش درجه هیدرولیز، میزان باز یافت پروتئینی افزایش پیدا می‌کند.

باز یافت پروتئین یکی 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 غیر محلول 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 که باز یافت پروتئینی (جدول ۳) توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است. آنزیم آلکالاز یک آنزیم پروتئاز قلیایی Endoproteinase

جدول ۳- مقادیر باز یافت پروتئینی پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

| فلاورزایم             | آلکالاز               | آنزیم                 |  |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|--|
|                       |                       | زمان هیدرولیز (دقیقه) |  |
| $10/44 \pm 0/25^{Bc}$ | $12/57 \pm 0/22^{Ac}$ | ۱۰                    |  |
| $12/97 \pm 0/18^{Bb}$ | $15/38 \pm 0/20^{Ab}$ | ۲۰                    |  |
| $16/84 \pm 1/97^{Ba}$ | $18/74 \pm 0/27^{Aa}$ | 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

مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (HAA) (جدول ۴) برابر با ۴۰/۹۷ و ۳۷/۶۰ برای آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب بوده است. عملکرد هرپپتید بیشتر به ترکیب اسید آمینه آن بستگی دارد به عنوان مثال، HAA به شدت دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. به ویژه به دلیل تجزیه حلقه ایمیدازول آن، فعالیت شدید مهار رادیکال شناخته می‌شود (۲). بنابراین، می‌توان ادعا کرد که پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز به دلیل وجود مقادیر بالاتر HAA ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند. به طور کلی، تفاوت در ماده خام، نوع آنزیم مورد استفاده و شرایط هیدرولیز می‌باشد در ترکیب اسید آمینه موثر است (۲۶).

Liao و همکاران (۲۰۲۰) اعلام نمودند مجموع اسیدهای آمینه آبگریز پروتئین هیدرولیز شده قارچ (*Pleurotus geesteranus*) توسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب ۴۰/۶۶ و ۳۰/۹۶ درصد بوده است (۱۸). در مجموع، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم آسپارتیک اسید ۱۸/۹۹، ۱۷/۵۸ درصد و بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای آنزیم‌های مذکور، لوسین ۷/۷۸ و ۷/۱۲ درصد (به ترتیب) بوده است. Purwin و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای پروتئین شیدر قرمز را لوسین (۵/۳۵ درصد)، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری را

آسپارتیک اسید (۱۲/۰۸ درصد) اعلام نمودند (۲۵). Penkov و همکاران (۲۰۰۳) بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای پروتئین گونه‌های مختلف شیدر را لوسین (ما بین ۶/۸۹-۷/۷۸ درصد)، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری را آسپارتیک اسید (ما بین ۱۳/۲۳-۱۹۵/۴۵ درصد) اعلام نمودند. مطابق مطالعات مقادیر اسید آمینه برای گونه‌های شیدر متفاوت می‌باشد اما در تمامی گونه‌های مذکور بالاترین مقادیر اسید آمینه مربوط به آسپارتیک اسید بوده است (۲۳). با توجه به (FAO/WHO (1990) نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه‌ها نباید کمتر از ۴۰ درصد باشد و همچنین میزان اسید آمینه ضروری به غیر ضروری نباید کمتر از ۰/۶ باشد. با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیز شده از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب برابر با ۰/۷۴ و ۰/۷۵ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه موجود به ترتیب برابر با ۴۸/۵۴ و ۴۸/۳۰ است (۷). همچنین مقادیر ترئونین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، هیستیدین و لایزین در هر دو پروتئین هیدرولیز شده نیز بالاتر از توصیه‌های (FAO/WHO (1990) در مورد پروتئین‌های حیوانی بوده است، تنها در ارتباط با فنیل آلانین دارای محدودیت بوده است که تمامی این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین جوانه شیدر از کیفیت غذایی بالایی برخوردار هستند و ممکن است به عنوان یک منبع پروتئین در رژیم غذایی انسانی و حیوانی مورد استفاده قرار گیرند (۷).

جدول ۴- ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

| FAO/ WHO,<br>1990 | فلاورزایم | آلکالاز | اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)             |
|-------------------|-----------|---------|---|
|                   | ۲/۹۵      | ۲/۲۵    | هیستدین <sup>۱</sup>                          |
| ۲/۸۰              | ۳/۱۵      | ۳/۹۷    | ایزولوسین <sup>۱۲</sup>                       |
| ۶/۶۰              | ۷/۱۲      | ۷/۷۸    | لوسین <sup>۱۲</sup>                           |
| ۵/۸۰              | ۶/۸۲      | ۵/۹۶    | لایزین <sup>۱</sup>                           |
|                   | ۰/۳۲      | ۰/۴۵    | متیونین <sup>۱۲</sup>                         |
| ۶/۳۰              | ۴/۵۵      | ۵/۴۵    | فنیل آلانین <sup>۱۲</sup>                     |
| ۳/۴               | ۷/۳۵      | ۶/۵۵    | ترونتین <sup>۱۲</sup>                         |
| ۳/۵               | ۵/۰۹      | ۵/۲۵    | والین <sup>۱</sup>                            |
|                   | ۵/۴۵      | ۴/۵۹    | آرژنین <sup>۱</sup>                           |
|                   | ۱۷/۵۸     | ۱۸/۹۹   | آسپارتیک اسید                                 |
|                   | ۸/۵۸      | ۷/۹۸    | پرولین <sup>۲</sup>                           |
|                   | ۵/۷۸      | ۴/۹۹    | سرین  |
|                   | ۵/۳۹      | ۵/۸۵    | آلانین <sup>۲</sup>                           |
|                   | ۰/۵۹      | ۰/۳۵    | سیستین  |
|                   | ۹/۹۵      | ۱۰/۵۹   | گلوتامیک اسید                                 |
| ۱/۱               | ۳/۴۰      | ۳/۹۷    | تیروزین <sup>۲</sup>                          |
|                   | ۵/۱۳      | ۴/۹۶۸   | گلايسين                                       |
|                   | ۴۳/۱۵     | ۴۲/۵۵   | نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه        |
|                   | ۰/۷۵      | ۰/۷۴    | نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیر ضروری |
|                   | ۹۹/۲۰     | ۹۹/۹۲   | میزان اسید آمینه کل                           |
|                   | ۳۷/۶۰     | ۴۰/۹۷   | <sup>۲</sup> HAA                              |

<sup>۱</sup> اسید آمینه ضروری

<sup>۲</sup> مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تربیتوفان، پرولین، متیونین و سیستین)

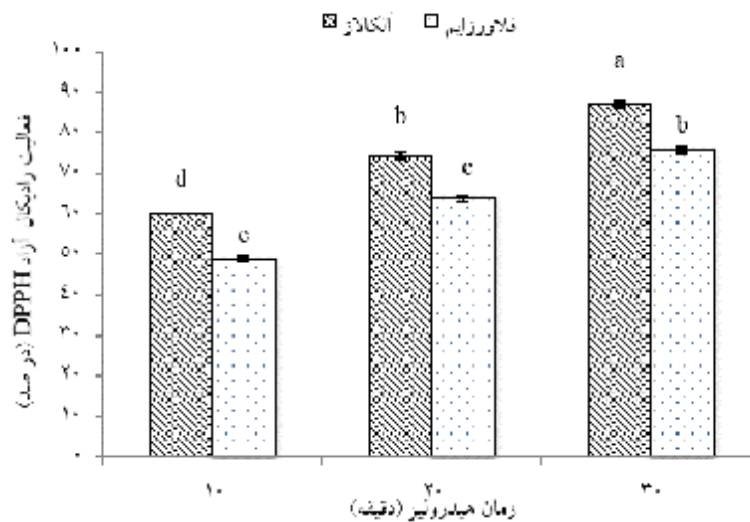


## ۳-۴- خاصیت آنتی‌اکسیدانی

## ۳-۴-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای حداکثر جذب می‌باشد، زمانی که این رادیکال آزاد با یک ترکیب اهدا کننده پروتون مواجه می‌شود، مهار شده و میزان جذب آن کاهش می‌یابد و این میزان کاهش به‌عنوان مقیاسی برای اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد می‌باشد (۸). با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPH دارا بودند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH (شکل ۱) افزایش یافت. به طوری که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها ارتباط نزدیکی با ترکیب اسید آمینه، ساختار و وزن مولکولی دارد (۲۹). همان طور که در ارتباط با نتایج اسید آمینه مشاهده شد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاترین سطح اسیدهای

آبگریز (HAA)، از جمله آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستین دارا بود که می‌تواند از طریق اسیدهای آمینه آبگریز با رادیکال آزاد تعامل داشته باشد و در نتیجه مجاورت رادیکال‌های آزاد را به گروه‌های عاملی فعال افزایش می‌دهد (۱۸). همچنین در مورد اثر زمان فرآیند و در نتیجه درجه هیدرولیز، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز و رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌گردد (۱۹). دارا بودن توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی نظیر کلزا (He et al, 2013)، بذر هویج (Ye et al, 2018)، گز روغنی (Moringa oleifera) (Aderinola et al, 2018)، دانه کینوا (Mahdavi-Yekta et al, 2019) و گیاه آشلاتنوس (Amaranthus cruentus) (Ramkisson et al, 2020)، نیز اعلام شد (۱، ۱۰، ۱۹، ۲۷، ۳۱).



شکل ۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

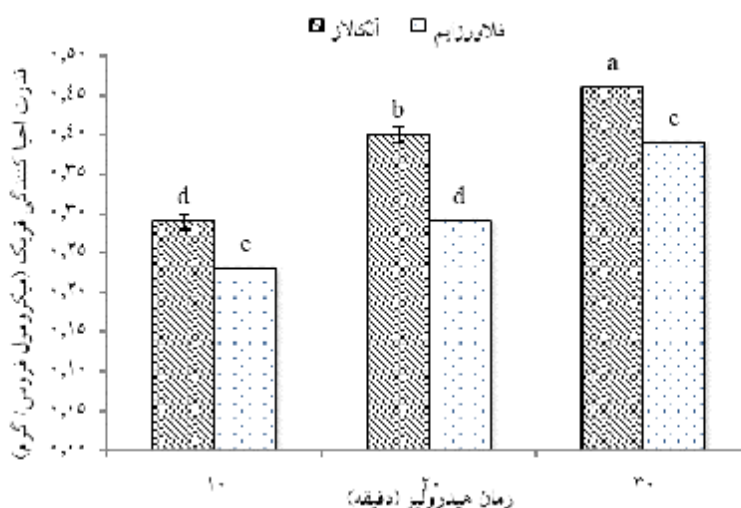
احیاکنندگی یون آهن (شکل ۲) پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. گروه‌های ایندول، فنولی و تیروزین نقش مهمی در اهدای هیدروژن در یک سیستم اکسیداسیون دارند. به طور کلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز پروتئین

## ۳-۴-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

روش سنجش قدرت احیای آهن پتانسیل اهدای الکترون یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی مانند پپتیدها را ارزیابی می‌کند که در نتیجه  $Fe^{3+}$  به یون  $Fe^{2+}$  کاهش می‌یابد (۳۰). قدرت

با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر قدرت احیای آهن افزایش یافت و آنزیم آلکالاز دارای قدرت احیای آهن بالاتری نسبت به آنزیم فلاورزایم بود (۲۸). Liao و همکاران (۲۰۲۰) نیز اعلام نمودند قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده قارچ (*Pleurotus geesteranus*) توسط آنزیم‌های آلکالاز بالاتر از آنزیم فلاورزایم بوده است، آن‌ها نیز علت این امر را بالاتر بودن اسیدهای آمینه آبگریز توسط آنزیم آلکالاز اعلام نمودند (۱۸).

معمولاً با ترکیب، دنباله و آبگریزی اسیدهای آمینه همراه است که افزایش قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز ممکن است به دلیل مطالب بیان شده باشد (۲۴). همچنین با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد (۲۸). نتایج مشابهی توسط Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده هسته انگور مشاهده شد آن‌ها نیز اعلام نمودند

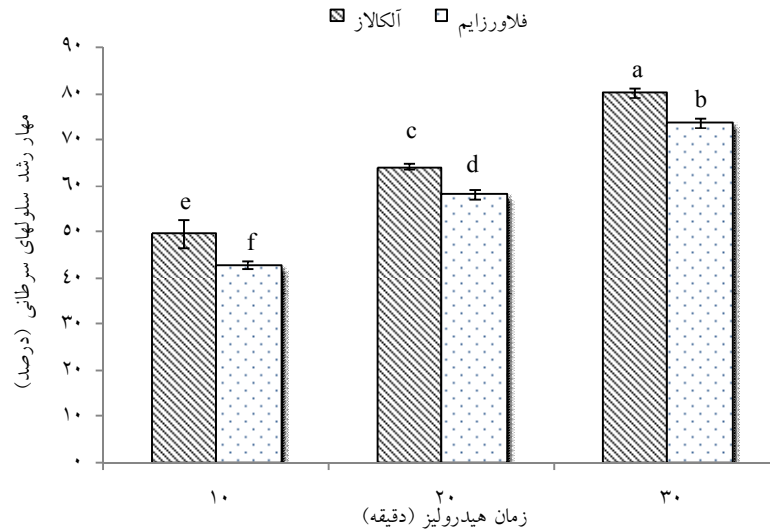


شکل ۲- مقادیر قدرت احیاکنندگی آهن

### ۳-۵- فعالیت ضد سرطانی

آندوپیتیداز برش دهد و برخی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی با اندازه کوچک و متوسط تولید کند (۳۴). دارا بودن خاصیت ضد سرطانی در پروتئین هیدرولیز شده سایر پروتئین‌های گیاهی نظیر پروتئین ذرت (Li et al, 2013)، گردو (Jahanbani et al, 2016) و گیاه آشلاتنوس (*Amaranthus cruentus*) (Ramkisson et al, 2020) نیز اعلام شد (۱۲)، (۱۶، ۲۷). با افزایش زمان هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد، Kim (۲۰۱۱) گزارش داد که پپتیدهای با طول زنجیره پپتیدی کوتاهتر دارای تحرک بیشتر وزن مولکولی و تعامل بیشتر با اجزای موجود در سلول سرطانی هستند که نتیجه آن فعالیت ضد سرطان بیشتری است (۱۵).

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 (۳). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت ضد سرطانی افزایش یافت. به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت ضد سرطانی را دارا بود (۷۸/۷۱ درصد). گزارش شده است که آلکالاز می‌تواند پیوندهای پپتیدی را در قسمت داخلی زنجیره به عنوان یک



شکل ۳- مقادیر فعالیت ضدسرطانی علیه سلول‌های سرطان کولون

#### ۵- منابع

1. Aderinola T, Fagbemi T, Enujiugha V, Monisola Alashi A, Emmanuel Aluko R. Amino acid composition and antioxidant properties of *Moringa oleifera* seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Heliyon*. 2018; 4 (10):e00877.
2. Alashi A. M, Blanchard C. L, Mailer R. J, Agboola S. O, Mawson A.J, Rong H, Malomo S. A, Girgih A.T, Aluko R. E. Blood pressure lowering effects of Australian canola protein hydrolysates in spontaneously hypertensive rats. *Food Research International*. 2014; 55: 281–287.
3. Alemán A, Pérez- Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudin I, Gómez-Guillén M. C, Montero P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*. 2011; 44: 1044–1051.
4. Aondona M. 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.
5. Ates E. 2011. Influence of some hard seedednessbreaking treatments on

#### ۴- نتیجه‌گیری

پروتئین جوانه شبدر، که غنی از پروتئین‌های محلول در آب می‌باشد، از ویژگی‌های عملکردی مطلوبی برخوردار است که آن را تبدیل به ترکیبی سودمند برای استفاده در فرآورده‌های غذایی کرده است. با توجه به خواص تغذیه‌ای بی‌نظیر و اثرات سلامتی بخش پروتئین جوانه شبدر در کاهش کلسترول خون و بیماری‌های قلبی- عروقی، تولید پروتئین هیدرولیز شده از آن امری ضروری به نظر می‌رسد. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی پتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی جوانه شبدر بررسی شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و فلاورنایم، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز، بازیافت پروتئینی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدسرطانی بالاتری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر می‌تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور پیشنهاد شود و همچنین می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرد.

- Science and Technology*. 2011; 44:1135-1148.
14. Khatami M, Nejad M. S, Salari S, Almani P.G.N. 2016. Plant-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Trifolium resupinatum* seed exudate and their antifungal efficacy on *Neofusicoccum parvum* and *Rhizoctonia solani*. *IET Nanobiotech*. 2016; 10:237–243.
  15. Kim, S. M. Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). *Food Science and Biotechnology*. 2011; 20(4):1075–1085.
  16. Li J.T, Zhang, J. L, He H, Ma Z. L, Nie Z. K, Wang Z. Z, Xu X. G. Apoptosis in human hepatoma HepG2 cells induced by corn peptides and its anti-tumor efficacy in H22 tumor bearing mice. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 51: 297-305.
  17. Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*. 2008; 106(2): 444-450.
  18. Liao X, Zhu Z, Wu S, Chen M, Huang R., Wang J, Wu Q, Ding Y. Preparation of Antioxidant Protein Hydrolysates from *Pleurotus geesteranus* and Their Protective Effects on H2O2 Oxidative Damaged PC12 Cells. *Molecules*. 2020; 25: 54-69.
  19. Mahdavi-Yekta M, Nouri L, Azizi M. H. The effects of hydrolysis condition on antioxidant activity of protein hydrolyzate from quinoa. *Food Science & Nutrition*. 2019; 7:930–936.
  20. 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.
  21. Ngo D. H, Vo T. S, Ngo D. N, Wijesekara I, Kim S. K. Biological activities and potential health benefits of bioactive peptides derived from marine organisms. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2012; 51(4): 378-383.
  - germination in Persian clover (*Trifolium resupinatum* ssp. *typicum* Fiori Et Paol.) seeds. *Romanian Agricultural Research*. 2011; 28: 229-236.
  6. 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.
  7. 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.
  8. Gulcin, I. Antioxidants and antioxidant methods: An updated overview. *Archives of Toxicology*. 2020; 94(3): 651-715.
  9. Hamzeh A, Rezaei M, Khodabandeh S. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measurement*. 2019; 12: 721–727.
  10. He R. A, Alashi, S.A., Malomo, A.T., Girgih D, Chao X, Ju R.E, Aluko N. Antihypertensive and free radical scavenging properties of enzymatic rapeseed protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 2013; 141(1): 153-159.
  11. Irvani Mohajeri R, Mirzaei M, Ofoghi H. Effects of enzyme types and hydrolysis time on the production of antioxidant peptides from *Spirulina platensis*. *Innovative Food Technologies*. 2019; 6(4): 583-599.
  12. Jahanbani J, Ghaffari S, Salami M, Vahdati K, Sepehri H, Namazi Sarvestani N, Sheibani N, Moosavi-Movahedi A. Antioxidant and Anticancer Activities of Walnut (*Juglans regia* L.) Protein Hydrolysates Using Different Proteases. *Plant Foods for Human Nutrition*. 2016; 71: 402–409.
  13. Khantaphant S, Benjakul S. Ghomi M. R. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanusvitta*). *Journal of LWT- Food*

- hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Science & Nutrition*. 2021; 9: 2180–2190.
29. Wali A, Mijiti Y, Yanhua G. Isolation and Identification of a Novel Antioxidant Peptide from Chickpea (*Cicer arietinum* L.) Sprout Protein Hydrolysates. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2021; 27: 219–227.
  30. Yaghoobzadeh Z, Peyravii Ghadikolaii F, Kaboosi H, Safari R, Fattahi E. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*. 2020; 26: 625–632.
  31. Ye N, Hu P, Xu S, Chen M, Wang S, Hong J, Cai T. Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*. 2018; 3(6): 1–9.
  32. Yunhu Ch, Zhang W, Shiyang X. Antioxidant properties of wheat germ protein hydrolysates evaluated in vitro. *Journal of Central South University Technology* 2006; 13(2): 160–165.
  33. Zhang M, Mu T. H, Sun M. J. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*. 2014; 7: 191–200.
  34. Zhu K. X, Zhou H. M, Qian H. Antioxidant and free radical scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 2006; 41: 1296–1302.
  22. 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.
  23. Penkov D, Pavlov D, Mihovsky T. Comparative study of the amino acid's true digestibility of different clover (*Trifolium*) varieties in experiments with ganders. *Journal of Central European Agriculture*. 2003; 4: 191–198.
  24. Pezeshk S, Ojagh S, Rezaei M., Shabanpour B. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. *Journal of Genetic Resources*. 2017; 3(2): 103–112.
  25. Purwin C, Fijałkowska M, Lipiński K, Wierzbowska J, Kobzhasarov T. Z, Michalski J. Changes in amino acid composition during ensiling lucerne and red clover in round bales. *Journal of Trace Elements*. 2015; 20(4): 965–973.
  26. Rajabzadeh M, Pourashouri P, Shabanpour B, Alishahi A. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *International Journal of Food Science & Technology*. 2017; 53(2): 313–319.
  27. Ramkisson S, Depika D, Venter S, Mellem J. In vitro anticancer and antioxidant potential of *Amaranthus cruentus* protein and its hydrolysates. *Journal of Food Science and Technology*. 2020; 40(2): 634–639.
  28. Varedesara M. S, Ariaii P, Hesari J. The effect of grape seed protein

(Original Research Paper)

## The Effect of Hydrolysis Time and Enzyme Type on Antioxidant and Anti-cancer Activity of Hydrolyzed Clover Sprout Protein

Dina Mirsadeghi Darabi<sup>1</sup>, Peiman Ariayi<sup>2\*</sup>, Reza Safari<sup>3</sup>, Mohammad Ahmadi<sup>4</sup>

1-Ph.D student 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-Caspian Sea Ecology Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran.

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

Received:19/09/2021

Accepted:22/11/2021

DOI: [10.30495/jfst.2021.1940789.1756](https://doi.org/10.30495/jfst.2021.1940789.1756)

### Abstract

In this study, hydrolyzed clover sprout protein was produced using commercial enzymes of Alcalase and Flavourzyme at three different times (10, 20 and 30 minutes). The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase was higher than the proteins hydrolyzed by flavourzyme enzyme in terms of protein content, nitrogen recovery and degree of hydrolysis, as well as, increasing the hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ( $p < 0.05$ ). The combination of amino acids also showed that the proteins hydrolyzed with different enzymes have a relatively similar composition. In total, the highest levels of non-essential amino acids for alcalase and flavourzyme, aspartic acid were 18.99%, 17.58% (respectively) and the highest levels of essential amino acids for these enzymes were leucine 7.78% and 7.12%. (respectively). The protein hydrolyzed by the alcalase enzyme in 30 minutes had the highest antioxidant activity (DPPH free radical scavenging, ferric regenerative power) and anti-cancer properties against SW742 cells (colon cancer cells). In general, the results showed that hydrolysis of clover sprout protein by alcalase and flavourzyme enzymes produced antioxidant peptides and alcalase was a more effective enzyme than flavourzyme. Therefore, clover sprout protein seems to be used in food and in diet formulas as a safe source of food and rich in protein.

**Keywords:** Hydrolyzed Protein, Commercial Enzymes, Clover Sprout, DPPH Free Radical.

---

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