



جدا سازی و بررسی خواص زیست فعال پپتید های حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب پنیر سویا

فاطمه مشایخ^۱، رضوان پور احمد^{۲*}، محمد رضا اسحاقی^۳، بهروز اکبری آدرگانی^۴

۱- دانشجوی دکتری، گروه صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۲- استاد، گروه صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۳- استادیار، گروه صنایع غذایی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران.

۴- استاد، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۳/۳۰

کلمات کلیدی:

پپتیدهای زیست فعال،

هیدرولیز آنزیمی،

آب پنیر سویا

امروزه توجه خاصی به استفاده از پپتیدهای زیست فعال در تولید غذاهای فراسودمند و داروها معطوف شده است. در پژوهش حاضر جدا سازی و بررسی خواص زیست فعال پپتید های حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب پنیر سویا مورد بررسی قرار گرفت. برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین آب پنیر سویا، دو نوع آنزیم فیسین و تریپسین در درجه حرارت های ۳۷ و ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان های ۲ و ۴ ساعت به کار گرفته شدند. سپس هیدرولیزات های پروتئینی به دست آمده با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-فاز معکوس تفکیک شده و فراکسیون های بدست آمده برای بررسی فعالیت های زیستی جمع آوری گردیدند. تجزیه و تحلیل نتایج درجه هیدرولیز با استفاده از روش فاکتوریل انجام شد. همچنین از آنالیز واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیل نتایج خواص زیستی (فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی) پپتیدها استفاده گردید. میانگین ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. بر اساس نتایج به دست آمده، فراکسیون های پپتیدی فعالیت آنتی اکسیدانی خوبی داشتند، همچنین اثر ضد میکروبی در برابر *شریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* نشان دادند. فراکسیون T4F7 (فراکسیون هفتم حاصل از هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله تریپسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و ۴ ساعت) دارای بالاترین خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بود که به همین دلیل به عنوان فراکسیون برتر در نظر گرفته شد. الکتروفورگرام مربوط به جداسازی اجزای پپتیدی در فراکسیون پپتید زیست فعال منتخب (T4F7) نشان داد که وجود پپتیدهای با جرم ملکولی غالباً در حدود ۵ تا ۱۰ کیلو دالتون و کمتر از ۵۰ کیلو دالتون عامل اصلی بروز ویژگی‌های مطلوب آنتی اکسیدانی در این تیمار به شمار می رود. بنابراین پپتید حاصل از آب پنیر سویا می تواند به عنوان یک ترکیب فراسودمند و نگهدارنده طبیعی در فرآورده های غذایی استفاده شود.

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.329

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.22.1

* مسئول مکاتبات:

rezvanpourahmad@iauvaramin.ac.ir

۱- مقدمه

با پیشرفت علم و افزایش آگاهی بشر نسبت به تاثیر تغذیه بر سلامتی بدن، زمینه جدیدی از تحقیقات در ارتباط با ترکیبات فعال زیستی ظهور پیدا کرد [۱]. اکسیداسیون چربی ها یکی از موارد نگران کننده در صنایع غذایی است زیرا از جمله عوامل ایجاد کننده طعم و بوی نامطلوب و برخی بیماری ها در بدن است که عامل آن پراکسیداسیون لیپید ها و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مرحله نهایی اکسیداسیون می باشد [۲]. از این رو استفاده از آنتی اکسیدان های مصنوعی در سال های گذشته در صنایع غذایی رایج بوده اما با توجه به نگرانی های شایع مصرف کنندگان در رابطه با آنتی اکسیدان های مصنوعی و به خطر افتادن سلامتی بدن، تحقیقاتی در رابطه با آنتی اکسیدان های طبیعی در دو دهه اخیر انجام شده است. آنتی اکسیدان های مصنوعی نسبت به آنتی اکسیدان های طبیعی فعالیت قوی تری دارند اما به دلیل سمیت این ترکیبات شیمیایی استفاده از آن ها محدود شده است [۳]. با توجه به اهمیت آنتی اکسیدان های طبیعی، تحقیقات زیادی روی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید های زیست فعال انجام شده و مشخص گردیده آنتی اکسیدان های طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان های مصنوعی جهت به تاخیر انداختن فساد مواد غذایی و دارویی می باشند. همچنین بررسی های زیادی پیرامون خواص ضد میکروبی پپتید های زیست فعال انجام پذیرفته است. پپتید های زیست فعال، ترکیباتی با منشا طبیعی بوده که می توان آن ها را از منابع مختلف (گیاهی، حیوانی و دریایی) استخراج کرد و در فرمولاسیون مواد غذایی و دارویی به کاربرد [۴و۵]. در طول دو دهه گذشته، توجه خاصی به پپتید های زیست فعال که از پروتئین های مواد غذایی آزاد می شوند، معطوف شده است [۶]. پپتید های زیست فعال در توالی اصلی پروتئین ها غیر فعال هستند ولی پس از رها سازی به وسیله هیدرولیز آنزیمی از خود خواص چند گانه نشان می دهند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش های مورد استفاده جهت بهبود ویژگی های کاربردی و تغذیه ای پروتئین های غذایی و همچنین تولید پپتید های زیست فعال است. نتایج مطالعات بسیاری از محققان نشان داده که پپتید های حاصل از منابع غذایی مختلف، دامنه وسیعی از فعالیت های بیولوژیکی چندگانه نظیر فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد فشار خون، فعالیت ضد میکروبی و دیگر ویژگی های

سلامت بخش را دارا بوده و به همین دلیل کاربرد های جدیدی را در تهیه فرمولاسیون های غذایی برای گروه های خاص جامعه مثل مبتلایان به دیابت داشته اند [۷]. همایون تبریزی و همکاران، (۱۳۹۳) به جدا سازی و شناسایی یک پپتید جدید آنتی اکسیدانی از بتا کازئین شیر شتر به وسیله پپسین و پانکراتین پرداختند و گزارش دادند که پپتید RQ-8 جدا سازی شده از پروتئین کازئین شیر شتر دارای فعالیت آنتی اکسیدانی است [۸]. کریمی و همکاران (۲۰۲۱) به جداسازی پپتید های زیست فعال از آب ماست و بررسی خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آنها پرداختند. در ابتدا هیدرولیزات های پروتئینی حاصل از تریپسین و پپسین از غشاء اولترافیلتراسیون عبور داده شد و خواص زیست فعال آنها بررسی گردید. در مرحله بعد فراکسیون دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی با استفاده از RP- HPLC خالص سازی گردید. در این مرحله، سه فراکسیون پپتیدی به دست آمد که هر سه خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی خوبی داشتند [۹].

هدف از تحقیق حاضر جدا سازی پپتید های حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب پنیر سویا و بررسی خواص زیست فعال (خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی) آنها بود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه شیر سویا

ابتدا مقدار ۷۰۰ گرم لوبیای تمیز شده سویا به مدت ۶ ساعت در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به نسبت ۳ : ۱ (w/w) نسبت آب به وزن سویا ۳ به ۱ است) خیسانده شد. بعد از جدا کردن پوسته های لوبیا و شستشوی آن، به نسبت ۶:۱ (w/w) نسبت آب به وزن سویا ۶ به ۱ است) لوبیاها به مدت ۳ دقیقه در مخلوط کن با آب جوش تصفیه شده خرد شدند. دمای مخلوط آب و سویا طی خرد کردن حداقل ۸۰ درجه سانتی گراد بود و آنزیم لپوکسیژناز بطور کامل غیر فعال شد. سپس با استفاده از پارچه صافی مخلوط حاصل بخوبی صاف شد و جهت فعالیت مناسبتر باکتریهای آغازگر به شیرابه حاصل مقدار ۱٪ پودر لاکتوز اضافه گردید. شیر سویا پس از حرارت دهی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۲۱ درجه سانتی گراد سریعاً به دمای محیط خنک گردید و قبل از نگهداری در

۲-۲-۴- اندازه گیری چربی

برای اندازه گیری چربی از روش ژریر استفاده شد. ۱۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک داخل بوتیرومتر منتقل گردید. حدود ۱۱ میلی‌لیتر نمونه به داخل بوتیرومتر انتقال داده شد. مقدار ۱ میلی لیتر آمیل الکل داخل بوتیرومتر ریخته شد. دهانه بوتیرومتر با سرپوش آن محکم بسته شد. بوتیرومتر چندین بار سر و ته گردید تا محتویات آن با هم مخلوط شوند. سپس بوتیرومتر به مدت ۵ دقیقه به داخل حمام آب 2 ± 65 درجه سلسیوس قرار داده شد و بعد از این مرحله به سانتیفرز ژریر منقل گردید. سپس بوتیرومتر مجدداً به حمام آب 2 ± 65 درجه سلسیوس انتقال داده شد و بعد از قرار گرفتن آن به حالت سکون به مدت ۳ الی ۱۰ دقیقه، مقدار چربی قرائت شد [۱۵].

۲-۲-۵- اندازه گیری پروتئین

برای اندازه گیری پروتئین با استفاده از روش کج‌لدال انجام پذیرفت. ۰/۵ گرم نمونه به مرحله اول آزمون وارد شد و عملیات هضم آن با ۱۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ در کنار یک قرص کاتالیزور حاوی سولفات سدیم، سولفات مس و دی اکسید سلنیم انجام گردید. در کنار آزمون تیمار، آزمون نمونه شاهد نیز به روش مشابه انجام شد. عملیات هضم تیمار به مدت ۱۲۰ دقیقه ادامه یافت تا رنگ آن به رنگ سبز روشن تغییر یافت. پس از سرد کردن بالن و خروج بخارات اسیدی، عملیات تقطیر توسط سود و بوریک اسید انجام شد و در مرحله تیتراسیون، ازت موجود در نمونه با اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال در حضور معرف متیل رد انجام شد [۱۵].

محاسبه درصد ازت کل به کمک رابطه زیر انجام شد:

$$100 \times m \div [N \times (V2 - V1) \times 1.4]$$

در این رابطه N نرمالیت اسیدکلریدریک، و $V1$ و $V2$ حجم اسیدمصرفی برای نمونه شاهد و تیمار، و m وزن نمونه برحسب گرم می باشد.

۲-۳- مرحله دوم

۲-۳-۱- آماده سازی پروتئین های آب پنیر سویا

برای جدا کردن بخش پروتئینی از آب پنیر سویای تهیه شده در مرحله قبل، از روش تغییر pH و تنظیم pH آب پنیر در محدوده ۰/۰۵ $\pm$ ۴/۶۰ استفاده گردید. برای این کار از اسید کلریدریک ۱ مولار استفاده شد. برای تهیه محلول اسید، ۸/۲۸ میلی لیتر از اسیدکلریدریک غلیظ خریداری شده به تدریج به

یخچال مقدار ماده خشک آن با افزودن آب مقطر یا در صورت لزوم تبخیر آب اضافی آن به ۱۱٪ مواد جامد محلول (بریکس) تنظیم شد [۱۰].

۲-۱-۱- تهیه آب پنیر سویا

شیر سویای استریلیزه به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد رسانده شد. کلرور کلسیم (۰/۱ گرم به ازای هر لیتر شیر) و مخلوط مساوی از استارترهای DVS مزوفیل (لاکتوکوکوس لاکتیس زیر گونه کرموریس) و ترموفیل پنیر (استرپتوکوکوس ترموفیلوس و لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه بولگاریکوس) (بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده ۴۰ گرم به ازای یک تن شیر) اضافه گردید. گرمخانه گذاری در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد صورت گرفت تا اینکه pH به ۴/۵ رسید. در این هنگام دلمه با چاقو به فواصل ۳ cm^۳ برش داده شد و دمای دلمه برش خورده به ۵۵ درجه سانتی گراد رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در این دما نگهداری شد و پروتئین های سویا بخوبی منعقد گردیدند. سپس دلمه به کیسه منتقل و به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد تا مقدار آب بیشتری از دلمه خارج شود [۱۱و۱۲].

۲-۲- آنالیز های آب پنیر سویا

۲-۲-۱- اندازه گیری pH، اسیدیته

اندازه گیری pH و اسیدیته بر اساس روش استاندارد ملی ایران به شماره ۲۸۵۲ انجام شد [۱۳و۱۴].

۲-۲-۲- اندازه گیری ماده خشک

اندازه گیری ماده خشک بر اساس روش استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۵۳ انجام شد [۱۴].

۲-۲-۳- اندازه گیری خاکستر

برای انجام این آزمایش، ابتدا نمونه و بوته چینی بطور جداگانه توزین شدند. حدود ۲ گرم نمونه (از ماده خشک) برداشته شد و داخل بوته چینی ریخته شد. بوته چینی حاوی نمونه به مدت ۱۸-۱۲ ساعت درون کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد قرار داده شد. سپس بوته چینی پس از سرد شدن توزین گردید. در نهایت با استفاده از فرمول زیر درصد خاکستر محاسبه شد [۱۵].

وزن خاکستر = وزن بوته خالی - (وزن بوته + خاکستر).

های ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ میکروگرم در میلی لیتر تهیه شد. از هر کدام از لوله ها ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و به هر کدام ۱ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه شد. نمونه ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند و سپس جذب نمونه ها در طول موج ۵۹۵ نانومتر در برابر یک شاهد خوانده شد.

اندازه گیری غلظت پروتئین در نمونه ها: برای اندازه گیری پروتئین نمونه ها ۲۰ میکرو لیتر از نمونه را برداشته و حجم آن با آب مقطر به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد و سپس به آن ۱ میلی لیتر محلول برادفورد اضافه گردید. نمونه ها ۵ دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب نمونه ها در ۵۹۵ نانومتر در برابر یک شاهد قرائت گردید [۱۶].

۲-۳-۳-۲- هیدرولیز آنزیمی پروتئین های آب پنیر سویا

برای هیدرولیز آنزیمی نمونه ها از دو نوع آنزیم تریپسین و فیسین استفاده شد

الف- هیدرولیز آنزیمی به وسیله تریپسین

مقدار مناسبی از پروتئین های جداسازی شده در ۵۰ میلی مولار بافر فسفات با $\text{pH} = 7/8$ حل شد. برای تهیه محلول بافر، مقدار ۰/۱ مول مونوسدیم فسفات در داخل یک بشر حاوی آب به خوبی حل شد و به آن ۰/۹ مول دی سدیم فسفات افزوده شد. پس از انحلال کافی حجم آن به کمک آب مقطر به یک لیتر رسانده شد و به کمک هیدروکسید سدیم رقیق pH آن به ۷/۸ رسانده شد بدین ترتیب یک لیتر محلول استوک یک مولار بافر فسفات تهیه و در یخچال نگهداری شد. پیش از هر بار مصرف، این محلول به نسبت یک به ۲۰ رقیق شد و به عنوان محلول بافر فسفات ۵۰ میلی مولار مورد استفاده قرار گرفت. با انحلال ۶۰۰ میلی گرم از پروتئین آب پنیر در مقداری آب مقطر و در ادامه به حجم رساندن آن در داخل یک بالن ژوژه به ظرفیت ۱۰۰ میلی لیتر، محلول ۶ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین جهت هیدرولیز آنزیمی در مرحله بعدی آماده شد. جهت هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ به ۱۲/۵ انتخاب شد. محلول پروتئین آماده شده در مرحله قبل در داخل یک بن ماری شیکر دار در دو دمای ۳۷ و ۴۵ درجه سلسیوس تحت همزدن پیوسته با دور ۱۲۵ rpm قرار گرفت و نمونه برداری از آن در دو زمان ۲ و ۴ ساعت انجام شد. در پایان هر مرحله آنزیم تریپسین موجود در تیمار با قرارگیری در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۵ دقیقه غیرفعال گردید و محلول حاصل به مدت ۱۵ دقیقه تحت جداسازی با سانتریفوژ

داخل یک بالن حجمی با ظرفیت ۱۰۰ میلی لیتر و حاوی مقداری آب مقطر وارد کرده و سپس به حجم رسانده شد. سپس نمونه اسیدی شده به کمک همزن گردابی به مدت ۲ دقیقه بهم زده شد. برای جداسازی و جدا کردن پروتئین های آب پنیر سویا از سانتریفوژ یخچال دار (مدل 30Ks-3, Hettich آلمان) استفاده شد و مقدار مناسبی از نمونه آب پنیر عمل آوری شده با اسید، در دور ۵۸۰۰ به مدت ۶۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. با سر ریز کردن نمونه، بخش محلول فوقانی تخلیه شد و باقیمانده موجود در ته لوله سانتریفوژ برای تعدادی از ظروف و با هدف لیوفیلیزه کردن آنها به یخچال با دمای ۲۰- درجه سانتی گراد منتقل گردید. لوله های فالتکون ۵۰ میلی لیتری اختصاص یافته جهت لیوفیلیزه کردن، با حداکثر حجم ۸ میلی لیتر از نمونه به صورت منجمد به آزمایشگاه مجهز به خشک کن انجمادی (مدل Christ, DFR-02 ایران) منتقل شد و در آنجا با صرف زمان ۳۶ ساعت لیوفیلیزه شدند. پس از جمع آوری نمونه های لیوفیلیزه شده به منظور جلوگیری از جذب مجدد آب تا انجام آزمون های بعدی نمونه ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند [۱۲].

۲-۳-۲- اندازه گیری غلظت پروتئین ها و پتیدها

اندازه گیری جذب در ۵۹۵ نانومتر با اسپکتوفتومتر (مدل-Uv-Vis, Heidolph آلمان) انجام گردید و برای مقایسه جذب نمونه های مجهول با جذب نمونه های معلوم با استفاده از یک پروتئین استاندارد، میزان پروتئین نمونه اندازه گیری گردید. این روش از جمله دقیق ترین روش های بیوشیمیایی با استفاده از اسپکتوفتومتر است که در سال ۱۹۷۶ توسط مادیون برادفورد توسعه یافت [۱۶].

تهیه محلول برادفورد: برای تهیه محلول برادفورد ۱۰ میلی گرم پودر کوماسی بریلیانت بلو ۲۵۰-G در ۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی حل شد. ۱۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۹۵ درصد اضافه شد و پس از حل شدن کامل حجم نهایی به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. سپس به کمک کاغذ صافی واتمن با منافذ ۱/۸ میلی متر، دو مرتبه فیلتر شد.

رسم منحنی استاندارد: برای رسم منحنی، محلول استاندارد (آلبومین) با غلظت ۱ میلی گرم بر ۱۰ مولار تهیه گردید. سپس از این محلول به مقادیر ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرو لیتر را در ۵ لوله آزمایش ریخته و حجم هر لوله با آب مقطر به ۱۰۰ میکرو لیتر رسانده شد. به این ترتیب محلول هایی با غلظت

($10,000 \times g$) قرار گرفت. مایع فوقانی حاصل از این مرحله برای هریک از تیمارهای مورد مطالعه به طور جداگانه در لوله فالتکون وارد شده و در فریزر -18°C درجه سلسیوس نگهداری گردید و در مرحله بعدی جهت تهیه نمونه‌های لیوفیلیزه به آزمایشگاه مجهز به خشک کن انجمادی منتقل گردید. تیمارهای منجمد این مرحله با حداکثر حجم ۷ میلی‌لیتر با صرف زمان ۳۶ ساعت لیوفیلیزه شدند. پس از جمع آوری نمونه‌های لیوفیلیزه شده به منظور جلوگیری از جذب مجدد آب تا انجام آزمون‌های بعدی نمونه‌ها در دمای -20°C درجه سلسیوس نگهداری شدند.

ب- هیدرولیز آنزیمی به وسیله فیسین

پروتئین‌های آب پنیر معادل ۱۰۰ میلی گرم پروتئین در ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۰۱ مولار ($\text{pH} = 7/6$) دمای 37°C درجه سانتی گراد) حل شد. ۱ میلی لیتر محلول ۰/۲۵ مولار L-سیستئین ($\text{pH} = 7$) دمای 57°C درجه سانتی گراد و ۱ میلی

لیتر محلول اتیلن دی آمین تترا استیک اسید ۰/۲۵ مولار و ۱ میلی لیتر محلول ۰/۲۵ مولار هیدروکسید سدیم و ۳ میلی لیتر بافر فسفات سدیم ۱ مولار ($\text{pH} = 7$) دمای 37°C درجه سانتی گراد) و ۴ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد، محلول در حمام 37°C درجه سانتی گراد قرار داده شد و بلافاصله آنزیم فیسین به نسبت ۱ به ۱۰ (آنزیم، ۱۰ سوبسترا) در بافر فسفات سدیم ۱ مولار $\text{pH} = 7$ حل شده و به محلول اضافه گردید. آنکوبه کردن محلول در دو زمان ۲ و ۴ ساعت در دو دمای 37°C و 45°C درجه سانتی گراد در حمام آب گرم شیکردار با بهم زدن مداوم (120rpm) ادامه داشت [۱۷و۱۸]. پس از ۳ ساعت، آنزیم در 90°C درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیر فعال شد. محلول حاصل در $10000 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ گردید. مایع فوقانی در دمای -18°C درجه سانتی گراد گذاشته و سپس توسط دستگاه خشک کن انجمادی به پودر تبدیل گردید.

Table 1 The treatments of the study

Treatment	Enzyme	Temperature (degrees Celsius)	Time (hours)
1	trypsin	37°C	2
2	trypsin	37°C	4
3	trypsin	45°C	2
4	trypsin	45°C	4
5	ficin	37°C	2
6	ficin	37°C	4
7	ficin	45°C	2
8	ficin	45°C	4

۶۰ میلی گرم لوسین در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر (۴ میلی گرم در هر میلی لیتر) حل شد. غلظت محلول استاندارد باید در دامنه ۰/۱ تا ۴ میلی گرم در هر میلی لیتر باشد. منحنی استاندارد به صورت جذب در طول موج 340nm در برابر تعداد میکرومول گروه آمین رسم گردید. برای ارزیابی پروتئولیز با پروتئین‌های آب پنیر سویا به عنوان سوبسترا مقدار کمی (معمولاً ۵۰-۱۰۰ میلی مول که حاوی ۵-۱۰۰ میلی گرم پروتئین است به ۱ میلی لیتر OPA در لوله اسپکتروفتومتر اضافه شد و محلول آهسته با وارونه کردن لوله مخلوط شده و برای ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید، گروه‌های آلفا آمینو آزاد شده به وسیله هیدرولیز با OPA و بتا مرکاپتو اتانول واکنش داده و جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج 340nm اندازه گیری شد. مقدار بدست آمده از شاهد کم شده و به درجه هیدرولیز تبدیل

۲-۳-۴- اندازه گیری گروه آمین‌های آزاد (تعیین درجه هیدرولیز)

درجه هیدرولیز به وسیله روش اسپکتروفتومتریک تخمین زده شد [۱۹].

محلول تازه OPA¹ به طور روزانه به صورت زیر تهیه گردید: ۲۵ میلی لیتر سدیم تترا هیدروبورات ۱۰۰ میلی مولار، ۲/۵ میلی لیتر محلول سدیم دودوسیل سولفات ۲۰ درصد (وزنی/ وزنی)، ۴۰ میلی گرم OPA (حل شده در ۱ میلی لیتر متانول) و ۱۰۰ میکرولیتر بتا مرکاپتو اتانول مخلوط شده و با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. تهیه محلول استاندارد:

1. Ortho Phthaldehyde

گردید.

۲-۳-۵- جداسازی و خالص سازی پپتیدهای زیست

فعال

روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) برای جداسازی و خالص سازی پپتیدهای زیست فعال استفاده گردید. برای این منظور ۴۰ میلی گرم از عصاره محلول فریز درای شده در داخل یک لوله آزمایش در ۱ میلی لیتر از محلول A حل شد. این محلول شامل ۱۰٪ استونیتریل، ۰/۰۵٪ تری فلوراستیک اسید TFA در آب بود. پس از انحلال، این لوله آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه تحت سانتریفوژ ۱۴۰۰۰ xg قرار گرفت و سپس از فیلتر ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد. حجم ۲۵۰ μL از نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (D-14163 KNAUER, Knauer آلمان) بر روی ستون C_{18} (250×21.2 mm, 10 μm) تزریق شد. محلول B برای شویش نمونه از روی ستون استفاده شد. این محلول شامل ۰/۰۵٪ TFA در استونیتریل ۶۰٪ و ۴۹/۹۵٪ آب بود. یک گرادیان جریان ۸۰-۰ درصد محلول B طی مدت زمان آزمون تقریبی ۱۰۰ دقیقه اعمال شد. سرعت جریان ۱/۳ mL/min به داخل ستون کروماتوگرافی بود. جذب نمونه ها در طول موج ۲۲۰ نانومتر با استفاده از آشکارساز UV ثبت شد [۲۰ و ۲۱].

۲-۳-۶- تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی هر یک از فراکسیون ها با استفاده از روش DPPH اندازه گیری شد. بر اساس این روش ۵۰۰ μL از محلول اتانولی DPPH (۰/۲ میلی مولار) با ۱۵۰۰ μL از محلول اتانولی فراکسیون مورد مطالعه مخلوط شد و سپس به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در جای تاریک نگهداری گردید. سپس جذب محلول حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نمونه شاهد نیز در شرایط مشابه و یکسان تهیه شد. با این تفاوت که در آن به جای محلول فراکسیون از آب مقطر استفاده شد. جذب این محلول نیز در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد [۲۲ و ۲۳]. میزان مهار کنندگی رادیکال DPPH برای هر یک از فراکسیون ها از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} = \text{درصد مهار کنندگی رادیکال}$$

جذب شاهد

آزمون DPPH در واقع روش ساده ای برای کسب اطلاع از قدرت به دام اندازی رادیکال توسط موادی است که در نمونه وجود دارد. مقدار IC50 در واقع غلظتی از نمونه است که برای به دام اندازی ۵۰ درصد رادیکال های آزاد DPPH نیاز است و از روی منحنی کالیبراسیون از طریق رگرسیون خطی محاسبه و گزارش می شود [۲۴].

۲-۳-۷- اندازه گیری فعالیت ضد میکروبی

الف- فعال سازی باکتری /شریشیا کلی و /استافیلوکوکوس اورئوس

باکتری های /شریشیا کلی PTCC 25922 و /استافیلوکوکوس اورئوس ATCC 25923 هر یک به طور مجزا در محیط کشت پلیت کانت آگار کشت داده شدند بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری، کلنی های آنها در محیط کشت نوترینیت براث کشت داده شدند و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفتند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این محیط کشت به تریپتیک سوی براث انتقال داده شده و مجدداً به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرمخانه گذاری گردیدند [۲۵].

تراکم باکتری ($10^8 \times 1/5$ CFU/mL) با استفاده از روش مک فارلند بوسیله اسپکتروفتومتر تعیین شد. در واقع میزان جذب نور در سوسپانسیون باکتری در طول موج ۶۲۵ نانومتر ۰/۱۳-۰/۰۸ بود.

ب- بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید های زیست فعال تراکم $10^8 \times 1/5$ CFU/mL از هر باکتری به پلیت های حاوی محیط کشت BHA² تلقیح شد. جهت بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتید ها، پودر های لیوفیلیزه این پپتید ها در آب حل شده و محتوای پپتید نهایی ۱ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد. ۲۰ میکرولیتر از محلول هر پپتید (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) به روی دیسک های کاغذی در پلیت ها اضافه شدند و هر پلیت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت برای هر باکتری گرمخانه گذاری گردید. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه گذاری قطر هاله عدم رشد اندازه گیری شد و بر حسب میلی متر گزارش گردید [۲۶].

۲-۴- جداسازی اجزای پپتیدی و تعیین جرم

مولکولی به روش SDS-PAGE

ثبت گردید [۲۷ و ۲۸].

۲-۵- آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری نتایج درجه هیدرولیز با استفاده از روش فاکتوریل انجام شد. آنالیز واریانس یک طرفه برای تجزیه و تحلیل خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی پپتیدها به کار گرفته شد. میانگین ها به روش آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح احتمال ۵ درصد مورد مقایسه قرار گرفتند. نرم افزار SPSS 22.0 استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج حاصله از ترکیبات شیمیایی آب

پنیر سویا

در جدول ۲ ترکیب شیمیایی آب پنیر سویا مشخص گردیده است.

Table 2 Chemical composition of soy whey * (mean± standard deviation)

Chemical composition of soy whey	
pH	4.67±0.02
Acidity (percentage in terms of lactic acid)	1.03±0.03
Fat (%)	0.27±0.02
Ash (%)	1.06±0.04
Dry matter (gr /100gr)	2.92±0.03
(gr /100gr) Protein	0.93±0.04

۳-۱-۱- جدا سازی پروتئین آب پنیر سویا

پس از جدا سازی پروتئین آب پنیر سویا، غلظت پروتئین اندازه گیری شد و مقدار آن $6/50 \pm 0/02$ ($\mu\text{g/ml}$) بود.

۲-۳ اندازه گیری گروه آمین های آزاد (تعیین درجه هیدرولیز) مطابق با جدول ۳ بیشترین درجه هیدرولیز متعلق به تیمار ۸ (هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله فیسین در دما ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت ($p \leq 0/05$) و کمترین درجه هیدرولیز متعلق به تیمار ۱ (هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله تریپسین در دما ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) بود که با سایر تیمارها اختلاف معنی دار داشت ($p \leq 0/05$). در واقع با افزایش دما و زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش پیدا نمود، همچنین هیدرولیز به وسیله فیسین بیشتر از تریپسین صورت گرفت. در یک بررسی مشابه اسماعیل پور، (۱۳۹۴) به جدا سازی و بررسی خواص زیست فعال پپتید های حاصل از هیدرولیز آنزیمی شیر بز پرداخت و گزارش نمود که هیدرولیز به وسیله تریپسین و فیسین باعث به وجود آمدن قطعات

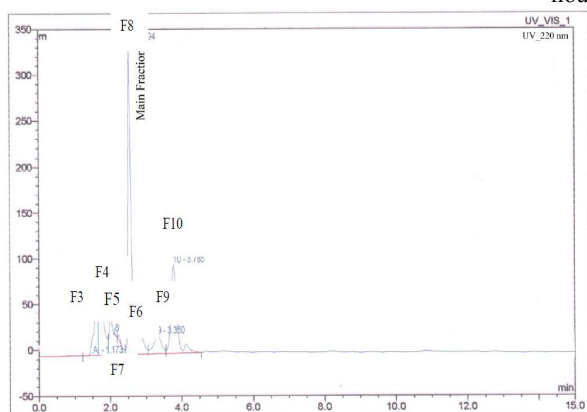
پپتیدی می شود که از نمونه هیدرولیز نشده به طور معناداری بیشتر است. تعداد گروه آمین نشان می دهد که هیدرولیز کازئین به وسیله فیسین بیشتر صورت گرفته است و تریپسین در هیدرولیز پروتئین آب پنیر موفق بوده است. نتایج این مطالعه با نتایج پژوهش انجام گرفته مطابقت دارد [۲۹]. به طور مشابه، میرزایی، (۱۳۹۴) به بررسی هیدرولیز آنزیمی پپتید های زیست فعال حاصل از پروتئین های مخمر *ساکارومایسس سروزیه* پرداخت و دریافت که هیدرولیز به وسیله تریپسین و کیموتریپسین باعث به وجود آمدن قطعات پپتیدی می شود که از نمونه هیدرولیز نشده به طور معناداری بیشتر است [۳۰]. همچنین کرمی و همکاران، (۱۳۹۷) در بررسی هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم پپسین به نتایج مشابهی رسیدند [۳۱]. در یک بررسی مشابه دیگر، کریمی و همکاران (۲۰۲۲) به بررسی هیدرولیز آنزیمی پروتئین آب ماست با استفاده از پپسین و تریپسین پرداختند و دریافتند که قدرت هیدرولیز پروتئین آب ماست توسط آنزیم تریپسین بیشتر از آنزیم پپسین می باشد [۳۲].

Table 3 Degree of hydrolysis of the studied samples * (mean± standard deviation)

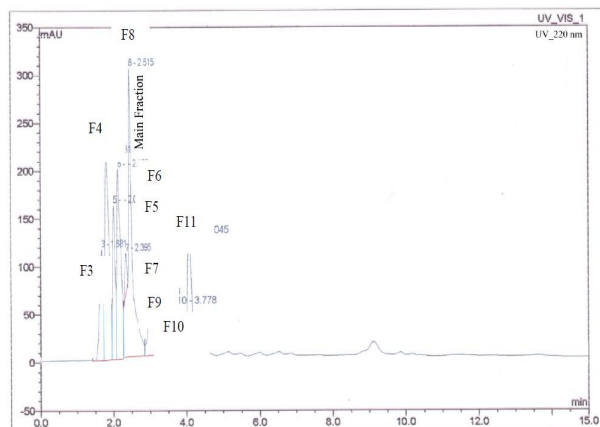
Treatment	Degree of hydrolysis (Percentage)
T1	11.10±0.30 ^g
T2	13.80±0.20 ^f
T3	14.10±0.10 ^f
T4	17.30±0.30 ^e
T5	21.10±0.20 ^d
T6	23.30±0.30 ^c
T7	25.00±0.40 ^b
T8	29.30±0.20 ^a

Dissimilar small letters indicate a significant difference in the column ($p < 0.05$).

T1: trypsin, 37 ° C, 2 hours, T2: trypsin, 37 ° C, 4 hours, T3: trypsin, 45 ° C, 2 hours, T4: trypsin, 45 ° C, 4 hours. T5: Ficin, 37 ° C, 2 hours T6: Ficin, 37 ° C, 4 hours, T7: Ficin, 45 ° C, 2 hours, T8: Ficin, 45 ° C, 4 hours.

**Fig 2** RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 2

در تیمار ۲ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از تریپسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) پیک های T2F8 و T2F10 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

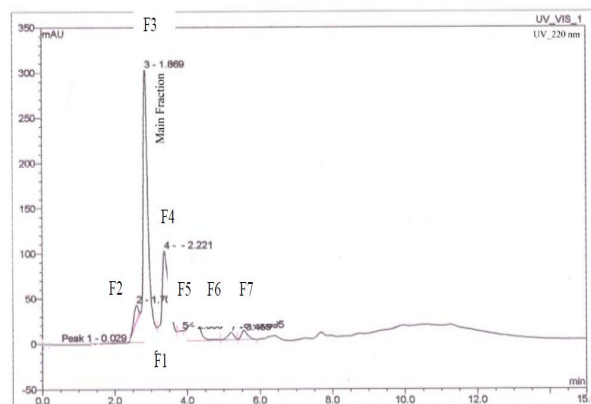
**Fig 3** RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 3

در تیمار ۳ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از تریپسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) پیک های T3F4 و T3F8 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

۳-۳- جدا سازی و خالص سازی فراکسیون

های پپتیدی

در شکل های ۱ الی ۸ کروماتوگرام های RP-HPLC مربوط به فراکسیون های پپتیدی جداسازی شده از تیمارهای مخلف مشخص گردیده اند.

**Fig 1** RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for Treatment 1

در تیمار ۱ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از تریپسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) پیک های T1F3 و T1F4 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

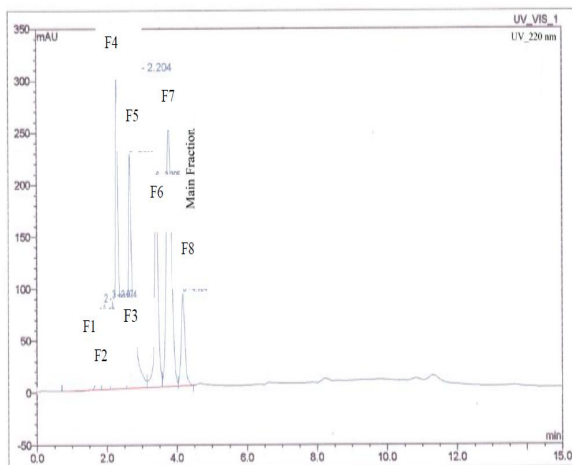


Fig 6 RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 6

در تیمار ۶ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از فیسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) پیک های T6F4 و T6F7 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

در تیمار ۷ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از فیسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) پیک های T7F4 و T7F7 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

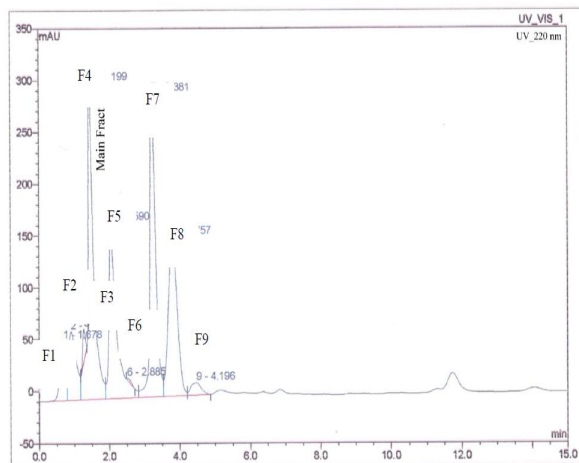


Fig 7 RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 7

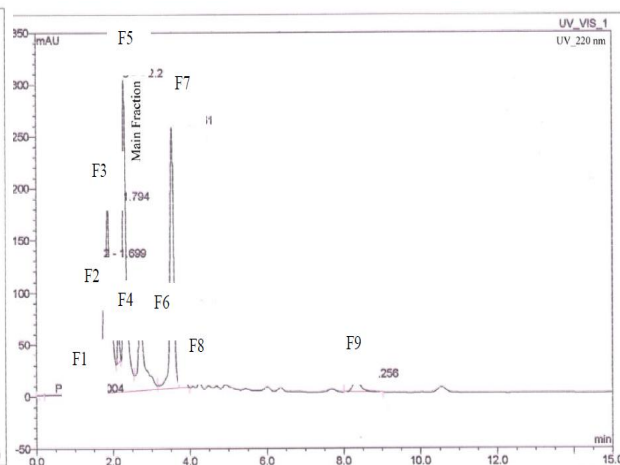


Fig 4 RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 4

در تیمار ۴ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از تریپسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) پیک های T4F5 و T4F7 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

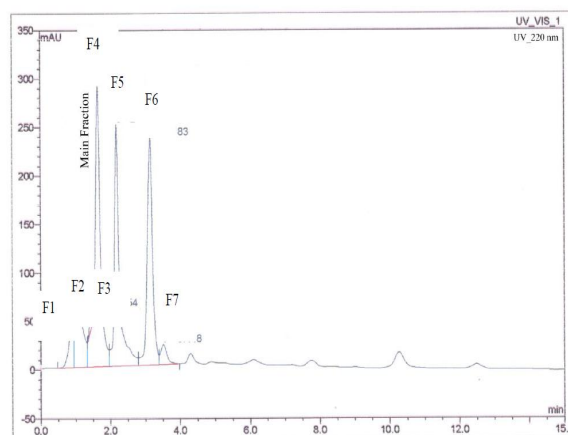


Fig 5 RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 5

در تیمار ۵ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از فیسین در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) پیک های T5F4 و T5F5 به عنوان پیک های شاخص انتخاب شدند.

T4F7 (فراکسیون هفتم حاصل از هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله تریپسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی (بیشترین درصد مهار رادیکال DPPH و کمترین IC_{50}) را داشت. در یک بررسی مشابه، اسماعیل پور (۱۳۹۴) به جدا سازی و بررسی خواص زیست فعال پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی شیر بز پرداخت و گزارش داد هر دو نمونه کازئین و پروتئین های آب پنیر پس از هیدرولیز با هر دو آنزیم تریپسین و فیسین و مخلوطی از هر دو آنزیم، نسبت به نمونه هیدرولیز نشده خود، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری می باشند [۲۹]. همچنین سلامی و همکاران (۲۰۱۱) به مطالعه هیدرولیز آنزیمی کازئین شیر شتر پرداختند. بهترین فراکسیون با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در هیدرولیز کازئین به وسیله فیسین صورت گرفت. این امر باعث افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH شد که با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد [۳۴]. کوسومانینگتیاس و همکاران (۲۰۱۵) نیز به تولید پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آب پنیر تولیدی از شیر بز به وسیله پروتئاز پرداختند و اعلام نمودند پپتیدهای حاصله دارای خواص آنتی اکسیدانی می باشند که با نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر مطابقت دارد [۳۵]. همچنین کمپو و همکاران (۲۰۱۹) به تولید پپتیدهای زیست فعال از آب پنیر مکزیک با استفاده از تریپسین پرداختند و گزارش دادند پپتیدهای حاصله دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند [۳۶]. علاوه بر این کریمی و همکاران (۲۰۲۱) نیز در بررسی پیرامون تولید پپتیدهای زیست فعال از آب ماست به وسیله آنزیم های پپسین و تریپسین، به نتایج مشابهی رسیدند [۹].

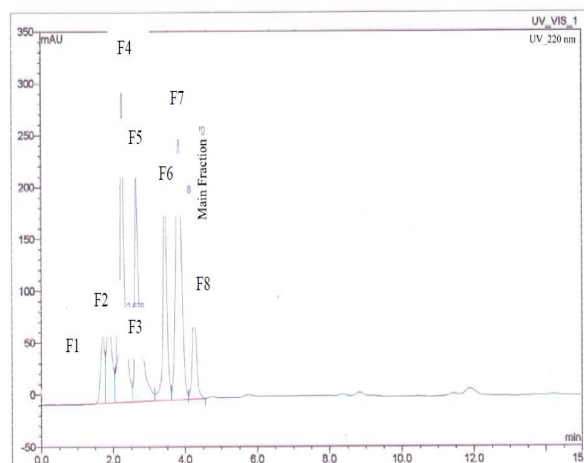


Fig 8 RP-HPLC chromatogram for recording different fractions of peptides isolated for treatment 8

در تیمار ۸ (هیدرولیزات پروتئینی حاصل از فیسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) پیک های شاخص به عنوان پیک T8F7 و T8F4 انتخاب شدند

۳-۴- بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین آب پنیر سویا به وسیله تریپسین و فیسین بر مبنای کاهش رنگ رادیکال DPPH تعیین گردید. پپتیدهای حاصله دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال باید متذکر شد که پپتیدها نقش مهمی در مهار رادیکال های آزاد، شلاته کنندگی یون های فلزی و جلوگیری از اکسیداسیون چربی ها دارند. ترکیبات و ساختار خاص پپتیدها، اتصالات پپتیدی و همچنین خاصیت آبگریزی پپتیدها، در ویژگی آنتی اکسیدانی آن ها مؤثر می باشد. علاوه براین، وجود برخی از آمینواسیدها و موقعیت قرارگیری آن ها در ساختار پپتیدها نیز نقش بسزایی در فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها دارد [۳۳]. بر اساس جدول ۴ فراکسیون

Table 4 Antioxidant activity of peptide fractions of the studied samples * (mean± standard deviation))

Treatment	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	Inhibitory percent of DPPH
T1F3	156.73±0.50 ^e	37.10±0.30 ^k
T1F4	145.83±0.40 ^g	38.80±0.20 ⁱ
T2F8	130.85±0.50 ^h	41.30±0.30 ^h
T2F10	100.80±0.40 ^j	49.10±0.20 ^d
T3F4	130.81±0.51 ^h	42.80±0.20 ^g
T3F8	126.40±0.60 ⁱ	44.00±0.40 ^f
T4F5	88.75±0.25 ^l	60.30±0.30 ^b
T4F7	70.01±0.50 ^m	64.90±0.30 ^a
T5F4	225.12±0.41 ^a	21.10±0.10 ^o
T5F5	188.41±0.60 ^c	27.50±0.50 ^m

T6F4	209.56±0.30 ^b	25.50±0.40 ⁿ
T6F7	157.42±0.4 ^c	29.10±0.10 ^l
T7F4	170.31±0.6 ^d	29.10±0.20 ^l
T7F7	151.30±0.60 ^f	38.10±0.20 ^j
T8F4	100.80±0.40 ^j	44.60±0.03 ^e
T8F7	93.75±0.25 ^k	49.90±0.10 ^c

Dissimilar small letters indicate a significant difference in the column ($p < 0.05$).

۳-۵- بررسی فعالیت ضد میکروبی

خاصیت ضد میکروبی پپتیدهای جدا شده حاصل از هیدرولیز آنزیمی آب پنیر سویا به وسیله آنزیم تریپسین و فیسین علیه باکتری *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* تعیین گردید. بر اساس جدول ۵ بیشترین قطر هاله عدم رشد در برابر *اشریشیا کلی* و *استافیلوکوکوس اورئوس* به ترتیب برابر با ۷ و ۱۵ تعیین گردید که مربوط به فراکسیون T4F7 (فراکسیون هفتم هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله تریپسین در دما ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۴ ساعت) بود و بین این دو قطر اختلاف معنی دار وجود داشت ($p \leq 0.05$). کمترین قطر هاله عدم رشد در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* برابر با ۸mm تعیین شد که مربوط به فراکسیون T7F7 (فراکسیون هفتم هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله فیسین در دما ۴۵ درجه سانتی گراد و زمان ۲ ساعت) بود. در حالیکه کمترین قطر هاله عدم رشد در برابر *اشریشیا کلی* (۵mm) در ۱۱ فراکسیون مشاهده شد و بین این دو قطر نیز اختلاف معنی دار وجود داشت ($p \leq 0.05$). اثر ضد میکروبی فراکسیون های پپتیدی در برابر *استافیلوکوکوس اورئوس* بیشتر از *اشریشیا کلی* بود. در خصوص اثر ضد میکروبی پپتیدهای زیست فعال باید متذکر شد که این پپتیدها

با تشکیل ساختارهای آمفی پاتیک در سطح غشاء میکروبها سبب نفوذ در غشا و اختلال در عملکرد غشا میکروب شده و از این طریق فعالیت ضد میکروبی خود را نشان می دهند [۳۷]. در یک بررسی مشابه، پریچارد و همکاران (۲۰۱۰) به شناسایی پپتیدهای فعال زیستی در پنیر چدار تجاری پرداختند و دریافتند که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱۰ کیلو دالتون فعالیت مهار کنندگی بالایی علیه *اشریشیا کلی* و *باسیلوس سرئوس* دارند [۳۸]. همچنین تئولیر و همکاران (۲۰۱۳) به بررسی فعالیت ضد میکروبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین های آب پنیر پرداختند و گزارش دادند که پپتید حاصل از هضم پروتئین های آب پنیر به وسیله تریپسین و کیمو تریپسین فعالیت ضد میکروبی علیه *لیستریا ایوانوی* و *اشریشیا کلی* نشان نمی دهند ولی پپتیدهای حاصل از هضم به وسیله پیسین فعالیت ضد میکروبی بالایی دارند [۳۹]. کریمی و همکاران (۲۰۲۱) نیز در بررسی پیرامون تولید پپتیدهای زیست فعال از آب ماست، گزارش دادند که فراکسیون های پپتیدی حاصله اثر ضد میکروبی در برابر *اشریشیا کلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *سالمونلا تیفی موریوم* و *لیستریا منوسیتوژنز* دارند [۹].

Table 5 Diameter of growth inhibition zone of peptide fractions against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* * (mean± standard deviation)

Treatment	Diameter of growth inhibition zone against <i>Escherichia coli</i> (mm)	Diameter of growth inhibition zone against <i>Staphylococcus aureus</i> (mm)
T1F3	6.00±1.00 ^{gh}	11.00±1.00 ^{bc}
T1F4	6.00±0.00 ^{gh}	12.00±1.00 ^b
T2F8	6.00±1.00 ^{gh}	12.00±1.00 ^b
T2F10	5.00±0.00 ^h	11.00±1.00 ^{bc}
T3F4	5.00±0.00 ^h	10.00±1.00 ^{cd}
T3F8	6.00±1.00 ^{gh}	11.00±0.00 ^{bc}
T4F5	5.00±0.00 ^h	12.00±0.00 ^b
T4F7	7.00±1.00 ^{fg}	15.00±1.00 ^a
T5F4	5.00±0.00 ^h	9.00±1.00 ^{de}
T5F5	5.00±0.00 ^h	9.00±0.00 ^{de}
T6F4	5.00±0.00 ^h	10.00±1.00 ^{cd}
T6F7	5.00±0.00 ^h	9.00±1.00 ^{de}
T7F4	5.00±0.00 ^h	10.00±1.00 ^{cd}
T7F7	5.00±0.00 ^h	8.00±1.00 ^{ef}
T8F4	5.00±0.00 ^h	10.00±1.00 ^{cd}

T8F7	5.00±0.00 ^h	10.00±1.00 ^{cd}
Dissimilar small letters indicate a significant difference in the column (p < 0.05).		

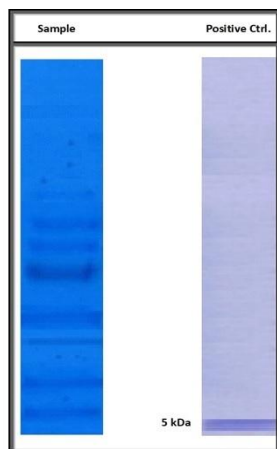


Fig 9 SDS-PAGE analysis of bioactive peptide
*The columns from left to right are sample (bioactive peptide) and positive control, respectively.

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه با بکار گیری دو آنزیم پروتئولیتیک فیسین و تریپسین امکان ایجاد و جدا سازی پپتید های حاصل از آب پنیر سویا که دارای خواص زیست فعال می باشند، بررسی گردید. پس از افزودن این دو آنزیم، هیدرولیزات های پروتئینی به دست آمده با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا-فاز معکوس تفکیک شده و فراکسیون های بدست آمده برای بررسی فعالیت های زیستی جمع آوری گردید. این فراکسیون ها فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی خوبی نشان دادند. فراکسیون T4F7 (فراکسیون هفتم حاصل از هیدرولیزات پروتئینی تهیه شده به وسیله تریپسین در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد و ۴ ساعت) دارای بالاترین خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بود، بنابراین این فراکسیون به عنوان فراکسیون برتر در نظر گرفته شد. الکتروفورگرام مربوط به جداسازی اجزای پپتیدی در فراکسیون پپتید زیست فعال منتخب (T4F7) نشان داد که وجود پپتیدهای با جرم ملکولی غالباً در حدود ۵ تا ۱۰ کیلو دالتون و کمتر از ۵۰ کیلو دالتون عامل اصلی بروز ویژگی های مطلوب آنتی اکسیدانی در این تیمار به شمار می رود.

۳-۶- نتایج جداسازی اجزای پپتیدی و تعیین

جرم مولکولی

در شکل ۹ تصویر الکتروفورگرام مربوط به جداسازی اجزای پپتیدی در فراکسیون پپتید زیست فعال منتخب با بالاترین ویژگی آنتی اکسیدانی (تیمار T4F7) مربوط به نمونه هیدرولیز آب پنیر سویا نشان داده شده است. در این تصویر تعدادی لکه ظاهر شده که مربوط به جداسازی پپتیدهای مختلف می باشد که مقایسه آن در کنار الکتروفورگرام مربوط به نمونه کنترل مثبت به وضوح نشان دهنده وجود پپتیدهای با جرم ملکولی غالباً در حدود ۵ تا ۱۰ کیلو دالتون و کمتر از ۵۰ کیلو دالتون است که عامل اصلی بروز ویژگی های مطلوب آنتی اکسیدانی در این تیمار به شمار می روند. همچنین در این تصویر تعداد دیگری از پپتیدهای زیست فعال در جرم های مولکولی بالاتر نیز وجود دارند که میتواند به آگلومراسیون پپتیدها و ظهور در جرم های مولکولی بالاتر پیش از زمان آزمون مربوط باشد. دانشمند (۱۳۹۲) به بررسی استخراج و خالص سازی پپتید ضد میکروبی جدید از گیاه عناب پرداخت. آنالیز الگوی الکتروفورزی عصاره خام و پپتید های خالص شده با استفاده از SDS-PAGE انجام شد و یک باند پروتئینی با وزن ملکولی کمتر از ۵/۸ کیلو دالتون بدست آمد [۴۰]. پانچال و همکاران (۲۰۲۰) به شناسایی و تولید پپتید های آنتی اکسیدانی مشتق شده از تخمیر شیر بز توسط لاکتوباسیلوس فرمنتوم پرداختند. به منظور بررسی وزن ملکولی پپتید ها از روش SDS-PAGE استفاده کردند. وجود پپتیدهای با جرم ملکولی غالباً در حدود ۱۰ تا ۳۱۵ کیلو دالتون در شیر بز تخمیر نشده و ۱۰ تا ۵۱ کیلو دالتون در شیر بز تخمیر شده گزارش شد [۴۱].

۵- منابع

- [11] Chumchuere, S., MacDougall, D.B. and Robinson, R.K. . 2000. Production and properties of a semi-hard cheese made from soyamilk. *International Journal of Food Science and Technology*, 35, 577-581.
- [12] Liu, D., Yang, L. Liang, S. Z. and Wang, J. 2006. Survivability of *Lactobacillus rhamnosus* during the preparation of soy cheese. *Food Technology and Biotechnology*, 44, 417-422.
- [13] Anonymous. 2007. Iranian institute of standards and industrial research. Milk and its products - determination of acidity and pH - test method, National Standard of Iran No.2852.
- [14] Anonymous. 1995. Iranian institute of standards and industrial research. Cheese and processed cheeses - determining the amount of total dry matter, National Standard of Iran No. 1753.
- [15] Parvaneh, V. 2010. Quality control and the chemical analysis of foods. University of Tehran Publications (in Persian).
- [16] Bradford, M. . 1976. A rapid and sensitive method for the qualification of microgram quantities of protein utilizing the principle of Protein-Dye Binding. *Journal of Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- [17] Liener, I. and Friedenson, E. B. 1970. Ficin.Methods Enzymology. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 19, 261-273.
- [18]. Pierro Dassios, G., Keefea, MB. Poyaikov, A. Lomolino, G. and Fitzgerald, RJ. 2014. Antioxidant activity of bovine casein hydrolysates produced by ficus carica L-derived proteinase. *Food Chemistry*, 156, 305-312.
- [19] Church, F.C., Swaisgood, H.E. Porter, D.H. and Catignani, G.L. 1983. Spectrophotometric Assay Using O-Phthaldehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *Journal of Dairy Science*, 66, 1219-1227.
- [20] Pownall, T. L., Udenigwe, C. C. and Aluko, R. E. 2010. Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisumsativum* L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4712-4718.
- [21] Garcia, A., Cardador, A. Campo, S. Arvizu, MS. Tostado, CE. Gonzalez, RC. Almendarez, GB. and Liano, AS. 2013. Influence of Probiotic Strains Added to Cottage Cheese on Generation of Potentially
- [1] Park, Y.W. 2009. Bioactive components in goat milk. *Journal of Dairy Food*, 11, 43-82.
- [2] Li, Y.W., Li, B. Hi, J. and Qian, P. 2011. Structure activity relationship study of antioxidative peptides modeling: the aminoacid next to c-terminus affects the activity. *Journal of Peptide Science*, 17, 454-462.
- [3] Ito, N., Hirose, M. Fukushima, S. Tsuda, H. Shirai, T. and Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: the carcino genic and modifying effects on chemical carcino genic. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1099-1102.
- [4] Gobetti, M., Hui, Y.H. and Willy, J. 2007. Bioactive peptides in dairy products. *Hand Book of Food Products manufacturing*, 489-517.
- [5] Bazinet, L. and Firdaus, L. 2009. Membrane processes and devices for separation of bioactive peptides. *Recent Patents on Biotechnology*, 3, 61-72.
- [6] Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Bioactive Peptides: Productionand functionality. *Internatinal Dairy Journal*, 16(9), 1945-960.
- [7] Akbari Adregani, B. and Shabani,P.2018. Evaluation of physicochemical and functional properties of hydrolyzed protein obtained from cottonseed meal by alkalase enzyme. *Journal of Research and Innovation In Food Science and Technology*, (84) 15, 313-301(in Persian).
- [8] Homayoun Tabrizi, M., Asoudeh, A. and Shabestarian, H. 2014. Isolation and identification of a new antioxidant peptide from camel milk beta casein with pepsin and pancreatin. *Islamic Azad University, Mashhad Branch*, 56-45(in Persian).
- [9]. Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S. and Eyvazzadeh, O. 2021. Isolation and purification of bioactive peptides from yogurt whey: application as a natural preservative in a model food system. *Journal of Food Processing and Preservation* 45 (12). DOI: 10.1111/jfpp.16086.
- [10]. Ting, C. , Lein, J. Chang, C. and Sheng, C.T. 2009. Use of ultrasound for characterizing the gelation process in heat induced CaSO4.2H2O tofu curd. *Journal of Food Engineering*, 93, 101-107.

- and identification of peptides with antioxidant properties from wheat germ protein using pepsin enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*, (4) 13, 39-50 (in Persian).
- [32] Karimi, N., Pourahmad, R., Taheri, S. and Eyvazzadeh, O. 2022. Preparation and Investigation of Bioactive Properties of Protein Hydrolysates from Yogurt Whey. *Journal of Food Biosciences and Technology* 12 (3): 1-14.
- [33] Sarmadi, B.H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- [34] Salami, M., Moosavi-Movahedi, A.A. Moosavi-Movahedi, F.Ehsani, M.R. Yousefi, R. Farhadi, M. Niasari-Naslaji, A. Saboury, A.A. Chobert, J. and Heartle, T. 2011. Biological activity of camel milk casein following enzymatic digestion. *Journal of Dairy Research*, 78, 471-478.
- [35] Kusumaningtyas, E., Widiastuti, R. Kusumaningrum, HD. and Suharton, MT. 2015. Antimicrobial and antioxidative activities of peptides from goat milk hydrolysed with various protease. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*, 20 (3), 175-183.
- Antioxidant Peptides, Anti-Listerial Activity and Survival of Probiotic Microorganisms in Simulated Gastrointestinal Conditions. *International Dairy Journal*, 33 (2), 191-197.
- [22] Rafeii, Z., Jafari, S. Alami, M and Khomeiri, M. 2012. Antioxidant effect of microwave-assisted extracts of olive leaves on sunflower oil. *Journal of Agriculture and Science Technology*, 14, 1497-1509.
- [23] Liu, X., Zhao, M. Wang, J. Yang, B. and Jiang, Y. 2008. Antioxidant activity of methanolic extract of emblica fruit (*Phyllanthusemblica*.) from six regions in china. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21, 219-228.
- [24] Najgebauer, D., Sady, M. Grega, T and Walczycka, M. 2011. The impact of tea supplementation on microflora, pH and antioxidant capacity of yoghurt. *International Dairy Journal*, 21(8), 568-574.
- [25] Pritchard, S., Phillips, R. and Kialasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial cheddar cheese. *Food Research International*, 43, 1545-1548.
- [26] Motta, AS. And Brandelli, A. 2002. Characterization of an antibacterial peptide produced by *Brevi bacterium linens*. *Journal of Applied Microbiology*, 92(1), 63-70.
- [27] Veerapandian, R., Paudyal, A. and Chang, A. 2021. Separation of bioactive small molecules, peptide from natural products and proteins from pathogenic microbe by rotofor-based preparative isoelectric focusing (IEF) method. *Journal of visualized Experiments*, 160, 1-15.
- [28] Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- [29] Ismailpour, M. 2015. Isolation and evaluation of bioactive properties of peptides obtained from enzymatic hydrolysis of goat milk. PhD Thesis in Food Industry, Islamic Azad University, Research Sciences Branch (in Persian).
- [30]. Mirzaei, M. 2015. Production and isolation of bioactive peptides obtained by enzymatic hydrolysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins with antioxidant and antimicrobial properties. PhD Thesis in Food Industry, Islamic Azad University, Research Sciences Branch (in Persian).
- [31] Karami, Z., Peyghambaroust, H. Hesari, J. And Akbari Adregani, b. 2018. Isolation
- [36] Campo, S., Basilio, P. Alnarez, J. Melchor, S. Galinolo, K. Dominguez, A. and Cardador, A. 2019. Production of antioxidant and ACEI peptides from cheese whey discarded from Mexican white cheese

- production. Food Chemistry, 8 (6), 2-10.
- [37] Memarpour Yazdi, M. AndAsoudeh, a. 2010. Identification and isolation of peptides with antimicrobial activity from egg white lysozyme. Journal of Innovation In Food Science and Technology, 6-1(in Persian).
- [38] Pritchard, S., Phillips, R. and Kialasapathy, K. 2010. Identification of bioactive peptides in commercial cheddar cheese. Food Research International, 43, 1545-1548.
- [39] Theolier, J., Hammami, R. Labelle, P. Fliss, I. and Jean, J. 2013. Isolation and identification of anti microbial peptides derived by peptic cleavage of whey protein isolate. Journal of functional Foods, 5, 706-714.
- [40] Daneshmand, F.2012. Extraction and purification of new antimicrobial peptide from jujube. Journal of Cellular and Molecular Research (Iranian Journal of Biology), 27(2). 211-223 (in Persian).
- [41] Panchal, Gauravkumar., Hati, Subrota. Sakure, Amar. 2020. Characterization and production of novel antioxidative peptides derived from fermented goat milk by L. Fermentum. LWT, 119(108).



Isolation and Evaluation of Bioactive Properties of Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysis of Soy whey

Mashayekh, F. ¹, Pourahmad, R. ^{2*}, Eshaghi, M. R. ³, Akbari-Adergani, B. ⁴

1. PhD Student, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

2. Professor, Department of Food Science and Technology, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran.

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

4. Professor, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health, Treatment and Medical Education, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received 2022/ 05/ 11

Accepted 2022/ 06/ 20

Keywords:

Bioactive peptides,
Enzymatic hydrolysis,
Soy whey

DOI: 10.22034/FSCT.19.125.329

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.125.22.1

*Corresponding Author E-Mail:
rezvanpourahmad@iauvaramin.ac.ir

Today, special attention is paid to the use of bioactive peptides in the production of functional foods and drugs. In the present study, isolation and evaluation of bioactive properties of peptides derived from enzymatic hydrolysis of soy whey were investigated. For enzymatic hydrolysis of soy whey protein, two types of enzymes, ficin and trypsin, were used at temperatures of 37 °C and 45 °C and at times of 2 and 4 hours. Then, the obtained protein hydrolysates were separated by reverse phase- high performance liquid chromatography and the obtained fractions were collected for biological activity. Statistical analysis of hydrolysis degree results was conducted by factorial method. One-way analysis of variance was used to analyze the results of the bioactive properties of peptides. The means were compared by Duncan's multiple range test at 5% probability level. Based on the results, peptide fractions had good antioxidant activity and also showed antimicrobial effect against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. The T4F7 fraction (the seventh fraction obtained from trypsin-prepared protein hydrolyzate at 45 °C for 4 hours) had the highest antioxidant and antimicrobial properties. Therefore, this fraction was considered as the superior fraction. Electrophoregram of separation of peptide components in the selected bioactive peptide fraction (T4F7) showed that the presence of peptides with a molecular mass often of about 5 to 10 kDa and Less than 50 kDa is the main cause of desirable antioxidant properties in this treatment. Therefore, soy whey peptide can be used as a functional ingredient and natural preservative in food products.