مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد تولیدی با تخمیر توسط گونه‌های *باسیلوس*

پریسا راعی[۱]، مرتضی خمیری[۲*]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، علی مؤیدی[۳]، محبوبه کشیری[۳]

۱- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۳/۱۲

کلمات کلیدی:

باسیلوس،

تخمیر،

پروتئین هیدرولیز شده

کنجاله کنجد،

آنتی‌اکسیدان

DOI:10.22034/FSCT.21.156.80.

* مسئول مکاتبات:

khomeiri@gau.ac.ir

چکیده

پروتئین هیدرولیز شده منبع ارزشمندی از پپتیدهای زیست فعال است. تولید پروتئین هیدرولیز شده از طریق فرآیند تخمیر یک رویکرد سازگار با محیط زیست است که در اغلب موارد نسبت به هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی ترجیح داده می‌شود. در این پژوهش از ٤ گونه *Bacillus pumilus* PTCC 1319، *Bacillus coagulans* IBRC 10807، *Bacillus licheniformis* PTCC 1595 و *Bacillus subtilis* PTCC 1156 جهت هیدرولیز پروتئین کنجاله کنجد استفاده شد. آزمون‌های مورد بررسی شامل اندازه‌گیری غلظت پپتیدها با روش OPA، اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت شلاته کنندگی یون آهن بود. غلظت پپتیدها پس از مدت زمان ٢٤ ساعت برای ٤ گونه *Bacillus* اندازه‌گیری شد. کمترین غلظت پپتید (mg/mL ۰/٦٥٦) مربوط به تیمار تخمیر شده با *B. licheniformis* و بیشترین مقدار (mg/mL ۱/۳۸) مربوط به تیمار هیدرولیز شده با *B. subtilis* بود؛ بطوری‌که بین همه تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. نتایج درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد که بیشترین درصد مهار (٪۷٦/٦) مربوط به نمونه هیدرولیز شده توسط *Bacillus coagulans* و کمترین مقدار (٪۵۷/۳٦) مربوط به تیمار هیدرولیز شده با *B. licheniformis* بود به طوری‌که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. نمونه تخمیر شده با *Bacillus pumilus* قدرت احیاء کنندگی بیشتری (۰/۹۹۲ جذب در ۷۰۰ نانومتر) نشان داند. همچنین بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. بیشترین درصد شلاته کنندگی یون آهن (٪۸۵/٦) در نمونه تخمیر شده با *B. subtilis* مشاهده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تخمیر توسط *Bacillus coagulans* دارای بیشترین مقدار جذب در ٦۹۵ نانومتر می‌باشد و بین تیمارها اختلاف معنی‌داری ($p<۰/۰۵$) مشاهده شد. بطور کلی تخمیر پروتئین کنجد توسط گونه‌های *Bacillus* منجر به تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی شد که می‌تواند به عنوان منبعی بالقوه در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

۱-مقدمه

در حال حاضر بیماری‌های مختلف بر کیفیت زندگی افراد تأثیر می‌گذارد. بر اساس گزارش سازمان جهانی بهداشت، بیماری‌هایی که بیشترین میزان مرگ و میر را به همراه دارند عبارتند از بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان، بیماری‌های مزمن تنفسی و دیابت [۱]. یکی از عواملی که می‌تواند باعث ایجاد این بیماری‌ها شود، آسیب اکسیداتیو به لیپیدها، پروتئین‌ها و اسیدهای نوکلئیک است که به دلیل عدم تعادل بین آنتی‌اکسیدان‌های موجود در موجود زنده و گونه‌های فعال اکسیژن (ROS[1]) ایجاد می‌شود [۲]. تشکیل ROS یک فرآیند اجتناب ناپذیر است که به عنوان یک عارضه جانبی تنفس ایجاد می‌شود و توسط سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی طبیعی بدن یا آنتی‌اکسیدان‌های مصرف شده خنثی می‌شوند [۳]. آنتی‌اکسیدان‌ها توانایی خنثی کردن رادیکال‌های آزاد و محافظت از سلول‌های انسان در برابر استرس اکسیداتیو را دارند با این حال، گاهی اوقات به دلیل عوامل مختلف، ROS بیش از حد تولید شده و سبب ایجاد بیماری‌های کشنده می‌شود [٤].

در سال‌های اخیر، اهمیت پروتئین هیدرولیز شده به دلیل خواص تغذیه‌ای و اثرات زیست فعالی آنها افزایش یافته است. آنها همچنین منبع پپتیدهای فعال زیستی هستند. پپتیدها مولکول‌های زیستی هستند که از هیدرولیز پروتئین‌های خاصی شکل گرفته و معمولاً از ۲ تا ۲۰ زیر واحد آمینواسید تشکیل شده‌اند [۵]. با این حال، برخی استثناها وجود دارد، مانند Lunasin، یک پپتید فعال زیستی متشکل از ٤٤ اسید آمینه است که دارای فعالیت‌های زیستی متعددی مانند تعدیل کننده ایمنی، ضد فشار خون، ضد سرطان، ضد التهاب، آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی هستند [٦]. پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی پپتیدهای فعال زیستی از پروتئین‌های غذایی حیوانی و گیاهی به دست می‌آیند. کنجد با نام علمی (*Sesamum indicum*) دانه گیاهی است که منبع خوبی از لیپیدها، فیبر غذایی، ویتامین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌ها است که محتوای پروتئین بالایی دارد. در حال حاضر گزارش‌هایی از پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای فعال زیستی به دست آمده از پروتئین کنجد توسط هیدرولیز آنزیمی وجود دارد [۷].

تخمیر یکی از روش‌های هیدرولیز پروتئین است. این روش شامل استفاده از میکروارگانیسم‌ها برای به دست آوردن پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال است. در این روش پروتئین با عمل پپتیدازهایی که میکروارگانیسم‌ها می‌توانند در طی تخمیر ترشح کنند شکسته می‌شود. مزایای خاصی که این روش در مقایسه با روش هیدرولیز آنزیمی دارد، وجود تنوع بیشتر پروتئازهای میکروبی و سطوح بالای فعالیت پروتئاز است، زیرا همه پروتئازهای ترشح شده توسط میکروارگانیسم در فرآیند هیدرولیز پروتئین فعالیت می‌کنند؛ در نتیجه نسبت به هبدرولیز با آنزیم‌های تجاری مقرون به صرفه می‌باشد و موجب ایجاد ارزش افزوده در سوبسترای مورد استفاده می‌گردد. علاوه بر این، روشی دوستدار محیط زیست نسبت به هیدرولیز آنزیمی در نظر گرفته می‌شود [۸]. انتخاب میکروارگانیسم در این فرآیند مهم است زیرا مسئول تولید آنزیم پروتئولیتیک است. با این حال، باید شرایط محیطی مناسب (دما، زمان، فعالیت آبی، pH) برای رشد آن فراهم شود.

گونه‌های *باسیلوس* می‌توانند تعداد بالایی از پروتئازهای غیر اختصاصی را برای افزایش هیدرولیز تولید کنند. علاوه‌بر این، عملکرد رشد بالایی دارند زیرا منابع کربن کم هزینه را مصرف می‌کنند و در محیط‌های سخت با مواد مغذی محدود یا در دسترس، رشد می‌کنند [۹]. برخی از سویه‌ها GRAS هستند، مانند *B. subtilis* که با تخمیر سویا پپتیدهایی با فعالیت بیولوژیکی متنوع تولید می‌کند [۱۰]. با این حال، گونه‌های دیگر *باسیلوس* وجود دارند که فعالیت پروتئولیتیک

1- *Reactive Oxygen Species*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

بالایی دارند و باید برای نشان دادن توانایی آنها در تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده یا پپتیدهای زیست فعال ارزیابی شوند. به عنوان مثال، *B. thuringiensis*، *B. megaterium* و *B. proteolyticus*گونه‌هایی هستند که تاکنون گزارشی در مورد آنها وجود ندارد.

به طور کلی هدف از انجام این پژوهش بررسی عملکرد ٤ گونه *B. pumilus*، *B. coagulans*، *B. licheniformis* و *B. subtilis* جهت هیدرولیز ایزوله پروتئین کنجد و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت شلاته کنندگی یون آهن) آنها می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد اولیه: کنجاله کنجد از شرکت صنایع غذایی کشاورز قم تهیه شد سپس آسیاب شده و در آون در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد خشک شد تا به وزن ثابت برسد. در ادامه چربی‌گیری با هگزان انجام گرفت و کنجاله چربی‌گیری شده جهت استخراج پروتئین مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲- سویه‌های میکروبی: *Bacillus pumilus* PTCC 1319، *Bacillus licheniformis* PTCC 1595، *Bacillus subtilis* 1156 از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌های صنعتی ایران و *Bacillus coagulans* IBRC 10807 از شرکت تک ژن زیست خریداری شد.

۲-۳- استخراج پروتئین کنجاله کنجد: برای استخراج پروتئین ابتدا مقدار مشخصی از کنجاله به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط شد. سپس pH آن با سود ۱ نرمال به ۱۱ رسانده شد و به مدت یک ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد همزده شد و در ادامه سانتریفوژ (Hanil Co, Combi 514R, South Korea) با دور ۸۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد. pH مایع روئی با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به ٤ رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه همزده شد، سپس سانتریفوژ با دور ٦۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه انجام شد. رسوب حاصل جدا و با خشک‌کن انجمادی (Ningbo Dscientz Technology Co, Ltd, China) خشک شده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۱۱].

٤-۲- هیدرولیز پروتئین با تخمیر: برای هیدرولیز پروتئین با تخمیر ابتدا گونه‌های *باسیلوس* در محیط BHI[2] براث به مدت ۲٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. برای انجام تخمیر غلظت پروتئین ۳ درصد، گلوکز ۱ درصد، مایه تلقیح ۲ درصد (با غلظت 10^8 cfu/mL)، pH برابر ۷ و دما ۳۷ درجه سانتی‌گراد در نظر گرفته شد. تخمیر با هر یک از گونه‌های *باسیلوس* انجام گرفت و پس از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری، سانتریفوژ با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه انجام شد و سپس با فیلتر ۰/٤۵ میکرون استریل شده و با خشک‌کن انجمادی خشک شد و برای انجام آزمون مورد استفاده قرار گرفت [۹].

۵-۲- اندازه‌گیری غلظت پپتید: سنجش غلظت پپتیدها با روش OPA[3] انجام شد. به طور خلاصه محلول OPA به وسیله مخلوط ۲۵ میلی‌لیتر ترابورات ۱۰۰ میلی‌مولار، ۲/۵ میلی‌لیتر سدیم دو دسیل سولفات ۲۰ درصد، ٤۰ میلی‌گرم OPA (حل شده در یک میلی‌لیتر متانول) و ۵۰ میلی‌گرم DTT[4] به مخلوط اضافه شد، سپس به حجم ۵۰ میلی‌لیتر با آب مقطر رسانده شد. در میکروپلیت ۹٦ خانه‌ای ۳٦ میکرولیتر از نمونه و ۲۷۰ میکرولیتر از محلول OPA اضافه شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (BMG Labtech, SPECTROstar Nano, USA). برای رسم منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آمینواسید ال- سرین استفاده شد [۱۲].

٦-۲- آزمون آنتی‌اکسیدانی

٦-۲-۱- مهار رادیکال آزاد DPPH[5]: برای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ابتدا ۲۰ میلی‌گرم از پروتئین هیدرولیز شده کنجد در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد و یک میلی‌لیتر از آن با

2- Brain Heart Infusion Broth
3-O-phetaldialdehyde
4- Dithiothreitol
5- 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]
[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

۷۵۰ میکرولیتر اتانول مطلق ترکیب شد و سپس ۲۵۰ میکرولیتر محلول DPPH ۰/۱۵ میلی‌مولار به آن اضافه شد و ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار گرفت و در ادامه جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BMG Labtech, SPECTROstar Nano, USA) قرائت شد. نمونه کنترل حاوی آب مقطر و محلول DPPH بود. درصد مهار کنندگی با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۳].

$$\text{درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

۲-۶-۲- احیاء کنندگی یون آهن: برای انجام این آزمون ۲۰ میلی‌گرم از پروتئین هیدرولیز شده در یک میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. ۲۵۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید ترکیب و به مدت یک دقیقه همزده شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور قرار داده شد. در ادامه TCA[6] (Sigma, Aldrich) ۱۰ درصد به ترکیب اضافه و با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سوپرناتانت حاصل با فریک کلراید ۰/۱ درصد وزنی-حجمی مخلوط و جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (BMG Labtech, SPECTROstar Nano, USA) قرائت شد [۱۴].

۳-۶-۲- شلاته کنندگی یون آهن: برای اندازه‌گیری شلاته کنندگی یون آهن، ابتدا ۵۰۰ میکرولیتر از نمونه (غلظت ۲۰mg/mL) با ۲۵ میکرولیتر محلول دی کلرید آهن ۲ میلی‌مولار و ۹۰۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۵۰ میکرولیتر محلول فروزین ۵ میلی‌مولار اضافه و به شدت همزده شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط جذب در ۵۶۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (BMG Labtech, SPECTROstar Nano, USA) خوانده شد. از آب مقطر به عنوان نمونه کنترل استفاده شد [۱۵]. فعالیت شلاته کنندگی یون آهن با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد شلاته کنندگی یون آهن} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

۴-۶-۲- آنتی‌اکسیدانی کل: ابتدا ۵۰ میکرولیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۲۰ mg/mL) با ۵۰۰ میکرولیتر از معرف (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی-مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس با دور ۵۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر (BMG Labtech, SPECTROstar Nano, USA) در طول موج ۶۹۵ نانومتر ثبت شد. نمونه کنترل حاوی معرف و آب مقطر بود [۱۶].

۷-۲ آنالیز آماری: تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ انجام گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت. همه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند.

۳- نتایج و بحث

۱-۳ غلظت پپتید: در این مطالعه فعالیت پروتئولیتیکی ۴ گونه *باسیلوس* با روش OPA برای تعیین غلظت پپتیدها مورد ارزیابی قرار گرفت. تولید آنزیم توسط میکروارگانیسم‌ها به pH، دما، میزان مایه تلقیح، زمان گرمخانه‌گذاری و نوع منبع مغذی بستگی دارد [۱۷]. منبع کربن و نیتروژن فاکتور مهمی برای تولید پروتئاز در محیط تخمیر می‌باشد [۱۸]. با توجه به شکل ۱ *B. coagulans* و *B. subtilis* بیشترین جذب را در طول موج ۳۴۰ نانومتر نشان داد و غلظت پپتید به ترتیب ۱/۳۳ و ۱/۳۸ میلی‌گرم/میلی‌لیتر بدست آمد. کمترین غلظت پپتید (۰/۶۵۶ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) مربوط به گونه *B. licheniformis* بود. جنسن و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که علت اختلاف در فعالیت پروتئازی پروبیوتیک‌ها به دلیل تفاوت در ویژگی‌های ژنتیکی بین گونه‌های مختلف می‌باشد. بر این اساس هر گونه‌ای از

6- Trichloroacetic Acid

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

باسیلوس به شرایط بهینه مختلف برای فعالیت پروتئازی نیاز دارد و الگوی هیدرولیزی پروتئینازها ممکن است به دلیل اختصاصی بودن بیان ژن و همچنین جهش ژنی باشد [۱۹]. هیدرولیز پروتئین کنجد و تبدیل آن‌ها به پپتیدها و آمینواسیدهای آزاد برای رشد سلولی نیاز می‌باشد. فانگ و همکاران (۲۰۱۷) هیدرولیز پروتئین پوست نوعی ماهی را مورد بررسی قرار دادند و افزایش غلظت پپتیدها را در طی فرآیند تخمیر توسط *Aspergillus oryzae* گزارش کردند [۲۰]. همچنین جمیل و همکاران (۲۰۱٤) گزارش کردند که *باسیلوس* توانایی خوبی در هیدرولیز پروتئین نوعی ماهی داشت [۲۱] .

۲-۳ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که حداکثر جذب را در ۵۱۷ نانومتر نشان می‌دهد. هنگامی که رادیکال‌های DPPH با یک سوبسترای دهنده پروتون مانند آنتی‌اکسیدان مواجه می‌شوند، رادیکال‌ها از بین می‌روند و جذب کاهش می‌یابد. فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ٤ گونه *باسیلوس* مورد بررسی قرار گرفت. نتایج در شکل ۲ آورده شده است. بیشترین درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH (۷٦٪/٦) مربوط به هیدرولیز پروتئین با *B. coagulans* و کمترین درصد (۵۷/۳٦٪) مربوط به *B. licheniformis* بود. قابلیت مهار رادیکال DPPH به نوع سوبسترای پروتئینی و نوع گونه‌های مورد استفاده در فرآیند تخمیر بستگی دارد به طوری‌که هر گونه *باسیلوس* مکانیسم فعالیت پروتئولیتیکی متفاوتی داشته و پپتیدهایی با اندازه‌های متفاوت تولید می‌کند [۲۲]. اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک به عنوان اسیدهای آمینه اصلی جهت کاهش فرآیند اکسیداسیون در نظر گرفته می‌شوند. حضور این اسیدهای آمینه به بهبود توانایی حذف رادیکال DPPH و فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کمک می‌کند. از این رو، افزایش تعداد این اسیدهای آمینه در توالی پپتیدها در نتیجه تخمیر ممکن است مقاومت در برابر اکسیداسیون محصول غذایی را بهبود بخشد [۲۳]. همچنین گزارش شده است که متیونین پتانسیل بالاتری در کاهش اکسیداسیون چربی دارد .

مارگو و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند که پروتئین هیدرولیز شده عدس با *Aspergillus niger* و *Aspergillus oryzae*فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد [۲٤]. تورینو و همکاران (۲۰۱۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی ضد فشار خون پروتئین هیدرولیز شده عدس توسط *Lactobacillus plantarum* و *Bacillus* را مورد بررسی قرار دادند و پیشنهاد کردند که پپتیدهای فعال زیستی می‌توانند در طی تخمیر توسط پروتئازهای میکروبی تولید شده و خواص بیولوژیکی محصولات تخمیر شده را بهبود بخشند [۲۵]. همچنین والی و همکاران (۲۰۲۰) پروتئین هیدرولیز شده جوانه نخود را مورد ارزیابی قرار دادند و گزارش کردند که پپتید حاصل از پروتئین جوانه نخود فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل و DPPH دارد [۲٦].

۳-۳ احیاء کنندگی یون آهن: سنجش قدرت احیاء کنندگی اغلب برای ارزیابی توانایی یک آنتی اکسیدان در اهدای الکترون یا هیدروژن استفاده می‌شود. بسیاری از گزارش‌ها نشان داده‌اند که ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت احیاء کنندگی برخی از ترکیبات زیست فعال وجود دارد [۲۷]. در این روش، توانایی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد با ٤ گونه *باسیلوس* برای احیای Fe^{3+} به Fe^{2+} ارزیابی شد.خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کنجد می‌تواند باعث احیای آهن فریک به فرم آهن فروس شود. بنابراین، وجود یون Fe^{2+} را می‌توان با اندازه‌گیری تغییر رنگ در طول موج ۷۰۰ نانومتر کنترل کرد. شکل ۳ قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد را توسط گونه‌های *باسیلوس* نشان می‌دهد. با توجه به شکل ۳ *B. pumilus* بیشترین قدرت احیاء کنندگی (۰/۹۹۲) و *B. licheniformis* کمترین قدرت احیاء کنندگی یون آهن (۰/۷۰۸) را در طول موج ۷۰۰ نانومتر نشان داد. تفاوت بین قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده با گونه‌های مختلف احتمالاً به این دلیل است که پپتیدهای تولید شده ممکن است از نظر طول زنجیره و توالی اسیدهای آمینه متفاوت باشند که ناشی از متفاوت بودن مکانیسم آنزیمی گونه‌ها می‌باشد [۲۱].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

۴-۳ شلاته کنندگی یون آهن: افزایش سطح آهن می‌تواند منجر به تشکیل ROS شود که به طور قابل توجهی باعث ایجاد استرس اکسیداتیو در بدن می‌شود. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کنجد می‌تواند ناشی از توانایی آنها در شلاته کردن یون‌های فلزی برای تشکیل اجزای پایدار و محلول در آب باشد. بنابراین، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (Fe^{2+}) در این مطالعه با استفاده از غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد برای بررسی فعالیت بالقوه شلاته کردن فلزات انجام شد. با توجه به شکل ٤ پروتئین هیدرولیز شده توسط تخمیر با *B. subtilis* بیشترین فعالیت شلاته کنندگی ۸۷/۷٪ و کمترین فعالیت شلاته کنندگی ٦٧/١٣٪ مربوط به هیدرولیز توسط *B. licheniformis* بود. فانگ و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده یک نوع ماهی را توسط *آسپرژیلوس اوریزا*، ۸۷٪ گزارش کردند و بیان کردند که علت فعالیت بالای شلاته کنندگی یون آهن توسط *A. oryzae*مربوط به ژن‌های هیدرولیتیک می‌باشد [۲۹]. تفاوت در فعالیت و ویژگی آنزیم‌های پروتئولیتیک باکتریایی منجر به تشکیل محصولات مختلف هیدرولیز می‌شود. همچنین ظرفیت بالاتر شلاته کنندگی یون آهن توسط پروتئین هیدرولیز شده شیر بدون چربی، در نتیجه حضور پپتیدهای حاوی اسید آمینه‌های سیستئین، تریپتوفان، سرین و تیروزین توسط *B. subtilis* است که با یون‌های فلزی برهمکنش ایجاد می‌کنند [۳۰].

۵-۳ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ارزیابی فعالیت آنتی-اکسیدانی کل بر مبنای احیای مولیبدن ٦ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد و مقدار جذب در طول موج ٦٩٥ نانومتر ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی کل را نشان می‌دهد. این روش یک روش کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. با توجه به شکل ۵ بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به *B. coagulans* و کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به *B. subtilis* بود. محققان گزارش کردند که نوع سویه تولید کننده آنزیم پروتئولیتیک و همینطور منبع پروتئین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۳۱]. کروز کازاس و همکاران (۲۰۲۳) پروتئین هیدرولیز شده دانه آمارانت را با تخمیر توسط گونه‌های *باسیلوس* مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج پژوهش آنها نشان داد که گونه‌های *باسیلوس* آنزیم‌هایی با فعالیت پروتئولیتیک بالا تولید کرده که سبب شکستن زنجیره پروتئینی و تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی بالا شد که با نتایج پژوهش ما مطابقت داشت [۳۲].

٤- نتیجه‌گیری: به طور کلی گونه‌های *باسیلوس* دارای فعالیت پروتئولیتیکی بالایی هستند که می‌توان پروتئین‌های هیدرولیز شده کنجاله کنجد با فعالیت زیستی مانند فعالیت-های آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH)، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، قدرت شلاته کنندگی و فعالیت آنتی-اکسیدانی کل) تولید کرد. نتایج نشان داد که گونه‌های *B. pumilus*، *B. coagulans*، *B. licheniformis* و *B. subtilis* دارای فعالیت پروتئازی بوده و فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی نشان دادند که می‌توانند در غذاهای فراسودمند به عنوان مواد مغذی جایگزین جهت پیشگیری از بیماری‌های مختلف مورد استفاده قرار بگیرند.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

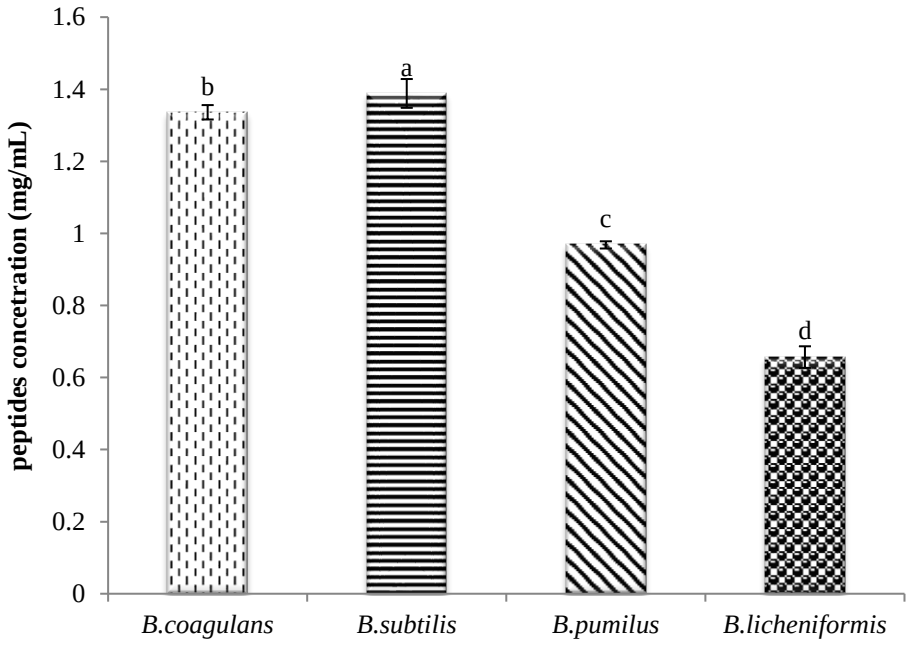

Figure 1: peptide concentration of the sesame meal protein hydrolysate produced by *Bacillus* species in 24 h after fermentation.

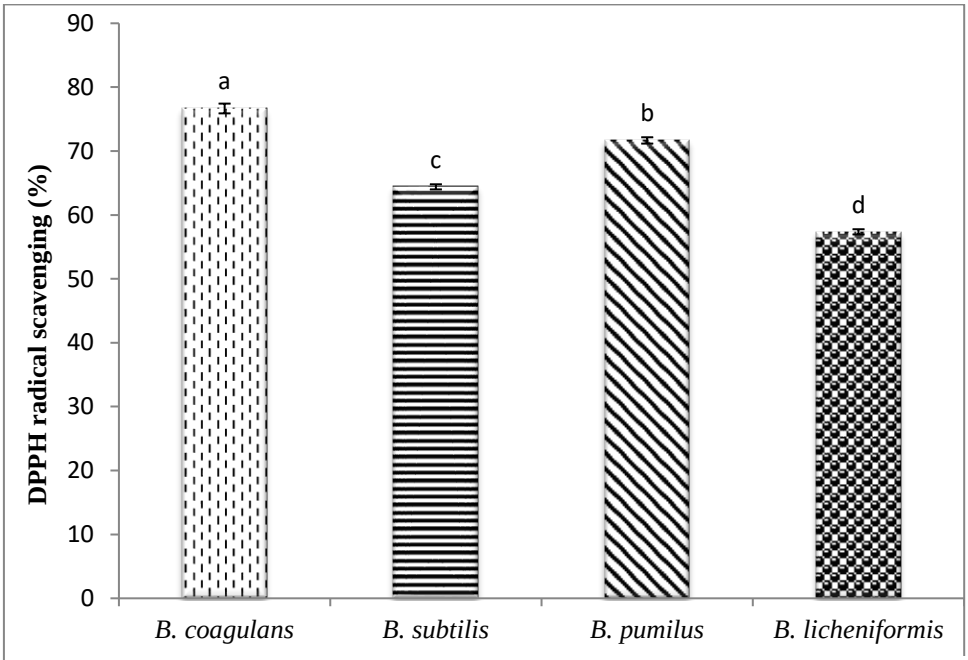

Figure 2: DPPH radical scavenging activity of the sesame meal protein hydrolysate produced by *Bacillus* species in 24 h after fermentation.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

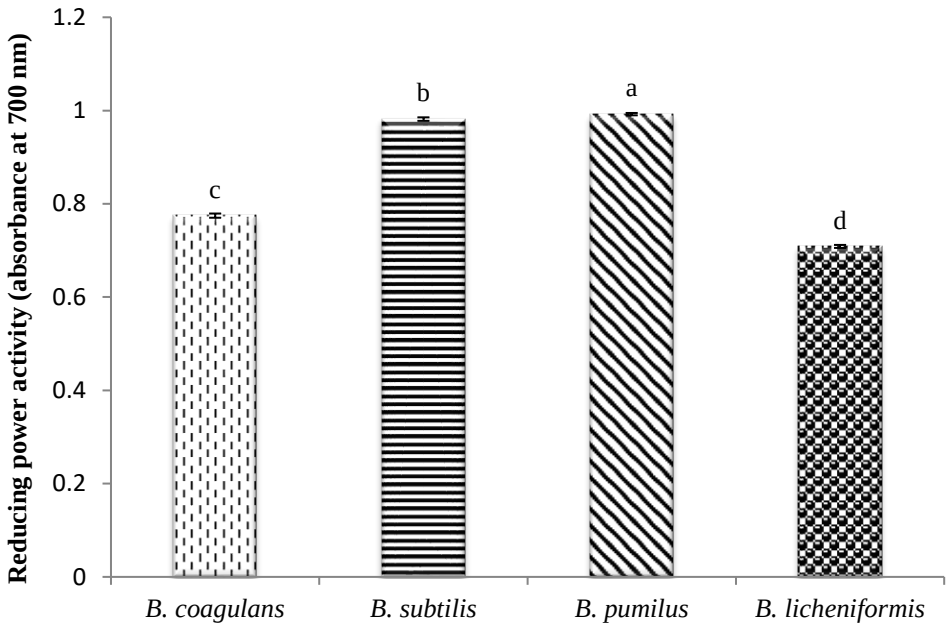

Figure 3: Reducing power activity of the sesame meal protein hydrolysate produced by *Bacillus* species in 24 h after fermentation.

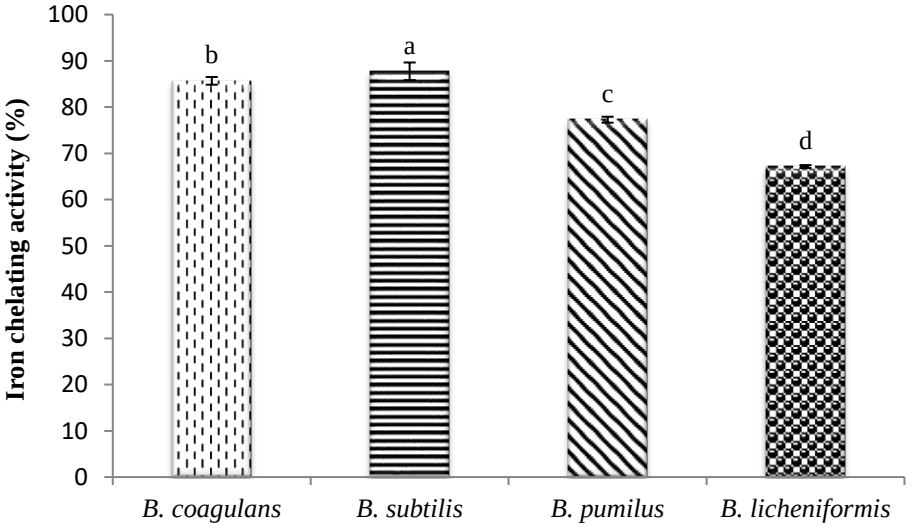

Figure 4: Iron chelating activity of the sesame meal protein hydrolysate produced by *Bacillus* species in 24 h after fermentation.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

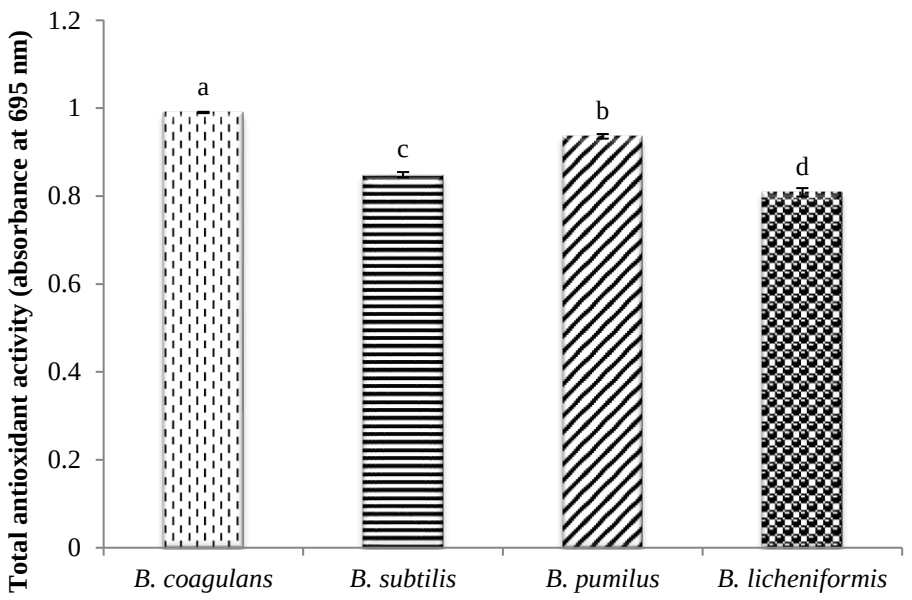

Figure 5: Total antioxidant activity of the sesame meal protein hydrolysate produced by *Bacillus* species in 24 h after fermentation.

۵- منابع

[1] Organisation mondiale de la santé. 2018. World Health Statistics 2018: Monitoring Health for the SDGs Sustainable Development Goals. World health organization.

[2] Nwachukwu, I.D. and Aluko, R.E. 2019. Structural and functional properties of food protein-derived antioxidant peptides. Journal of food biochemistry, 43(1), p.e12761.

[3] Ahmed, M., Verma, A. K., & Patel, R. 2020. Collagen extraction and recent biological activities of collagen peptides derived from sea-food waste: A review. Sustainable Chemistry and Pharmacy, 18, 100315. https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100315.

[4] Leung, R., Venus, C., Zeng, T., & Tsopmo, A. 2018. Structure-function relationships of hydroxyl radical scavenging and chromium-VI reducing cysteine-tripeptides derived from rye secalin. Food Chemistry, 254, 165-169. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.190.

[5] Chalamaiah, M., Ulug, S. K., Hong, H., & Wu, J. 2019. Regulatory requirements of bioactive peptides (protein hydrolysates) from food proteins. Journal of Functional Foods, 58, 123-12. https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.04.050.

[6] Mudgil, P., Omar, L. S., Kamal, H., Kilari, B. P., & Maqsood, S. 2019. Multi-functional bioactive properties of intact and enzymatically hydrolysed quinoa and amaranth proteins. Lwt, 110, 207-213. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.04.084.

[7] Lu, X., Zhang, L., Sun, Q., Song, G., & Huang, J. 2019. Extraction, identification and structure-activity relationship of antioxidant peptides from sesame (*Sesamum indicum L.*) protein hydrolysate. Food Research International, 116, 707-716. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.09.001.

[8] CK Rajendran, S. R., Mohan, A., Khiari, Z., Udenigwe, C. C., & Mason, B. 2018. Yield, physicochemical, and antioxidant properties of Atlantic salmon visceral hydrolysate: Comparison of lactic acid bacterial fermentation with Flavourzyme proteolysis and formic acid treatment. Journal of food processing and preservation, 42(6), e13620.

[9] Jemil, I., Abdelhedi, O., Mora, L., Nasri, R., Aristoy, M. C., Jridi, M., & Nasri, M. 2016. Peptidomic analysis of bioactive peptides in zebra blenny (Salaria basilisca) muscle protein hydrolysate exhibiting antimicrobial activity obtained by fermentation with *Bacillus mojavensis* A21. Process Biochemistry, 51(12), 2186-2197. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2016.08.021.

[10] Jiang, X., Cui, Z., Wang, L., Xu, H., & Zhang, Y. 2020. Production of bioactive peptides from corn gluten meal by solid-state fermentation with Bacillus

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

subtilis MTCC5480 and evaluation of its antioxidant capacity in vivo. Lwt, 131, 109767. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109767.

[11] Chatterjee, R., Dey, T. K., Ghosh, M., & Dhar, P. 2015. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. Food and Bioproducts Processing, 94, 70-81. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.007.

[12] Muhialdin, B. J., Rani, N. F. A., & Hussin, A. S. M. 2020. Identification of antioxidant and antibacterial activities for the bioactive peptides generated from bitter beans (*Parkia speciosa*) via boiling and fermentation processes. Lwt, 131, 109776. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109776.

[13] Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S.-B., Mehiri, M., Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. Process Biochemistry, 49(6), 963-972. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004

[14] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food chemistry, 114(4), 1198-1205. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075.

[15] 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 chemistry, 121(1), 178-184. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027.

[16] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry, 269(2), 337-341.

[17] Sanjukta, S., Padhi, S., Sarkar, P., Singh, S. P., Sahoo, D., & Rai, A. K. 2021. Production, characterization and molecular docking of antioxidant peptides from peptidome of kinema fermented with proteolytic *Bacillus* spp. Food Research International, 141, 110161. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110161.

[18] Nasri, R., Abdelhedi, O., Nasri, M., & Jridi, M. 2022. Fermented protein hydrolysates: biological activities and applications. Current Opinion in Food Science, 43, 120-127. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2021.11.006.

[19] Jensen, M. P., & Ardö, Y. 2010. Variation in aminopeptidase and aminotransferase activities of six cheese related Lactobacillus helveticus strains. International Dairy Journal, 20(3), 149-155.

[20] Fang, Y., Xu, Z. I., Shi, Y., Pei, F., Yang, W., Ma, N., & Hu, Q. 2017. Protection mechanism of Se-containing protein hydrolysates from Se-enriched rice on Pb2+-induced apoptosis in PC12 and RAW264. 7 cells. Food Chemistry, 219, 391-398.

[21] Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S.-B., Mehiri, M., Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. Process Biochemistry, 49(6), 963-972. https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.03.004.

[22] Zhi, T., Li, X., Sadiq, F. A., Mao, K., Gao, J., Mi, S., & Sang, Y. 2022. Novel antioxidant peptides from protein hydrolysates of scallop (Argopecten irradians) mantle using enzymatic and microbial methods: Preparation, purification, identification and characterization. LWT, 164, 113636. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113636.

[23] Hwang, H. S., & Winkler-Moser, J. K. 2017. Antioxidant activity of amino acids in soybean oil at frying temperature: Structural effects and synergism with tocopherols. Food Chemistry, 221, 1168-1177. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.042.

[24] Magro, A. E. A., Silva, L. C., Rasera, G. B., & de Castro, R. J. S. 2019. Solid-state fermentation as an efficient strategy for the biotransformation of lentils: enhancing their antioxidant and antidiabetic potentials. Bioresources and Bioprocessing, 6(1), 1-9.

[25] Torino, M. I., Limón, R. I., Martínez-Villaluenga, C., Mäkinen, S., Pihlanto, A., Vidal-Valverde, C., & Frias, J. 2013. Antioxidant and antihypertensive properties of liquid and solid state fermented lentils. Food chemistry, 136(2), 1030-1037. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.015.

[26] Wali, A., Mijiti, Y., Yanhua, G., Yili, A., Aisa, H. A., & Kawuli, A. 2021. Isolation and identification of a novel antioxidant peptide from chickpea (*Cicer arietinum L.*) sprout protein hydrolysates. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 27, 219-227.

[27] Khantaphant, S., & Benjakul, S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 151(4), 410-419. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2008.08.011.

[28] Mandel, S., Weinreb, O., Reznichenko, L., Kalfon, L., & Amit, T. 2006. Green tea catechins as brain-permeable, non toxic iron chelators to" iron out iron" from the brain. Journal of Neural Transmission-Supplements only, (71), 249-258.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

[29] Fang, Y., Wang, S., Liu, S., Lu, M., Jiao, Y., Chen, G., & Pan, J. 2015. Solid-state fermentation of Acanthogobius hastaprocessing by-products for the production of antioxidant protein hydrolysates with *Aspergillus oryzae*. Brazilian Archives of Biology and Technology, 58, 343-352. https://doi.org/10.1590/S1516-8913201500297.

[30] Corrêa, A. P. F., Daroit, D. J., Fontoura, R., Meira, S. M. M., Segalin, J., & Brandelli, A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin-converting enzyme inhibitory activities. Peptides, 61, 48-55. https://doi.org/10.1016/j.peptides.2014.09.001.

[31] Mansor, A. B., Kahar, A. A., Rahman, S. A., Lelamurni, D., & Razak, A. 2014. Distribution and characterization of indigenous microbes from Malaysian fermented fish products. Functional Food Culture.

[32] Cruz-Casas, D. E., Aguilar, C. N., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Chávez-González, M. L., & Flores-Gallegos, A. C. 2023. Bioactive protein hydrolysates obtained from amaranth by fermentation with lactic acid bacteria and *Bacillus* species. Heliyon, 9(2).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the antioxidant activity of sesame meal protein hydrolysate produced with fermentation by *Bacillus* species

Parisa Raei[1], Morteza Khomeiri[2]*, Alireza Sadeghi Mahoonak[2], Ali Moayedi[3], Mahboobeh Kashiri[3]

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

ARTICLE INFO

Article History:
Received:2024/3/5
Accepted:2024/6/1

Keywords:

Bacillus,

Fermentation,

Sesame meal protein hydrolysate,

Antioxidant

DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80.

*Corresponding Author E-khomeiri@gau.ac.ir

ABSTRACT

Protein hydrolysate is a valuable source of bioactive peptides. The production of protein hydrolysate through the fermentation process is an environmentally friendly approach that is preferred over enzymatic and chemical hydrolysis in most cases. In this research, *Bacillus* species, including *Bacillus pumilus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus licheniformis*, and *Bacillus subtilis*, were employed to hydrolyze sesame meal protein. The investigated tests included measuring the concentration of peptides by the OPA method, DPPH radical inhibition, and iron ion reducing power, total antioxidant activity, and iron ion chelating activity. The concentration of peptides was evaluated after 24 h for *Bacillus* species. The lowest peptide concentration (0.656 mg/mL) was associated with the fermented treatment by *B. licheniformis*, while the highest value (1.38 mg/mL) was observed for the hydrolyzed treatment with *B. subtilis*. A significant difference ($p<0.05$) was observed among all the treatments. Results of DPPH radical inhibition showed the highest inhibition was associated with the samples hydrolyzed by *B. coagulans* (76.6%), and the lowest value was attributed to the hydrolysate by *B. licheniformis* (57.36%). The sample fermented with *B. pumilus* exhibited higher reducing power (0.992 absorbance at 700 nm) with a significant difference ($p<0.05$) observed between the treatments. The highest chelating activity (85.6%) was observed in the sample fermented with *B. subtilis*. The total antioxidant activity demonstrated that the protein hydrolysate with fermentation by *B. coagulans* had the highest absorbance value at 695 nm with a significant difference between the treatments ($p<0.05$). In conclusion, the fermentation of sesame meal protein by *Bacillus* species resulted in the production of protein hydrolysate with substantial antioxidant activity, positioning it as a promising source for inclusion in food formulations.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2025-05-15]

[DOI: 10.22034/FSCT.21.156.80]