(مقاله پژوهشی)

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

دینا میرصادقی دارابی [۱]، پیمان آریایی [۲*]، رضا صفری [۳]، محمد احمدی [۴]

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

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

۳- پژوهشکده اکولوژی 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 ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۶/۲۸ تاریخ پذیرش:۱۴۰۰/۰۹/۰۱

DOI: 10.71810/jfst.2024.1004741

چکیده

در این‌مطالعه‌پروتئین‌هیدرولیزشده جوانه شبدر با استفاده از آنزیم‌های تجاری آلکالاز و فلاورزایم و در سه زمان مختلف (۱۰، ۲۰ و۳۰ دقیقه)، تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیزشده توسط آلکالاز از میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم برخوردار بود. همچنین افزایش زمان هیدرولیز، تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p<۰/۰۵$). ترکیب اسیدهای‌آمینه نیز نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف دارای ترکیب نسبتا مشابهی هستند. در مجموع، بالاترین مقادیر اسیدآمینه غیرضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم آسپارتیک اسید ۱۸/۹۹، ۱۷/۵۸درصد (به ترتیب) و بالاترین مقادیر اسیدآمینه ضروری برای آنزیم‌های مذکور، لوسین ۷/۷۸ و ۷/۱۲درصد (به ترتیب)بوده است. پروتئین هیدرولیزشده تولیدی‌توسط‌آنزیم‌آلکالاز درزمان۳۰دقیقه، بیشترین‌فعالیت‌آنتی اکسیدانی (خنثی‌سازی رادیکال‌آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی فریک) و خاصیت ضد سرطانی علیه سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) را دارا بود. به طورکلی نتایج نشان دادند که هیدرولیز پروتئین جوانه شبدر به وسیله آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم باعث تولید پپتیدهای‌آنتی‌اکسیدانی می‌شود وآنزیم‌آلکالاز، 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 هیدرولیزشده، آنزیم‌های تجاری، جوانه شبدر، رادیکال آزاد DPPH.

* مسئول مکاتبات:p.aryaye@yahoo.com

۱- مقدمه

شبدر ایرانی(*Trifolium resupinatum* L.) یک گیاه یک ساله علوفه‌ای است که در شرایط نیمه خشک مناطق مدیترانه‌ای رشد می‌کند. پروتئین جوانه شبدر، که غنی از پروتئین‌های‌محلول در آب و محلول در آب نمک می‌باشد، از ویژگی‌های عملکردی مطلوبی برخوردار است که آن را تبدیل‌به‌ترکیبی‌سودمندبرای استفاده در فرآورده‌های غذایی کرده است. فعالیت امولسیفایری، توانایی حفظ آب بالا، کف‌کنندگی وحلالیت بالا، از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند (۵، ۱۴). جوانه شبدر 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 این‌که جوانه شبدر 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 فرمولاسیون‌موادغذایی، به‌کار برد (۵، ۳۳). هدف از هرگونه واکنش هیدرولیز بر روی پروتئین‌ها جداسازی اسیدهای آمینه از ماده اولیه وبازیابی‌کمی این ترکیبات در طی فرآیند می‌باشد. انتخاب روش مناسب جهت هیدرولیز به نوع آنالیز نهانی‌محصول بستگی دارد. هیدرولیز می‌تواند به صورت شیمیایی‌که شامل واکنش‌های اسیدی و قلیایی می‌باشد، انجام شود و یا توسط آنزیم صورت گیرد. در مقایسه با تیمارهای شیمیایی، معمولا 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 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 آنزیم‌هایی‌گفته‌می‌شود 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 ارگانیسم‌ها و نقش‌شان درسیرتکاملی‌دشوارنیست.پیچیدگی‌های‌تکاملی‌ارگانیسم‌های زنده دامنه گسترده‌ای از پروتئازها با عملکردهای متنوع را به وجود آورده که توجه بسیاری از دانشمندان را به خود جلب کرده‌است.گرچه‌واضح‌ترین‌مشخصه‌پروتئازهانوع‌عملکردشان روی سوبسترا است اما گاهی به دلیل پیچیدگی‌هایشان کاملا 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 برانتهای‌زنجیره اثرمی‌کنند.مهمترین آنزیم‌های که طی‌تحقیقات‌مختلف مورد استفاده قرارگرفته است شامل آنزیم‌آلکلاز (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 پروتئین‌هیدرولیزشده و با توجه به اینکه در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر تا بحال مطالعه‌ای در ایران انجام نشده است، هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیزآنزیمی‌جوانه‌شبدرتوسط آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی این پپتیدها می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

جوانه‌شبدربانام تجاری راوک (تولیدات کشاورزی سرچین، ایران) ازفروشگاه‌زنجیره‌ای‌آرین‌خریداری‌شد.آنزیم آلکالاز (استخراج‌شده از*Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم (استخراج‌شده از*Aspergillus oryzae*)ازشرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت۴

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

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

۲-۲-۱-آماده سازی ایزوله پروتئین از جوانه شبدر

جوانه شبدر پس از تمیز شدن به مدت ۸ ساعت توسط n-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-هیدرولیزایزوله‌پروتئینی حاصل از جوانه شبدر

۵۰گرم‌نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیترآب 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 pHبهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، فلاورزایم۷)، رسانده شد.نمونه‌هادرحمام‌آبی‌متحرک‌دردمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیزشده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس‌آنزیم (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 واکنش‌آنزیمی در حمام‌آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد 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 خشک‌کن انجمادی(مدلOperonFDB-550، ساخت کشورکره) 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 ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق رابطه ۱ محاسبه گردید (۲۰):

رابطه (۱)

(میزان پروتئین‌حل‌شده در محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰درصد / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-۴- 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 T80ساخت‌کشورانگلستان‌قرائت‌شد.میزان بازیافت پروتئینی از از طریق رابطه ۲ محاسبه گردید (۲۲).

رابطه(۲)

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

۲-۵- ترکیب اسیدآمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC)عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای‌آمینه‌کل‌با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line(آلمان)با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۹).

۲-۶-اندازه‌گیری‌فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین‌هیدرولیز شده

۲-۶-۱- 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 و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و

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

رابطه(۳)

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

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

این آزمون‌مطابق‌روش Bougatef 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- خصوصیات ضدسرطانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۷-۱-کشت سلولی

سلول‌های SW742 (سلول‌های سرطان کولون) از انستیتو پاستورایران- تهران تهیه گردید، سپس در محیط DMEM[1] به همراه ۵ درصد سرم‌جنین‌گوساله (FCS[2]) پنی‌سیلین ۱۰۰ واحد برمیلی‌لیتر و استرپتومایسین ۱۰۰ میکروگرم‌بر میلی‌لیتر کشت گردید. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد و دررطوبت ۹۰ درصدو CO_2 ۵۶ درصد قرارگرفت. سلول های نرمال L929 (Mouse C34/An connective tissue) درFCS ۱۰ درصد قرارگرفت. بعد از ۲۴، ۴۸ و۷۲ ساعت سلول‌ها در معرض پروتئین هیدرولیز شده قرار گرفت. زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT (۵، ۴، ۳ دی متیل تیازول۲ یل ۵، ۲ دی فنیل تترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. به طور خلاصه سلول‌ها به تعداد ۵ هزار در پلیت ۹۶ خانه‌ای قرارگرفت 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 (۵میلی‌گرم/ میلی‌لیتر دربافر فسفات سالین(PBS[3]) به مدت ۴ساعت قرار گرفت و پس از محلول سازی فرمازان (تبدیل رنگ به بنفش ارغوانی) توسط ۱۰۰ میکرولیتر DMSO[4] جذب نوری در۵۷۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتوفتومتر خوانده شد (۱۲).

۲-۸- تجزیه و تحلیل‌آماری

کلیه‌آزمایش‌هادرطرح‌آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید. آنالیزآماری 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 ۱/۰۴±۳۰/۸۱ درصد ومیزان‌پروتئین اولیه ایزوله جوانه شبدر برابر با ۱/۲۰±۴۸/۶۳ درصد بوده است. همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف (جدول۱) مابین ۵۰/۸۵- ۹۱/۲۴ درصد بوده است. بر اساس نتایج، پروتئین در ایزوله و پروتئین هیدرولیزشده از میزان بالایی‌برخوردارمی باشد، که می‌تواند به عنوان ارزش افزوده در توسعه محصول غذایی استفاده شود یا می‌تواند برای افزایش سطح پروتئین در فرمولاسیون موادغذایی 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).

1-Dulbecco's Modified Eagle Medium
2-Fetal Calf Serom
3-Phosphate Buffered Saline
4-Dimethyl SulfoXid

جدول۱- مقادیر پروتئین، پروتئین‌های هیدرولیزشده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

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

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,..)

۳-۲- بررسی‌مقادیردرجه 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، نوع‌آنزیم‌وزمان‌هیدرولیزمتفاوت است. به‌طوری که با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر درجه هیدرولیز به طور معنی‌داری 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 تاثیری که بر خصوصیات عملکردی پپتیدها دارد استفاده کرد. به عنوان مثال، درجه هیدرولیز بالاتر منجر به پپتیدهای کوچکتر می‌شود که می‌توانندیک‌فعالیت بیولوژیکی مانند ظرفیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشند (۲۹). درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است. آلکالازتوانایی‌تولید 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. تاثیر زنجیره جانبی گروه فعال R آنها می‌تواند با در دسترس قرارگرفتن هرچه بیشتر گروه در آمینواسیدها مرتبط باشد. آنزیم‌های متفاوت بسیاری همانند پپسین، کیموتریپسین، آلکالاز، فلاورزایم و...برای هیدرولیز پروتئین‌های مختلف گیاهی و حیوانی‌مورداستفاده قرارگرفته است. نوع آنزیم‌های مصرفی بر نوع‌پپتیدهای تولیدی و خواص عملکردی‌آن‌ها تاثیرگذار می‌باشد.همچنین‌نوع‌آنزیم‌استفاده‌شده در هیدرولیز پروتئینها نقش بسیار مهمی در تولید پپتیدهای زیست فعال ایفا می‌کنند، زیرا بر الگوی هیدرولیز پروتئین به طور مستقیم، تاثیرگذار هستند. فعالیت اختصاصی‌آنزیم‌ها، بر سایز، مقدار و ترکیب‌آمینواسیدها در توالی‌های پپتیدی تولید شده و بنابراین بر فعالیت زیستی آن موثر است (۱۱).

جدول۲- مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

زمان هیدرولیز (دقیقه) / آنزیم	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	۱۷/۱۷±۰/۷۳^{Ac}	۸/۲۴±۰/۴۴^{Bc}
۲۰	۲۶/۰۶±۰/۴۶^{Ab}	۱۳/۲۳±۰/۱۶^{Bb}
۳۰	۳۱/۹۰±۰/۷۹^{Aa}	۱۷/۹۸±۰/۹۲^{Ba}

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,..)

بازیافت پروتئین یکی از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود، که بیان‌کننده 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 بازیافت پروتئینی (جدول۳) توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است.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(۲۰). با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر بازیافت پروتئینی به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. نتایج تحقیق حاکی از ارتباط و ضریب همبستگی بین بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز بوده به گونه‌ای که با افزایش درجه هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی افزایش پیدا می کند.

جدول۳- مقادیر بازیافت پروتئینی پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

زمان هیدرولیز (دقیقه) / آنزیم	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	۱۲/۵۷±۰/۲۲^{Ac}	۱۰/۴۴±۰/۲۵^{Bc}
۲۰	۱۵/۳۸±۰/۲۰^{Ab}	۱۲/۹۷±۰/۱۸^{Bb}
۳۰	۱۸/۷۴±۰/۲۷^{Aa}	۱۶/۸۴±۱/۹۷^{Ba}

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,..)

۳-۳- ترکیب اسید آمینه

مجموع اسیدهای‌آمینه‌آبگریز (HAA[1]) (جدول۴) برابر با ۴۰/۹۷ و۳۷/۶۰ برای آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب بوده است. عملکرد هرپپتید بیشتر به ترکیب اسیدآمینه آن بستگی داردبه‌عنوان‌مثال،HAAبه‌شدت‌دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. به ویژه به دلیل تجزیه حلقه ایمیدازول آن، فعالیت شدید مهار رادیکال شناخته می‌شود (۲). بنابراین، می‌توان ادعا کرد که پروتئین‌های‌هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز به دلیل وجودمقادیر بالاتر HAA ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند. به طورکلی، 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 فلاورزایم‌آسپارتیک‌اسید ۱۸/۹۹، ۱۷/۵۸درصد و بالاترین مقادیراسیدآمینه ضروری برای و بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری‌برای آنزیم‌های مذکور، لوسین ۷/۷۸ و ۷/۱۲درصد (به‌ترتیب) بوده است. Purwin و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین مقادیر اسیدآمینه ضروری برای پروتئین شبدر قرمز را لوسین (۵/۳۵ درصد)، بالاترین مقادیر اسیدآمینه غیر ضروری را آسپارتیک‌اسید(۱۲/۰۸درصد)اعلام‌نمودند (۲۵). Penkov و همکاران (۲۰۰۳) بالاترین مقادیر اسیدآمینه ضروری برای پروتئین گونه‌های‌مختلف شبدر را لوسین(ما بین ۶/۸۹- ۷/۷۸ درصد)، بالاترین‌مقادیراسیدآمینه غیر ضروری را آسپارتیک اسید (ما بین ۱۳/۲۳- ۱۹۵/۴۵درصد) اعلام نمودند. مطابق مطالعات مقادیر اسیدآمینه برای گونه‌های شبدر 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 اسیدآمینه ضروری به کل اسید آمینه‌ها نباید کمتر از ۴۰ درصد باشد و همچنین میزان اسیدآمینه ضروری به غیر ضروری نباید کمتر از ۰/۶ باشد. با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیز شده از ترکیب اسیدآمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسیدآمینه 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 لایزین‌درهردوپروتئین هیدرولیزشده 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 شبدر 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).

1- Hydrophobic Amino Acids

جدول۴-ترکیب اسیدآمینه موجود در پروتئین هیدرولیزشده

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

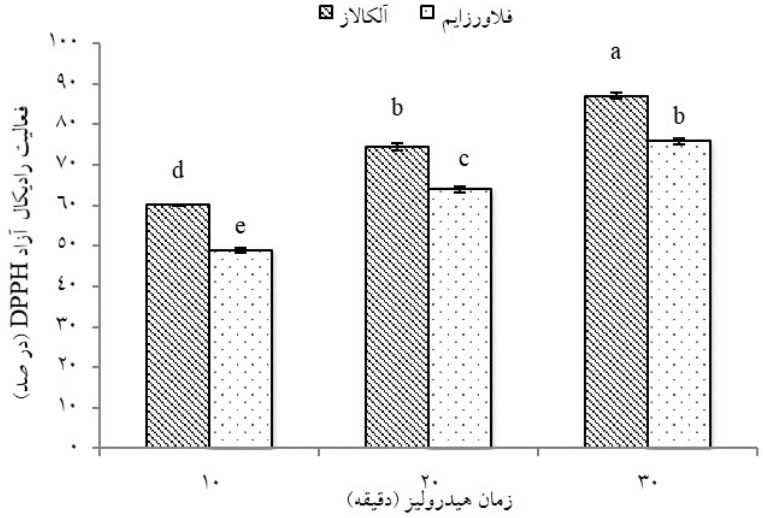
[۱]اسیدآمینه ضروری

[۲]مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۳-۴- خاصیت آنتی اکسیدانی

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 کننده‌ی پروتون مواجه می‌شود، مهار شده و میزان جذب آن کاهش می‌یابد و این میزان کاهش به‌عنوان مقیاسی برای اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌آزادمی‌باشد(۸).با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیزشده‌توانایی‌بالایی‌برای‌حذف‌رادیکال آزاد DPPH دارا بودند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیرفعالیت‌رادیکال‌آزاد DPPH (شکل ۱) افزایش یافت. به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز۳۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارا بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها ارتباط نزدیکی با ترکیب اسیدآمینه، 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 سیستئین دارابودکه می‌تواند از طریق اسیدهای‌آمینه‌آبگریز با رادیکال آزاد تعامل داشته باشد و در نتیجه مجاورت رادیکال‌های آزاد را به‌گروهای‌عاملی‌فعال افزایش می‌دهد (۱۸). همچنین در مورداثر 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 آنتی اکسیدانی نمونه‌ها می‌گردد (۱۹). دارا بودن توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز شده سایرپروتئین‌های‌گیاهی‌نظیرکلزا (He et al, 2013)، بذر هویج (Ye et al, 2018)، گز روغنی (Moringa oleifera)(Aderinola et al, 2018)، دانه کینوآ (Mahdavi-Yekta et al, 2019) وگیاه‌آشلانتوس (Amaranthus cruentus)(Ramkisson et al,2020)، نیز اعلام شد (۱، ۱۰، ۱۹، ۲۷، ۳۱).

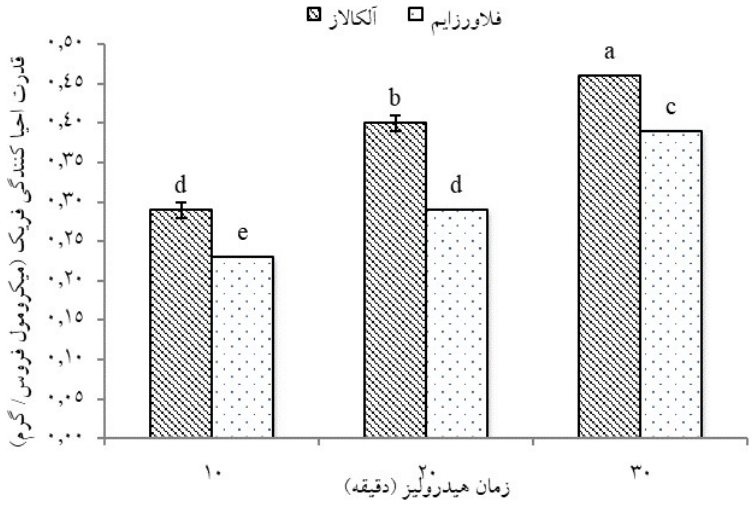


شکل۱- مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

۳-۴-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

روش‌سنجش‌قدرت احیای‌آهن پتانسیل اهدای الکترون یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی مانند پپتیدها را ارزیابی می‌کند که در نتیجه Fe^{3+} به یون Fe^{2+} کاهش‌می‌یابد (۳۰). قدرت احیاکنندگی‌یون‌آهن(شکل۲) پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم‌آلکالاز بالاتر بود. گروه‌های ایندول، فنولی و تیروزین نقش مهمی در اهدای هیدروژن در یک سیستم اکسیداسیون دارند. به طور کلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز پروتئین

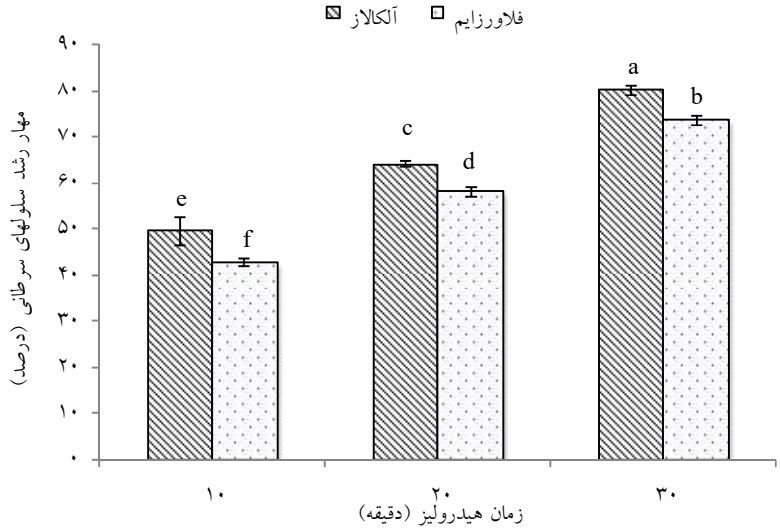
معمولاً با ترکیب، دنباله و آبگریزی اسیدهای آمینه همراه است که افزایش قدرت‌کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز ممکن است به دلیل مطالب بیان شده باشد (۲۴). همچنین با افزایش زمان هیدرولیز وکاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد (۲۸). نتایج مشابهی توسط Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) در ارتباط با پروتئین هیدرولیزشده هسته انگور مشاهده شد آن‌ها نیز اعلام نمودند 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 آنزیم‌های‌آلکالاز بالاتر ازآنزیم فلاورزایم بوده است، آن‌ها نیز علت این امر را بالاتر بودن اسیدهای آمینه آبگریز توسط آنزیم آلکالاز اعلام نمودند (۱۸).



شکل۲- مقادیرقدرت احیاکنندگی‌آهن

۳-۵- فعالیت ضد سرطانی

سرطان‌یکی 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 (۷۸/۷۱درصد). گزارش شده است که آلکالاز می تواند پیوندهای پپتیدی را در قسمت داخلی زنجیره به عنوان یک آندوپپتیداز برش دهد و برخی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی با اندازه‌کوچک 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)وگیاه‌آشلانتوس (*Amaranthus cruentus*) (Ramkisson et al, 2020) نیزاعلام شد(۱۲، ۱۶، ۲۷). با افزایش زمان هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی کاهش می یابد، 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).



شکل۳-مقادیر فعالیت ضدسرطانی علیه سلول‌های سرطان کولون

۴- نتیجه‌گیری

پروتئین جوانه شبدر، که غنی از پروتئین‌های محلول در آب می‌باشد، از ویژگی‌های عملکردی مطلوبی برخوردار است که‌آن‌راتبدیل‌به‌ترکیبی‌سودمندبرای استفاده در فرآورده‌های غذایی‌کرده است. با توجه به خواص تغذیه‌ای بی‌نظیر و اثرات‌سلامتی‌بخش‌پروتئین جوانه شبدر در کاهش کلسترول خون و بیماری‌های قلبی- عروقی، تولید پروتئین هیدرولیز شده از آن امری ضروری به نظرمی‌رسد. در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی جوانه شبدر 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، بازیافت پروتئینی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت ضدسرطانی بالاتری تولید کند و همچنین‌افزایش زمان‌هیدرولیزتأثیرمثبتی‌بر 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 لیپید ها مورد استفاده قرارگیرد.

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

germination in Persian clover (*Trifolium resupanatum* 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. Iravani 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. P*lant 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 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 Macromolecul*es. 2012; 51(4): 378-383.

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, Kobzhassarov 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 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. Yaghoubzadeh 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, Shiying 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 radicalscavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemisrty*. 2006; 41: 1296–1302.

(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[1], Peiman Ariayi[2]*, Reza Safari [3], Mohammad Ahmadi[4]

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: 10.71810/jfst.2024.1004741

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 spourt 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