



نانو ریزپوشانی پتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی جوانه شبدر و ارزیابی فعالیت عملکردی و آنتی اکسیدانی

پتیدها

سمین رشیدی^۱، پیمان آریایی^۱، مهرو اسماعیلی^۱، رویا باقری^۱

گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله امین، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۲/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۶

کلمات کلیدی:

پروتئین هیدرولیز شده،

جوانه شبدر،

خاصیت آنتی اکسیدانی،

خواص عملکردی،

نانولیپوزوم

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.157

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.141.11.9

* مسئول مکاتبات:

هیدرولیز آنزیمی یکی از روش های مورد استفاده برای بهبود ویژگی های کاربردی و تغذیه ای پروتئین های غذایی است. با توجه به تأثیری که پروتئین های هیدرولیز شده بر خواص عملکردی و سلامت بخشی مواد غذایی دارند، در این پژوهش با استفاده از آنزیم های پروتامکس و برومالین پروتئین به دست آمده از جوانه شبدر هیدرولیز و تأثیر این فرایند بر خواص آنتی اکسیدانی (مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH و ABTS) و ویژگی های عملکردی (حلالیت، کف کنندگی و امولسیون) آن ها بررسی شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده توسط نانولیپوزوم ریز پوشانی و ویژگی های آن بررسی شد. با توجه به نتایج، مجموع اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک برای آنزیم پروتامکس و برومالین به ترتیب ۴۰/۴۱ و ۳۷/۹۱، ۱۲/۳۵ و ۱۱/۴۶ بوده است. همچنین از میان آنزیم ها، آنزیم پروتامکس توانست پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون، محتوای پروتئینی، خاصیت آنتی اکسیدانی و عملکردی بالاتری تولید کند و افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی های مذکور داشت. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس و زمان ۶۰ دقیقه توسط نانولیپوزوم ریز پوشانی شد، نتایج مربوط به اندازه ذرات های حامل پتیدها برابر با $93/64 \pm 3/37$ نانومتر، پتانسیل زتا برابر با $-8/42 \pm 1/38$ میلی ولت و راندمان ریزپوشانی برابر با $68/73 \pm 2/37$ درصد بوده است. نتایج تحقیق حاضر نشان داد استفاده از نانو پروتئین، می تواند رویکردی مفید در جهت کاربرد مستقیم پتیدهای جوانه شبدر با قابلیت آنتی اکسیدانی در فراورده های غذایی باشد.

۱- مقدمه

در طول دو دهه گذشته، توجه خاصی به پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از پروتئین‌های مواد غذایی، معطوف شده است. پپتیدهای زیست‌فعال بخش‌های پروتئینی ویژه‌ای هستند که واجد ویژگی‌های بیولوژیک متعدد مانند خاصیت ضد اکسایشی، ضد میکروبی، ضد فشار خون، ضد لخته شدن خون، ضد سرطان و کنترل‌کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی بدن نیز می‌باشند [۱]. پپتیدهای زیست‌فعال معمولا با توالی پروتئین اصلی مطابقت دارند و به طور عمده با روشهای شیمیایی و فیزیکی تولید می‌گردند. از جمله روشهای شیمیایی میتوان به هیدرولیز قلیایی، اسیدی، آنزیم‌های پروتئولیتیک گیاهی، حیوانی و میکروبی اشاره نمود [۲]. در حال حاضر استفاده از پروتئین گیاهی (جوانه شبدر) به علت ارزش تغذیه‌ای بالا، اثرات مثبت در بافت و کاهش آب اندازی ماست و همچنین تاثیر مثبت آن بر بهبود رشد و زنده ماندن آغازگرهای ماست بویژه باکتری‌های پروبیوتیک در مدت نگهداری، اهمیت زیادی یافته است [۳، ۴]. شبدر ایرانی بانام علمی *Trifolium resupinatum* L. گیاهی است یک ساله و پاییزه که بومی آسیای صغیر و ایران است. اغلب مطالعات صورت گرفته در رابطه با اثرات درمانی شبدر بر خواص فیتواستروژنیک ایزوفلاون‌های آن تأکید دارند. علاوه بر اثرات استروژنیک، اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و ضدسرطانی گیاه شبدر در محیط برون سلولی، سلولی و مدل‌های جانوری نشان داده شده است [۵، ۶]. نظر به ارزش تغذیه‌ای بالا و ویژگی‌های عملکردی مناسب، متخصصان تغذیه، از جوانه شبدر به عنوان خزانه مغذی طبیعی و منبع زندگی بشر یاد می‌کنند [۷، ۸]. پروتئین جوانه شبدر، 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 مختلف، کرده است. فعالیت امولسیفایری، توانایی حفظ آب بالا، کف‌کنندگی و

حلالیت بالا، از جمله این ویژگی‌ها می‌باشند [۵، ۹]. پروتئین جوانه شبدر حاوی پروتئین‌های طبیعی با کیفیت و ضریب هضم بالا می‌باشد. دو اسید آمینه مهم در پروتئین جوانه شبدر، سیستئین و سیسئین می‌باشد که باعث خنثی‌سازی سموم در بدن شده، همچنین پیش‌ساز قوی‌ترین آنتی‌اکسیدان بدن یعنی گلوتاتیون می‌باشند [۱۰].

Mirsadeghi Darabi و همکاران (۲۰۲۲) به تولید پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، پرداختند، آنها اعلام نمودند، پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر از اسیدهای آمینه ضروری بالایی برخوردار بود، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون و خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی بالاتری تولید کند [۵].

از آنجاییکه پپتیدها ترکیبات بسیار فعالی هستند ممکن است در اثر برخورد با اکسیژن یا ماده غذایی اثرات سودمند خود را از دست بدهند. لذا استفاده از روش‌هایی برای محافظت از آن‌ها به منظور حصول بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضروری می‌باشد. ریزپوشانی این ترکیبات قبل از به کار بردن آنها در سیستم‌های غذایی و یا نوشیدنی راه کاری مناسب جهت برطرف کردن این محدودیت‌ها محسوب می‌شود. بعلاوه اخیرا بهبود فعالیت و اثر بخشی ترکیبات ضد میکروب نانومقیاس در مقایسه با حالت سنتی توجه بیشتر و بیشتری را به خود جلب کرده است [۱۱، ۱۲، ۱۳]. لیپوزوم‌ها سال‌های طولانی است که به عنوان سامانه‌های رهش دارو در بدن انسان کاربرد داشته و به دلیل دارا بودن قابلیت رهاسازی ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز در بازه زمانی به نسبت طولانی مورد توجه می‌باشند. لیپیدهای متداول مورد استفاده در تولید لیپوزوم فسفولیپیدها به ویژه فسفاتیدیل کولین (لسیتین) و فسفاتیدیل اتانول آمین می‌باشند [۱۴، ۱۵]. با داشتن ویژگی‌های ساختاری خاص، لیپوزوم‌ها قادر به درون‌پوشانی ترکیبات آب‌دوست در فاز آبی و ترکیبات آب‌گریز در بخش فسفولیپیدی دولایه‌ای خود هستند [۱۵].

مایع رویی با استفاده از اسید کلریدریک ۱ مولار pH آن به ۳ رسانده شد و پروتئین رسوب داده شده با سانتریفیوژ جداسازی شد در نهایت پروتئین حاصل در خشک کن انجمادی خشک گردید و تا زمان هیدرولیز در کیسه های پلاستیکی در فریزر و دمای ۱۸ درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۶].

۲-۳ هیدرولیز پروتئین جوانه شبدر

به منظور هیدرولیز پروتئین جوانه شبدر، پروتئین به نسبت ۴ درصد (وزنی-حجمی) در بافر فسفات ۷ (pH بهینه) برای آنزیم های برومالین و پروتامکس تهیه شد. هیدرولیز در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتی گراد، غلظت های آنزیم ۱ درصد و محدوده زمانی ۱۰ دقیقه تا ۱ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل V-8480، کره جنوبی) با ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. به منظور غیر فعال کردن فعالیت آنزیم مجدداً محلول پروتئین در حمام آب گرم با دمای ۸۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد. در مرحله بعد عمل سانتریفیوژ در نیروی گرانش دورانی ۱۰۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. به منظور تولید پودر پروتئین هیدرولیز شده مایع رویی حاصل در خشک کن انجمادی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد فشار ۴۰ میلی بار و زمان ۴۸ ساعت (مدل Operon FDB 5509، کره جنوبی) خشک و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۸].

۲-۳ درجه هیدولیزاسیون و طول زنجیره پپتیدی

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه گیری شد. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئین های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین های موجود در نمونه می باشد. 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

Tometri و همکاران (۲۰۲۰) اعلام نمودند ریز پوشانی ترکیبات زیست فعال با نانولیپوزوم، سبب بهبود ویژگی ها و حفظ خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی ترکیبات زیست فعال می شود [۱۵].

بنابراین و با توجه به غنی بودن جوانه شبدر از نظر ترکیب اسید آمینه در این تحقیق تلاش شده است تا از جوانه شبدر به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی استفاده شده و ویژگی های ضد اکسایش عملکردی و سلامت بخشی هیدرولیز شده های حاصل مورد مطالعه قرار گیرد و همچنین امکان تولید و ارزیابی نانولیپوزوم های حامل پپتیدهای زیست فعال برای غلبه بر چالش های موجود در مسیر استفاده از این ترکیبات ارزشمند در صنایع غذایی و دارویی، مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش

۲-۱ مواد اولیه

جوانه شبدر از شرکت جوانه آفتاب، ایران تهیه شد برای هیدرولیز آنزیمی شبدر از آنزیم های پروتامکس (گرفته شده از باکتری *Bacillus subtilis*) و برومالین (گرفته شده از میوه آناناس) استفاده شد. آنزیم ها و همچنین استاندارد اسیدهای آمینه از شرکت سیگما آلدریج، (آمریکا) خریداری شد. سرم آلبومین گاوی، معرف DPPH و ABTS، اسید آسکوربیک، اسید کلریدریک و اسید هیدروکلریک از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

۲-۲ استخراج پروتئین جوانه شبدر

به منظور تهیه ایزوله پروتئین، جوانه شبدر چربی زدایی شده به میزان ۱۰۰ گرم در آب مقطر به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) مخلوط و با استفاده از سود ۱ مولار pH، به آن ۱۱ رسانده شد. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و سرعت ۵۰۰ دور بر دقیقه همزده شد. عصاره قلیایی حاصل در نیروی گرانشی دورانی ۱۶۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از جمع آوری

اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق معادله ۱ محاسبه گردید [۱۹]:

معادله ۱:

$100 \times$ (میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد / میزان پروتئین در نمونه) = درجه هیدرولیز
برای اندازه‌گیری طول تقریبی پتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم های مختلف از روش Kristinsson and Rasco (۲۰۰۰) استفاده شد. این روش از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره به کمک معادله زیر استفاده گردید.

معادله ۲ درجه هیدرولیز $100 =$ طول زنجیره پتیدی

۲-۴ تعیین مقدار اسیدهای 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 [۲].

۲-۵ فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، 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 به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد [۲۰].

معادله ۳:

$100 \times$ (جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) =

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) استفاده محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات شد. ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و

به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگهداری شد پس از طی زمان مورد نظر رقیق سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷ در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق سازی شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰°C انکوبه شد پس از طی زمان مورد نظر جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد به منظور مقایسه نیز از غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با فرمول زیر محاسبه شد [۲۱].

معادله ۴

$100 \times$ (جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) =

درصد مهار رادیکال آزاد ABTS

۲-۶ اندازه‌گیری خصوصیات عملکردی هیدرولیزها

۲-۶-۱ حلالیت

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش Bera و Mukherjee (۱۹۸۹) انجام شد. یک گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آب مخلوط کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۲-۱۰ تنظیم کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط شد. به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ دور دقیقه، سانتریفیوژ انجام شده و محتوای نیترژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۵) محاسبه شد [۲۲].

معادله ۵:

$100 \times$ (گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد

محلول در سوپرناتانت) = اندیس حلالیت در آب

۲-۶-۲ ظرفیت و پایداری امولسیون‌کنندگی

به ۳ گرم نمونه، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با همزنایزر (APU500b، دیکوفنور، ایران) هم‌زنی‌زده شد. سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله آزمایش تقسیم گردید و با

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۱، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد [۲۴]. (معادله ۹)

معادله ۹:

۱۰۰ × (حجم کف بلافاصله پس از زده شدن / حجم کف پس از ۶۰ دقیقه) = پایداری کف
پس از انجام آزمون‌های فوق تیمار برتر به منظور آزمون‌های بعدی استفاده شد.

۲-۷ تهیه پیتید ریز پوشانی شده

۲-۷-۱ بارگیری پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر در نانولیپوزوم‌ها

لیپوزوم با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک و بر اساس روش تشریح شده توسط Liu و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات تولید گردید [۲۵]. فرآیند تولید لیپوزوم شامل انحلال لیستین سویا و کلسترول به نسبت ۹ به ۱ در ۱۰ ml اتانول مطلق بود. فرآیند تبخیر و تشکیل فیلم نازک در انتهای بالن ته گرد با استفاده از اواپراتور چرخان با دور ۶۰ rpm در دمای ۶۰ انجام گرفت بالن مدور برای اطمینان از حذف کامل حلال به مدت ۱۲ تا ۱۸ ساعت در دسیکاتور و در دمای محیط نگهداری شد سپس فیلم لیپیدی خشک شده با با فرسفات نمکی (۷,۴ pH) به مدت ۱ دقیقه با استفاده از ورتکس مجدداً هیدراته گردید. سپس ۱۰ mg/ml پروتئین هیدرولیز شده به محلول حاصل افزوده و با استفاده از روتاری در دمای ۶۰ °C به مدت ۲ دقیقه هم زده و به مدت ۲ دقیقه در دمای محیط هم زده و خنک شد. فرآیند همزدن در ۳ مرتبه تکرار گردید. نهایتاً محلول حاصل برای ۱۰ مرحله و در هر مرحله به مدت ۱ دقیقه به صورت متناوب تحت پروب فراصوت توان ۷۰ و سیکل ۵/۰ قرار

سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ (به‌داده، ایران) شد ظرفیت امولسیون کنندگی طبق معادله (۶) زیر گزارش شد [۲۳].

معادله ۶:

حجم کل / حجم قسمت امولسیفیه شده = ظرفیت امولسیون کنندگی (%)

۱۰ میلی‌لیتر روغن گیاهی کلزا با ۳۰ میلی‌لیتر محلول پروتئینی ۱ درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰ rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد. سپس با میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های صفر و ده دقیقه انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد [۲۳].

معادله ۷:

زمان صفر - زمان ۱۰ دقیقه / زمان صفر × زمان ۱۰ دقیقه = پایداری امولسیون کنندگی (%)

۲-۶-۳ اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری کف کنندگی

برای اندازه‌گیری ظرفیت کف کنندگی ۲۰ میلی‌لیتر محلول‌های پروتئینی با pH ۵-۸ تهیه شد و در استوانه مدرج ۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف کنندگی در نظر گرفته شد (معادله ۸) [۲۴].

معادله ۸:

حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف - حجم نمونه قبل تشکیل کف = ظرفیت کف کنندگی (%)

نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مقادیر پروتئین در تیمارهای مختلف

میزان پروتئین جوانه شبدر و ایزوله جوانه شبدر به ترتیب برابر با $31/17 \pm 1/23$ درصد و $47/38 \pm 1/10$ درصد بوده است و مقادیر پروتئین (جدول ۱) در تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده (زمان و آنزیم‌های مختلف) برابر با $62/23 - 95/21$ درصد بوده است. بر اساس نتایج پروتئین‌های هیدرولیز شده تولیدی در این پژوهش میزان پروتئین به نسبت بالایی در تمام تیمارها دارند. غنی بودن این تیمارها از پروتئین به علت وجود مقادیر بالایی از پروتئینهای محلول طی فرآیند تولید، پس از جداسازی بخش جامد و نامحلول پروتئینهای مایوفیبریل و استروما به وسیله سانتریفیوژ می‌باشد. بنابراین، محتوای بالای پروتئین خام در پروتئینهای هیدرولیز شده مورد مطالعه، آن‌ها را تبدیل به مکمل‌های پروتئینی ارزنده می‌کند [۲۷، ۲۸].

۳-۲- بررسی مقادیر درجه هیدرولیزاسیون و طول زنجیره پتیدی

همانطور که نتایج مربوط به تغییرات درجه هیدرولیز (جدول ۱) در گذر زمان نشان می‌دهد، که با افزایش مدت زمان واکنش، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد، در واقع بیشترین درصد درجه هیدرولیز در رابطه با آنزیم پروتامکس در مدت زمان ۱ ساعت بوده، 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 پتیدی شکسته می‌شود [۲، ۲۹]. مقایسه بین آنزیم‌های تجاری (همانند آنزیم پروتامکس) و آنزیم پروتئولیتیک گیاهی (مانند برومالین) نشان داد که آنزیم‌های با منشأ میکروبی بازده هیدرولیز را افزایش می‌دهند [۱۷]. پروتامکس یک پروتئاز تهیه شده از باکتری *Bacillus*

گرفت برای جلوگیری از افزایش دما فرآیند فراصوت در شرایط نگهداری نانولیپوزوم در آب سرد انجام گرفت. در نهایت نانولیپوزوم تولید شده با غلظت لیپید (لیستین و کلسترول) 10 mg/ml تا زمان انجام آزمون‌ها در یخچال نگهداری شد.

۲-۷-۲- تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

برای این منظور هر یک از نمونه‌ها نخست با استفاده از بافر فسفات نمکی به نسبت $1:10$ رقیق شدند. اندازه ذرات به صورت - میانگین (Z-average) اندازه گیری شد همچنین بار الکتریکی نانولیپوزومها به صورت پتانسیل زتا هدایت الکتریکی ویژه و جنبش الکتروفورزی با استفاده از همین دستگاه اندازه گیری شد.

۲-۷-۳- بازده ریزپوشانی

بازده ریزپوشانی پتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کینوا با استفاده از روش Liu و همکاران (۲۰۱۵) با مقداری اصلاحات انجام گرفت. بدین شکل که برای تعیین مقدار پتیدهای ریزپوشانی نشده در ساختار لیپوزوم (پروتئینهای آزاد مقدار 1 ml از نانولیپوزوم تهیه شده با روش سانتریفیوژ با استفاده از فیلتر آمیکون با وزن مولکولی عبوری 10 کیلودالتون منتقل و به مدت 10 min در دور 3500 rpm سانتریفیوژ شد در نهایت بازده و کارایی درون پوشانی هیدرولیز شده‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [۲۶].

معادله ۱۰

$100 \times (\text{مقادیر پروتئین کل} / \text{مقادیر پروتئین بارگیری نشده} - \text{مقادیر پروتئین کل}) = \text{بازده ریزپوشانی} (\%)$

۲-۸- ارزیابی آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18 انجام شد. مقایسه میانگین‌ها تیمارها با آزمون چند دامنه ای دانکن با سطح احتمال خطای 5% انجام شد. رسم

پپتیدی به طور معنی داری کاهش یافت. Dorvaj و همکاران (۲۰۱۳) نیز اعلام نمودند که پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا توسط آنزیم میکروبی پرومود به صورت معنی داری درجه هیدرولیزاسیون بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاهتری از پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم برومالین داشت [۱۷].

subtilis میباشد که به دلیل تولید پروتئین با درجه هیدرولیز بالا در زمان کوتاه و با تلخی کمتر نسبت به آنزیمهای دیگر به طور گسترده مورد استفاده قرار گرفته است [۱۸، ۳۰].

طول زنجیره پپتیدی (جدول ۱) با مقادیر درجه هیدرولیزاسیون نسبت عکس دارد به طوری که طول زنجیره پپتیدی توسط پروتامکس کمتر از برومالین بوده است و همچنین با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر طول زنجیره

Table 1. Effect of enzyme hydrolysis type and time of protein hydrolyzed on protein content, degree of hydrolysis and peptide chain length.

Enzyme		Protein content (%)	Degree of hydrolysis (%)	Peptide chain length
Type	Time (min)			
Protamax	10	64.59±0.50 ^e	14.21±0.72 ^d	7.04±0.35 ^a
	30	77.69±0.61 ^c	23.69±0.79 ^c	4.22±0.14 ^b
	60	95.21± 1.15 ^a	35.17±1.59 ^a	2.84±0.12 ^d
Bromelain	10	62.23±0.55 ^f	12.53±0.84 ^d	8.00±0.56 ^a
	30	74.62±1.08 ^d	22.03±0.05 ^c	4.53±0.01 ^b
	60	90.58±0.45 ^b	31.59±0.83 ^b	3.16±0.08 ^c

Averages with the different letters (in each columns) indicate that there is significant difference at the $P < 0.05$.

آنتی اکسیدانی، ضد التهابی، ضد سرطان و کاهش قند و فشار خون می‌باشند [۳۲، ۳۳]. که با توجه با مقادیر بالای آن‌ها در دو نوع هیدرولیز تولیدی میتوان انتظار اثرات زیست فعال بودن آنان را در میزبان داشت [۳۴]. مجموع اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک به ترتیب برای آنزیم پروتامکس و برومالین ۴۰/۴۱ و ۳۷/۹۱، ۱۲/۳۵ و ۱۱/۴۶ بوده است. بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای آنزیم پروتامکس و برومالین، لوسین ۷/۰۴ و ۷/۰۵ بوده است، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم پروتامکس و برومالین آسپارتیک اسید ۱۸/۹۷٪، ۱۸/۵۵٪ بوده است.

۳-۳ ترکیب اسید آمینه

با توجه به نتایج (جدول ۲) مشخص شد که هر دو پروتئین هیدرولیز شده غنی از اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری هستند و از توانایی تأمین مقادیری بیش از مقادیر مورد نیاز انسان برخوردارند و تنها اسیدهای آمینه فنیل آلانین محدودکننده بوده است [۳۱]. اسیدهای آمینه آبگریز (فنیل آلانین، پرولین، متیونین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین، والین) و اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین، هیستیدین، تربیتوفان، تیروزین)، مسئول اغلب خواص کاربردی و زیستی پروتئینهای هیدرولیز شده همچون فعالیت

ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم لوسین ۷/۷۸٪ و ۷/۱۲٪ اعلام نمودند است [۵]. مطابق مطالعات مقادیر اسید آمینه برای گونه‌های شبدر متفاوت می باشد اما در تمامی گونه‌های مذکور بالاترین مقادیر اسید آمینه مربوط به آسپارتیک اسید بوده است.

Purwin و همکاران (۲۰۱۵) بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای پروتئین شبدر قرمز را لوسین (۵/۳۵٪)، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری را آسپارتیک اسید (۱۲/۰۸٪) اعلام نمودند [۳۵]. Mirsadeghi Darabi و همکاران (۲۰۲۲) در ارتباط با پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم آسپارتیک اسید ۱۸/۹۹٪، ۱۷/۵۸٪ و بالاترین مقادیر اسید آمینه

Table 2: Effect of enzyme hydrolysis type (at 60 min) of protein hydrolyzed on amino acid composition

Amino acid (g 100 g ⁻¹)	Protamax	Bromelain	FAO/ WHO, 1990
Threonine ^a	6.44	6.79	3.4
Valine ^a	5.99	5.66	3.5
Methionine ^a	0.39	0.47	
Isoleucine ^a	4.14	4.05	2.8
Leucine ^a	7.04	7.05	6.6
Phenyl alanine ^a	5.88	4.99	6.3
Histidine ^a	2.48	2.97	1.9
Lysine ^a	6.59	6.77	5.8
Arginine ^a	5.79	5.11	
Glycine	4.10	4.78	
Aspartic acid	18.97	18.55	
Glutamic acid	10.21	10.05	
Serine	5.11	6.05	
Alanine	5.79	5.11	
Tyrosine	3.99	3.68	1.1
Cystein	0.44	0.45	
Prolin	7.11	6.98	
Total amino acid	99.63	99.39	
HAA ^b	40.41	37.91	
AAA ^c	12.35	11.46	

^aEssential amino acids

^b Combined total of hydrophobic amino acids (HAA)= alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, methionine and cysteine

^c The total amount of aromatic amino acids (AAA) (phenylalanine, histidine, tryptophan and tyrosine)

اعتقاد بر این است گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال و خاصیت ضد اکسیدانی می باشد [۳۶]. همچنین اعتقاد بر این است که تخریب ساختار طبیعی پروتئینها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به باز شدن ساختار و قرارگیری در معرض گروه های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال های آزاد می باشند، خواهد شد [۳۷]. این موضوع به اثبات رسیده است که رابطه مستقیمی میان قدرت مهار رادیکال و ضد اکسیدانی و قابلیت هیدروژن دهنده گی آمینواسیدها وجود دارد. تغییر در طول زنجیره های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر بسزایی در قدرت ضد اکسایش دارد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضد اکسایش قوی تری هستند [۳۶، ۳۷].

۳-۴ خاصیت آنتی اکسیدانی

پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از زمانهای مختلف، فعالیت مهارکنندگی متفاوتی نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (نمودار ۱)، با افزایش مدت زمان هیدرولیز افزایش یافت. همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم پروتامکس تنها در انتهای دوره نگهداری بالاتر از آنزیم برومالین بود. به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۰/۸۷/۶۲). در مجموع نتایج نشان داده است که هر دو آنزیم منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز و اسیدهای آمینه آروماتیک با سایر اسیدهای آمینه میگردد و

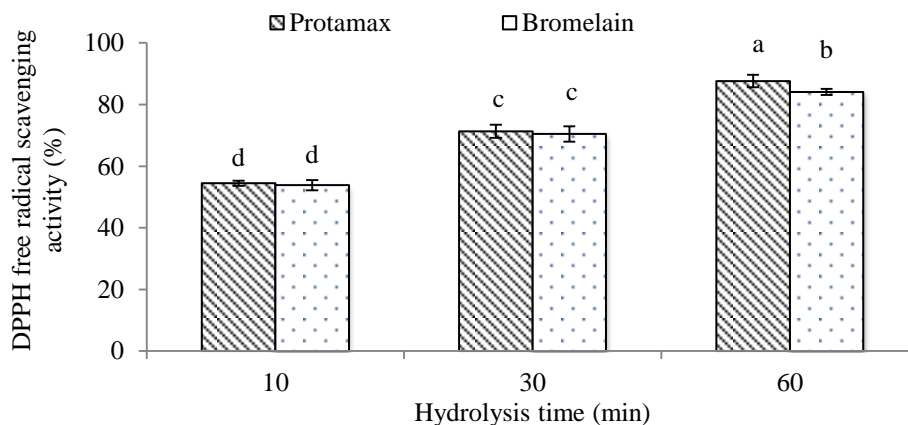


Figure 1: The DPPH free radical scavenging activity of clover sprouts protein hydrolysates. Different letters in the same times showed a significant difference at $p < 0.05$.

توالی اسیدهای آمینه و ساختار پپتیدها و پروتئین های هیدرولیز شده نیز وابسته است [۲، ۳۸].

یکی دیگر از روش های سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی، ارزیابی قدرت مهار رادیکال ABTS است که یکی از روش

همچنین نتایج نشان داده است که فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده و پپتیدها، به نوع پروتئاز بکار برده شده جهت هیدرولیز، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی،

می توانند با رادیکال های آزاد واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدارتر تبدیل کنند. نتیجه این عملکرد متوقف کردن واکنشهای زنجیره ای اکسیداسیون خواهد بود [۳۹].

های بسیار خوب برای بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات الکترون دهنده و ترکیباتی است که واکنش های زنجیر های اکسیداسیونی را با مهار رادیکال های پروکسیل لیبید متوقف می کنند. پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از زمانهای مختلف، فعالیت مهارکنندگی متفاوتی نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (نمودار ۲)، با افزایش مدت زمان هیدرولیز افزایش یافت. پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس و بروملاین با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بودند. پروتئین های هیدرولیز شده پپتیدهایی دارند که الکترون دهنده بوده و

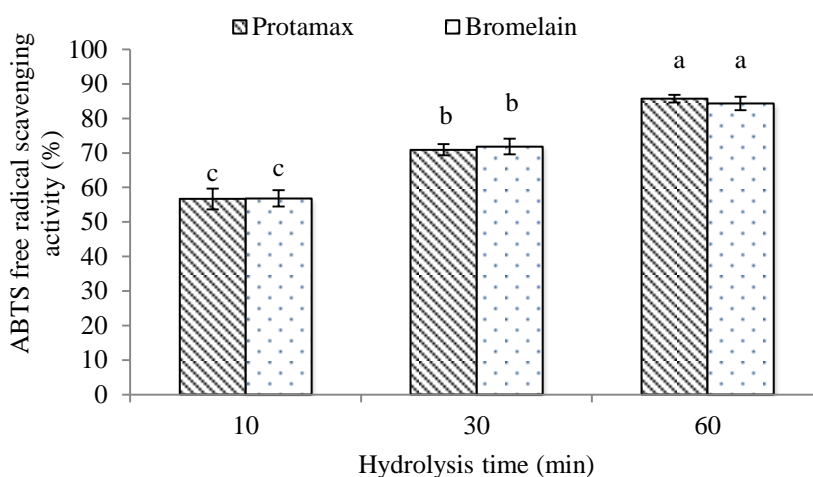


Figure 2: The ABTS free radical scavenging activity of clover sprouts protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at $p < 0.05$.

دارند، همچنین سایر ویژگی های عملکردی پروتئین نظیر ویژگی های کف، امولسیون و ژل شوندگی به حلالیت اولیه بستگی دارد [۴۰]. حلالیت پروتئین هیدرولیز شده (نمودار ۳) توسط آنزیم مختلف در زمانهای مشابه اختلاف معنی داری باهم نداشتند اما با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر حلالیت افزایش یافت. به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین حلالیت را دارا بود. بنابر این افزایش زمان هیدرولیز و درجه هیدرولیز تاثیر مثبتی بر مقادیر حلالیت پروتئین داشت. Fan و همکاران (۲۰۲۰) گزارش نمودند حلالیت بالاتر پروتئین ها ممکن

در واقع تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی با گذشت زمان تحت تاثیر تغییر طول زنجیره های پپتیدهای حاصل با افزایش هیدرولیز بوده است. نتایج مطالعات بسیاری از محققان نشان می دهد که پپتیدهای بادرجه هیدرولیز بالاتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان داده اند [۲۷، ۵].

۳-۵ خواص عملکردی

۳-۵-۱ حلالیت

حلالیت معمولاً به عنوان یکی از مهم ترین ویژگی های عملکردی پروتئین در نظر گرفته می شوند. پروتئین هایی در صنایع غذایی استفاده می شوند، احتیاج به حلالیت بالا

است به دلیل وجود پپتیدهای کوچکتر با ماهیت آبدوست نسبت به پروتئین‌های سالم (دست نخورده) باشد، همانطور که بیان شد طول زنجیره پپتیدی با درجه هیدرولیز و زمان هیدرولیز نسبت عکس دارد [۴۱]. Yathisha و همکاران (۲۰۲۱) نیز اعلام نمودند حلالیت پروتئین هیدرولیز شده ماهی روبان (*Lepturacanthus Savala*) با افزایش زمان هیدرولیز و درجه هیدرولیز افزایش یافت [۳۳].

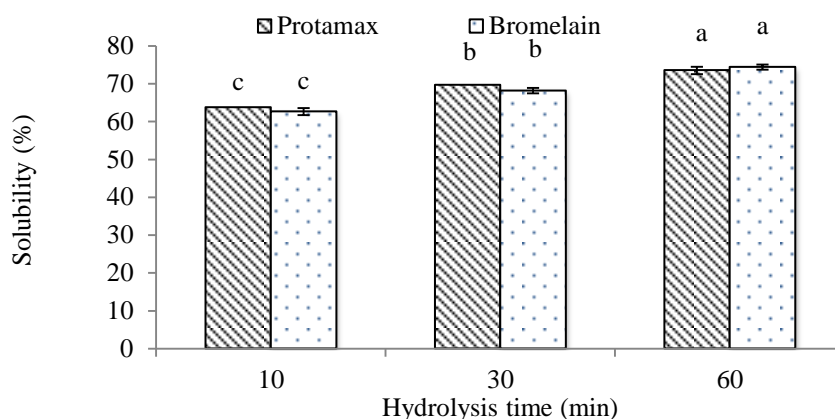


Figure 3: The solubility of clover sprouts protein hydrolysates. Different letters in the same times showed a significant difference at $p < 0.05$.

داشت و این دو پارامتر توسط آنزیم مختلف در زمانهای مشابه اختلاف معنی داری باهم نداشتند. اما با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت امولسیون افزایش یافت. به عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیند هیدرولیز، امولسیون کنندگی پروتئین‌ها تحت تأثیر طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی قرار می‌گیرد و با کاهش وزن مولکولی نیز ظرفیت امولسیون کنندگی افزایش می‌یابد. Gumus و همکاران (۲۰۱۷) اعلام نمودند، یک رابطه مستقیم بین فعالیت امولسیون کنندگی و طول پپتید وجود دارد، طول پپتیدهای کوچکتر می‌تواند خواص امولسیون کننده پروتئین را بهبود بخشد [۴۲]. این یافته ممکن است کاربرد بالقوه ای در غذاهای کاربردی داشته باشد.

۳-۵-۲ خواص امولسیون کنندگی

خواص امولسیفایری محصولات دارای پروتئین، بعلا حضور پروتئین‌های محلول و نامحلول و همچنین سایر ترکیبات، مثل پلی ساکاریدهاست. پروتئین‌ها می‌توانند از طریق کاهش کشش سطحی قطره‌های روغن و ایجاد دافعه الکترواستاتیکی بر سطح قطره‌های روغن، یک امولسیون را تشکیل داده و تحکیم بخشند [۴۲]. پروتئین باید حلالیت خوبی در آب داشته باشد و قادر به مهاجرت سریع و جذب در سطح مشترک روغن و آب در طول همگن شدن باشد. پایداری امولسیون به برهمکنش پروتئین-پروتئین برای تشکیل یک لایه ویسکوالاستیک قوی در سطح مشترک بستگی دارد [۴۰]. نتایج مربوط به پایداری امولسیون (نمودار ۴) و ظرفیت امولسیون (نمودار ۵) باهم، هم خوانی

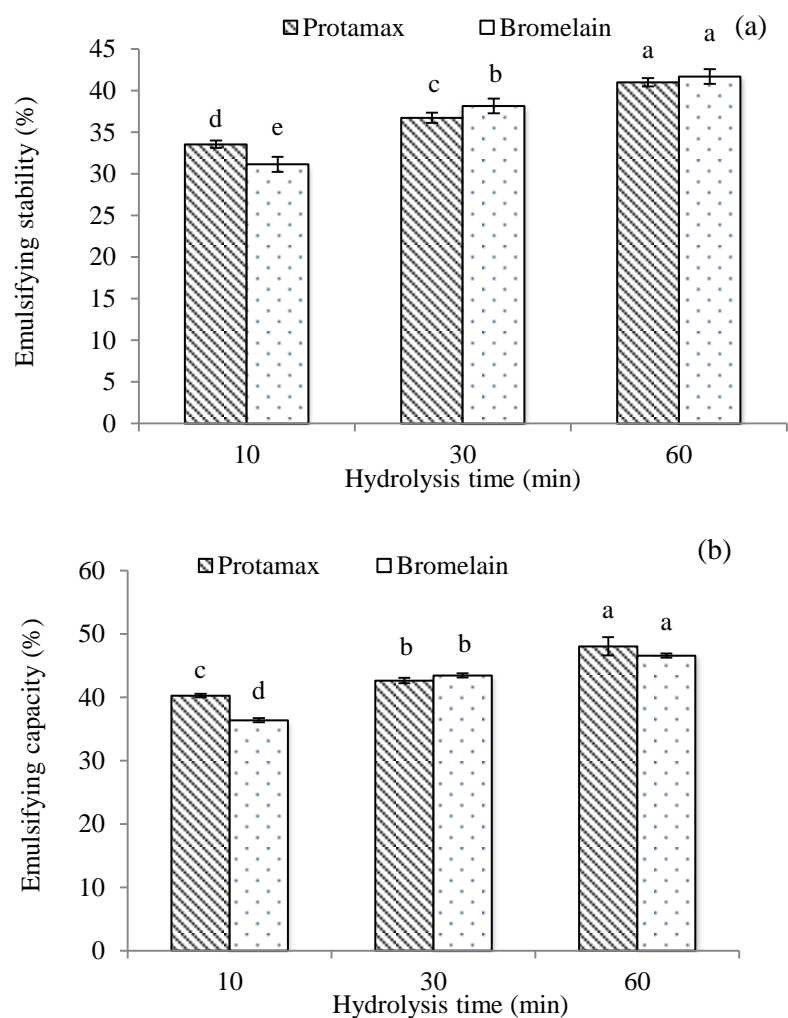


Figure 4: The emulsifying stability (a) and capacity (b) of clover sprouts protein hydrolysates
 Different letters in the same times showed a significant difference at $p < 0.05$.

انعطاف پذیری سطح هوا-آب را افزایش می دهد، در نتیجه شکست حباب های هوا سخت شده و کف مستحکم تری تشکیل می شود [۴۰]. مقادیر ظرفیت کف (نمودار ۵a) و پایداری کف (نمودار ۵b) با هم، هم خوانی داشت، کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس در تمامی زمانهای هیدرولیز بالاتر بود. میزان ظرفیت کف کنندگی در بین زمانهای مختلف اختلاف معنی داری باهم داشتند ($P < 0.05$) با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت کف کنندگی افزایش یافت به طوریکه پروتئین هیدرولیز

۳-۵-۲ خواص کف کنندگی

پروتئین ها به دلیل فعالیت سطحی بالا عامل ایجادکننده کف در آردها می باشند. پروتئین های محلول میتوانند کشش سطحی بین لایه احاطه کننده مایع و حبابهای هوا را کاهش دهند، در نتیجه از تجمع حبابها ممانعت می کنند. از طرف دیگر مولکول های پروتئینی می توانند باز شده و با یکدیگر واکنش دهند و فیلم چند لایه پروتئینی تشکیل دهند که

کاهش طول زنجیره پپتیدها و عملکرد آنها در ایجاد و پایداری کف مؤثر است. نتایج این تحقیق مشابه با یافته های Jamdar و همکاران (۲۰۱۰) اعلام نمودند در هیدرولیز آنزیمی با کاهش وزن مولکولی و افزایش انعطاف پذیری پپتیدها، موجب تسهیل تشکیل غشای بین سطحی و تولید کف می‌شود [۴۵].

شده توسط آنزیم پروتامکس با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف را دارا بود. تحقیقات مختلفی، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی و زمان هیدرولیز بر ظرفیت و پایداری کف کنندگی هیدرولیز شده های پروتئینی را بررسی کرده اند. عواملی مانند حلالیت پروتئینها در شرایط مختلف pH، درجه هیدرولیز نوع پپتیدهای، حاصل قابلیت تشکیل فیلم از موارد مؤثر بر این شاخصها هستند [۴۳، ۴۴]. بدین شکل که اثر افزایش درجه هیدرولیز تحت تأثیر زمان فرآیند و نوع آنزیم بر

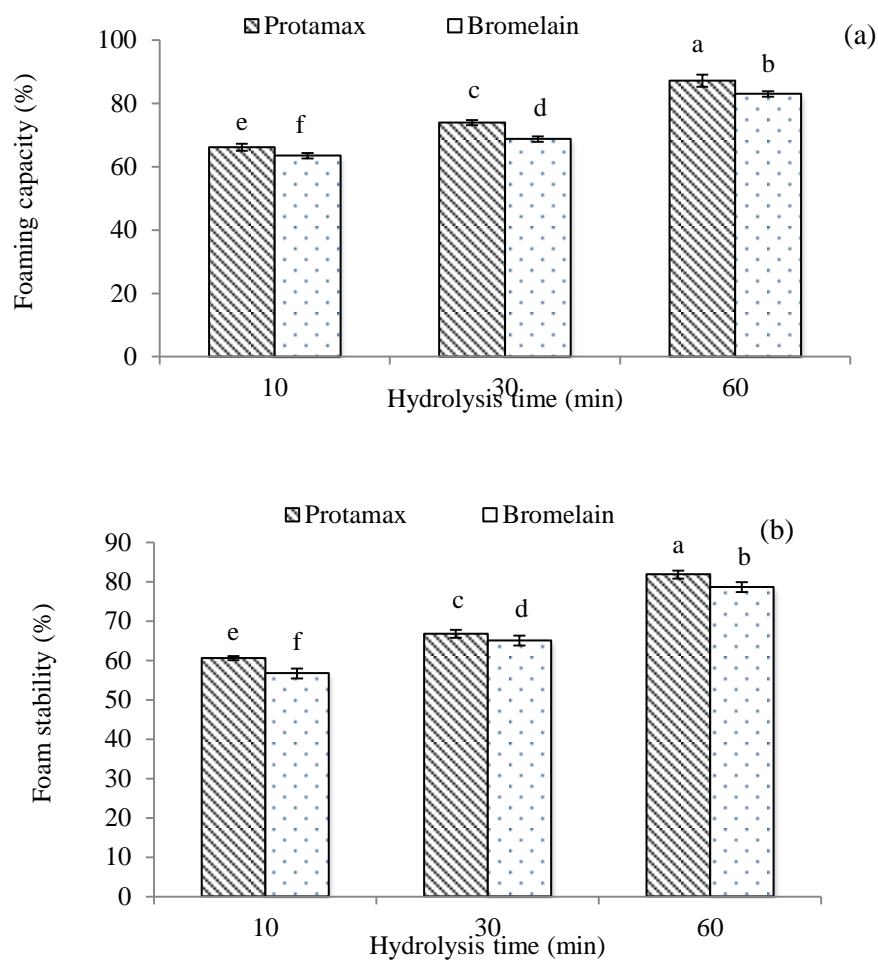


Figure 5: The foaming capacity (a) and stability (b) of clover sprouts protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at $p < 0.05$.

پتیدهای ضد میکروبی را ۱۵۰ نانومتر و همچنین Hosseini و همکاران (۲۰۱۷) نیز اندازه ذرات لیپوزومهای حاوی ژلاتین ماهی را ۱۳۱/۵ نانومتر گزارش نمودند [۴۸، ۴۹] که تقریباً همسو با نتایج تحقیق حاضر بود و اندک تفاوت مشاهده در نتایج می‌تواند به دلیل تفاوت در زمان سونیکاسیون و همچنین ترکیبات شرکت کننده در دیسپرسیون باشد [۴۷].

۳-۶ بررسی آزمون های نانولیپوزیم

۳-۶-۱ اندازه ذرات

اندازه ذرات یک عامل مهم و اثرگذار بر میزان پایداری، راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات زیست فعال می باشد. با توجه به اثرات اندازه ذرات بر میزان پایداری و همچنین ظرفیت آزادسازی ترکیبات محصور شده در هسته، این شاخص بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴۶، ۴۷]. نتایج مربوط به اندازه ذرات های حامل پتیدها در مطالعه حاضر برابر با $93/64 \pm 3/37$ نانومتر بوده است. که نشان دهنده اندازه مناسب نانوذرات می باشد. Da silva و همکاران (۲۰۱۴) میانگین اندازه ذرات نانولیپوزومهای حاوی

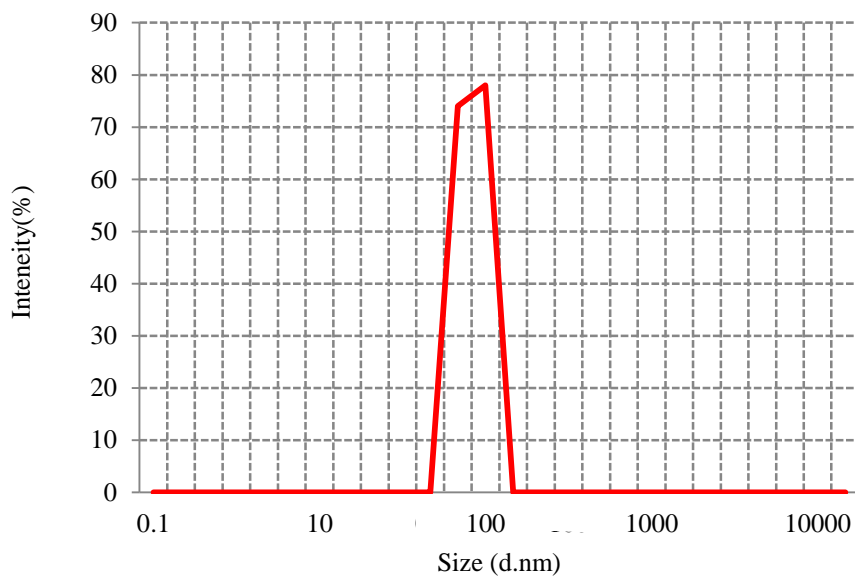


Figure 8. The curve of particle size and the dispersion of nanoparticles.

تجمیع ذرات می شود. ذراتی که پتانسیل زتای آنها از $+30$ میلی ولت کمتر یا از -30 میلی ولت بیشتر باشد، دارای بیشترین پایداری هستند [۱۲]. پتانسیل زتا در مطالعه حاضر برابر با $-8/42 \pm 1/38$ میلی ولت بوده است، بنابر نتایج لیپوزوم حاوی پتید دارای پتانسیل زتای بالا هستند که بیانگر نقش نیروی دافعه الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزوم ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. وقتی بار کلی

۳-۶-۲ پتانسیل زتا

پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی سیستم های کلوئیدی است. چون نشان دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک است [۴۶]. کاهش اختلاف پتانسیل زتا به زیر مقدار بحرانی، موجب در هم ریختن لایه دو گانه باردار اطراف ذرات و

۴- نتیجه گیری

نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم پروتامکس و بروملاین، آنزیم پروتامکس می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز، بازیافت پروتئینی، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی بالاتری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت. همچنین تحقیق حاضر نشان داد، نانولیپوزوم توانست پروتئین هیدرولیز شده جوانه شبدر را به خوبی بارگیری نماید و اندازه ذرات، پایداری و راندمان ریزپوشانی مناسبی برخوردار باشد. از آنجایی ریزپوشانی پپتیدها در لیپوزوم سبب غلبه بر تخریب پروتئولیتیک می‌گردد که در استفاده مستقیم نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست فعال در غذا حائز اهمیت می‌باشد. بنابراین نانو پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به عنوان آنتی-اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

- [1] Rabiei, S., Rezaei, M., Nikoo, M., Khezri, M., Rafieian-Kopai, M. & Anjomshoa M. 2022. Antioxidant properties of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) protein hydrolysates prepared with enzymatic hydrolysis using a commercial protease and microbial hydrolysis with *Bacillus licheniformis*. *Food Science and Technology International*. 28 (3): 233-246.
- [2] Shahosseini, S.R., Javadian, S.R. & Safari, R. 2022. Effects of Molecular Weights -Assisted Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant and Anticancer Activities of Liza abu Muscle Protein Hydrolysates. *International Journal for Peptide Research & Therapeutics*. 28 (72): 1-13.
- [3] Behfar, S., Tababeiyazdi, F., Alizade, A., Kaviani, M. & Irajifar M. 2013. Effect of grape seed extract polyphenols on growth of bacteria. *21st Iranian Food Science and Technology Congress*.
- [4] Varedesara, M. S, Ariaii, P. & Hesari J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of

روی ذرات افزایش می‌یابد، ذرات همدیگر را دفع کرده و بر توده ای شدن غلبه می‌کنند. اندازه گیری پتانسیل زتا در کنترل توده ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهم در پایداری نانولیپوزوم‌ها هستند، مفید است [۴۷، ۵۰].

۳-۶-۳ راندمان ریزپوشانی

راندمان ریزپوشانی یکی از فاکتورهای مهم در تعیین پایداری ترکیبات کپسوله شده می‌باشد، زیرا نشانگر توانایی نانولیپوزوم در جلوگیری از خروج هسته درونی است. راندمان ریزپوشانی در مطالعه حاضر برابر با $68/73 \pm 2/37$ درصد بوده است. راندمان ریزپوشانی عاملی مؤثر بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم مانند پایداری اکسیداتیو، پایداری فیزیکی، مورفولوژی و میزان رهایش می‌باشد. به طور کلی این دیدگاه وجود دارد که پایداری ترکیبات با افزایش راندمان، افزایش می‌یابد و برای دستیابی به شرایط بهینه باید راندمان ریزپوشانی را افزایش داد [۴۶، ۴۷]. این نتایج تقریباً مشابه با نتایج Hasani و همکاران (۲۰۱۹) می‌باشد آنها راندمان ریزپوشانی نانولیپوزوم‌های حامل پپتیدهای زیست فعال به دست آمده از ضایعات ماهی را $57/33\%$ اعلام نمودند [۴۷].

- Lactobacillus casei* in it. *Food Science and Nutrition*. 9: 2180-2190.
- [5] Mirsadeghi Darabi, D., Ariaii, P., Safari, R. & Ahmadi, M. 2022. Effect of clover sprouts protein hydrolysates as an egg substitute on physicochemical and sensory properties of mayonnaise. *Food Science & Nutrition*. 10: 253-263.
- [6] Ates E. 2011. Influence of some hard seedednessbreaking treatments on germination in Persian clover (*Trifolium resupanatum* ssp. *typicum* Fiori Et Paol.) seeds. *Rom. Agric. Res*. 28: 229-236.
- [7] Zhu, K.X, Zhou, H.M. & Qian, H. 2006. Antioxidant and free radicalscavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemisrty*. 41: 1296-1302.
- [8] Hassan, H.M.M., Afify, A.S., Basyiony, A.E., Ahmed, A.E., & Ghada, T. 2010. Nutritional and functional properties of defatted wheat protein isolates. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(2): 348-358.

- [9] Gomez, M., Gonzalez, J. & Oliete, B. 2012. Effect of extruded wheat germ on dough rheology and bread quality. *Food Bioprocess Technology*. 5(6): 2409-2418.
- [10] Sheng, L., Olsen, S. A., Hu, J., Yue, W., Mean, W. J. & Zhu, M. J. 2016. Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC “top-six” non-O157 Shiga toxin producing E. coli. *International Journal of Food Microbiology*. 229: 24-32.
- [11] Javadian, S. R., Shahoseini, S. R. & Ariaii, P. 2016. The effects of liposomal encapsulated thyme extract on the quality of fish mince and Escherichia coli O157: H7 inhibition during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 26 (1): 115-123.
- [12] Moghadam, R.M., Ariaii, P. & Ahmady, M. 2022. The effect of microencapsulated extract of pennyroyal (*Mentha pulegium*. L) on the physicochemical, sensory, and viability of probiotic bacteria in yogurt. *Food Measure*. 15: 2625–2636.
- [13] Wen, P., Zhu, D. H., Wu, H., Zong, M. H., Jing, Y. R. & Han, S. Y. 2016. Encapsulation of cinnamon essential oil in electrospun nanofibrous film for active food packaging. *Food Control*. 59: 366-376.
- [14] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P. & Bannerjee, S. K. 2012. Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig*. 2(1): 2–11.
- [15] Tometri, S.S., Ahmady, M., & Ariaii, P. 2020. Extraction and encapsulation of *Laurus nobilis* leaf extract with nano-liposome and its effect on oxidative, microbial, bacterial and sensory properties of minced beef. *Food Measure*. 14: 3333–3344.
- [16] Makri, E. A., Papalamprou, E. M. & Doxastakis, G. I. 2006. Textural properties of legume protein isolate and polysaccharide gels. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(12): 1855-1862.
- [17] Dorvaj Z., Javadian S.R., Oveissipour, M. & Nemati. M. 2013.. Use of Protein Hydrolysates From Caspian Sea Sprat (*Clupeonella Cultiventris*) As A Nitrogen Source For Bacteria Growth Media (*Vibrio Anguillarum*, *Bacillus Licheniformis*, *Bacillus Subtilis*). *Journal of Aquatic animals & Fisheries*. 4(15): 11-18.
- [18] Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. & Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*. 18 (7): 950-956.
- [19] Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 40(1):43-81.
- [20] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 114: 1198-1205.
- [21] Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C. & Montero P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res Int*. 44:1044-51.
- [22] Bera, M.B. & Mukherjee, R.K. 1989. Solubility, emulsifying, and foaming properties of rice bran protein concentrates. *J. Food Sci*. 54(1), 142-145.
- [23] Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. & Rustad, T. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*. 44:668-677.
- [24] Ahmed, S. A., Saleem, M. F. & Hassanzadeh, H. 2023. Optimization of solvent evaporation method in liposomal nanocarriers loaded-garlic essential oil (*Allium sativum*) based on the encapsulation efficiency, antioxidant capacity, and instability. *IETN biotechnol*. 17(5), 438–449.
- [25] Liu, W. L., Ye, A., Liu, C. M., Liu, W. & Singh H. 2012. Structure and integrity of liposomes prepared from milk or soybean derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Res Internat*. 48(2): 499–506.
- [26] Liu, W., Ye, A., Liu, W., Liu, C., Han, J. & Singh, H. 2015. Behavior of liposomes loaded with bovine serum albumin during in vitro digestion. *Food Chem*. 175: 16-24.
- [27] Ghanbarinia, S. H., Ariaii, P., Safari, R. & Najafian. L. 2022. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. *Animal science journal*. 93: 1, e13729.
- [28] Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. & Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry*. 135: 3020–3038.
- [29] Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. & Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 93: 1718–1726.

- [30] Pezeshk, S., Ojagh, S., Rezaei, M. & Shabanpour, B. 2017. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. *Journal of Genetic Resources*. 3(2): 103-112.
- [31] 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.
- [32] Gao, D., Chang, T., Li, H., & Cao, Y. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. *African Journal of biotechnology*. 9: 8977-8983.
- [33] Yathisha, U.G., Vaidya. S. & Bangera Sheshappa. M 2022. Functional Properties of Protein Hydrolyzate from Ribbon Fish (*Lepturacanthus Savala*) as Prepared by Enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Properties*. 25 (1): 187-203.
- [34] Mahdabi, M., Shamsaie Mehrgan, M. & Rajabi Islami, H. A. 2022. Comparison of the proximate compositions and amino acids profiles of protein hydrolysates produced from fishmeal effluents (stickwater), fishmeal and muscle of Anchovy sprat. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 30(6): 43-61.
- [35] Purwin, C., Fijałkowska, M., Lipiński, K., Wierzbowska, J., Kobzhasarov, T.Z. & Michalski J. 2015. Changes in amino acid composition during ensiling lucerne and red clover in round bales. *J. Elem.* 20(4): 965-973.
- [36] Mazloomi, N., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Houshmand, G. & Toldra F. 2020. Processing Optimization of Production of Hydrolyzed Protein from Orange Seed Waste with Pepsin Enzyme. *Iranian J Nutr Sci Food Technol*. 15 (1): 35-48.
- [37] Sun, Q., Shen, H. & Leu Y. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *J Food Sci and Technol*. 21:6646- 6652.
- [38] Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martí nez-Ayala, A., Da ´vila-Ortí z, G. & Betancur-Ancona, D. 2009 Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein. *LWT - Food Sci Technol*. 42:1597- 1604.
- [39] Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. & Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem*. 124(4):1354-62.
- [40] Vogelsang-O'Dwyer, M., Sahin, A.W., Arendt, E.K. & Zannini, E. 2022. Enzymatic Hydrolysis of Pulse Proteins as a Tool to Improve Techno-Functional Properties. *Foods*. 11: 1307- 1320.
- [41] Fan, Y., Yu, Z., Zhao, W., Ding, L., Zheng, F., Li, J. & Liu, J. 2020. Identification and Molecular Mechanism of Angiotensin-converting Enzyme Inhibitory Peptides from *Larimichthys Crocea* Titin. *Food Sci. Hum. Wellness*. 9: 257-263.
- [42] Gumus, C.E., Decker, E.A. & McClements, D.J. 2017. Formation and Stability of ω -3 Oil Emulsion-Based Delivery Systems Using Plant Proteins as Emulsifiers: Lentil, Pea, and Faba Bean Proteins. *Food Biophys*. 12: 186-197.
- [43] Ghelich, S., Ariaii, P. & Ahmadi, M. 2022. Evaluation of Functional Properties of Wheat Germ Protein Hydrolysates and Its Effect on Physicochemical Properties of Frozen Yogurt. *Int J Pept Res Ther*. 28: 69- 75.
- [44] Chen, L., Chen, J., Ren. J. & Zhao M. 2011. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll*. 25(5):887- 97.
- [45] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. & Sharma A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem*. 121(1):178-84.
- [46] Reyhani Poul, S., Yeganeh, S. 2022. Physicochemical and antioxidant properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with bioactive peptides produced from shrimp wastes hydrolysis. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 21(4): 987-1003.
- [47] Hasani, S., shahidi, M., Ojagh, S. M. 2019. The Production and Evaluation of Nanoliposomes Containing Bioactive Peptides Derived from Fish Wastes Using the Alkalase Enzyme. *Research and Innovation in Food Science and Technology*. 8(1): 31-44.
- [48] Da Silva, I.M., Boelter, J.F., Da Silveira, N.P. & Brandelli, A. 2014. Phosphatidylcholine nanovesicles coated with chitosan or chondroitin sulfate as novel devices for bacteriocin delivery. *Journal of Nanoparticle Research*. 16: 2479.
- [49] Hosseini, S.F., Ramezanzade, L. & Nikkhah, M. 2017. Nano-liposomal entrapment of bioactive peptidic fraction from fish gelatin hydrolysate. *International Journal of Biological Macromolecules*. 105(2): 1455-1463.
- [50] Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z.E. & Singh, H. 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 86(13) :2038-2045.

Journal of Food Science and Technology (Iran)Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Nano-microencapsulation of bioactive peptides obtained from enzymatic hydrolysis of clover sprouts and evaluation of functional and antioxidant activity of peptides

Samin Rashidi¹, Peiman Ariaii^{1*}, Mahro Esmaeili¹, Roya Bagheri¹

1-Department of Food Science and Technology, Ayatolla Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

ABSTRACT

Enzymatic hydrolysis is one of the methods used to improve the functional and nutritional properties of food proteins. Considering the effect that hydrolyzed proteins have on the functional and health-giving properties of food, in this research, using Protamax and Bromelain enzymes, the protein obtained from the clover sprout was hydrolyzed and the effect of this process on the antioxidant properties (inhibition DPPH and ABTS free radicals activities) and their functional characteristics (solubility, foaming and emulsification) were investigated. Then the hydrolyzed protein was micro-encapsulated by nanoliposome and its characteristics were analyzed. According to the results, the sum of hydrophobic and aromatic amino acids for Protamax and Bromelain enzymes were 40.41, 37.91, 12.35 and 11.46, respectively. Also, among the enzymes, Protamax enzyme was able to produce hydrolyzable protein with a higher degree of hydrolysis, protein content, antioxidant properties and higher functional properties, and also increasing the hydrolysis time had a positive effect on the aforementioned characteristics. Therefore, the protein hydrolyzed by Protamax enzyme and time 60 minutes was covered by nanoliposome, the results related to the size of the particles carrying peptides equal to 93.64 ± 3.37 nm, zeta potential equal to 42.1 ± 1.38 mV and microcoating efficiency was $68.73 \pm 2.37\%$. The results of the present research showed nano protein can be a useful approach for direct application of clover sprout peptides with antioxidant capacity in food products.

ARTICLE INFO**Article History:**

Received: 2023/3/16

Accepted: 2023/8/27

Keywords:

hydrolyzed protein,
clover sprout,
antioxidant properties,
functional properties,
nanoliposome

DOI: 10.22034/FSC.T.20.141.157**DOR:** 20.1001.1.20088787.1402.20.141.11.9

*Corresponding Author E-Mail: