مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

# ارزیابی خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا

**اندیشه توکلی[۱]، رضا فرهمندفر[۲]، علی معتمدزادگان[۳]، پیمان آریایی[۴]، مریم اثنی عشری[۵*]**

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

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

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

۵- استادیار، بخش تحقیقات فرآوری تولیدات دامی، موسسه تحقیقات علوم دامی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، کرج، ایران

**اطلاعات مقاله**

**تاریخ های مقاله :**

**تاریخ دریافت: ۱۴۰۳۰۳/۲۲**

**تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲**

**کلمات کلیدی:**

پروتئین هیدرولیز شده،

جلبک اسپیرولینا،

خاصیت آنتی اکسیدانی،

خواص عملکردی.

**DOI: 10.22034/FSCT.22.161.69.**

* مسئول مکاتبات:

m.asnaashari@yahoo.com

**چکیده**

هیدرولیز آنزیمی پروتئین جلبک اسپیرولینا، منجر به افزایش ارزش پروتئینی آن و تولید پپتیدهای بیولوژیکی و عملکردی می‌شود که قابلیت هضم و جذب بالا و خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی دارند. در این پژوهش، خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا بررسی شود. در روند ارزیابی، ابتدا پروتئین‌های جلبک اسپیرولینا با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم طی زمانهای مختلف ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه هیدرولیز شدند. سپس، درجه هیدرولیز، بازیافت پروتئینی، خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به وسیله آزمون‌های مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) DPPH و (Ferric Reducing Antioxidant Power) FRAP و ویژگی‌های عملکردی پپتیدها نیز شامل حلالیت، ظرفیت و پایداری کف کنندگی و امولسیون مورد.مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج این ارزیابی‌ها نشان داد که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بالا بوده و می‌توانند به عنوان مهارکننده‌های رادیکال‌های آزاد عمل کنند. همچنین، ویژگی‌های عملکردی مناسبی نیز در پپتیدها مشاهده شد که نشان از قابلیت آنها در کاربردهای مختلفی مانند صنایع غذایی دارند. همچنین بر اساس نتایج آنزیم آلکالاز توانایی بالاتری در تولید پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون، محتوای پروتئینی و بازیافت پروتئینی بالاتر، و همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عملکردی بهتری نسبت به آنزیم فلاورزایم دارا بود و زمان هیدرولیز نیز تاثیر مثبتی بر پارامترهای فوق داشت. بنابراین، پژوهش حاضر نشان می‌دهد که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی هستند و می‌توانند به عنوان ترکیبات مفید در محصولات غذایی و سایر صنایع مورد استفاده قرار گیرند.

## ۱-مقدمه

پپتیدهای زیست فعال دارای بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که جرم مولکولی آن‌ها کمتر از ٦٠٠٠ دالتون و دارای ۲-۲۰ آمینو اسید می‌باشند. این پپتیدها در ساختار پروتئینی اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند، از جمله این تأثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی، ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد فشار خون و ضد سرطان اشاره نمود [۱، ۲]. در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری مانند شیر، لوبیای سویا، جوانه گندم، کانولا، پروتئین زرده‌ی تخم مرغ، صدف خوراکی و ضایعات ماهی و میگو تولید شده اند [۳، ٤]. در بین منابع گیاهی، دریایی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع دریایی، به ویژه جلبک‌ها به دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، مورد توجه بیشتر قرار گرفته‌اند [٥، ٦].

جلبک اسپیرولینا یک جلبک سبز-آبی است که در آب شیرین و دریاها یافت می‌شود. این جلبک به علت ترکیبات مغذی فراوانی که در آن وجود دارد، مورد توجه قرار گرفته است. اسپیرولینا حاوی پروتئین بالا (٦٠-٧٠٪)، کربوهیدرات (۲۰-۳۰٪)، لیپیدها (۲۰-۳۰٪)، ویتامین‌های ضروری (مانند ویتامین C و ویتامین B12 و E)، مواد معدنی (مانند آهن، کلسیم و منیزیم)، اسیدهای چرب امگا-۳، آنتی‌اکسیدان‌ها و کاروتنوئیدها است [۷، ۸]. این ترکیبات مغذی می‌توانند به عنوان یک منبع تغذیه کامل و مفید برای بدن انسان عمل کنند. اسپیرولینا همچنین به دلیل قابلیت تولید بالای پروتئین، می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئین گیاهی برای افرادی که رژیم غذایی گیاهی دنبال می‌کنند، مورد استفاده قرار گیرد [۸]. پروتئین‌های موجود در جلبک اسپیرولینا شامل اسید آمینه‌های ضروری و غیرضروری است که برای ساخت و نمو سلول های بدن مورد نیاز هستند. یکی از روش‌های استفاده از پروتئین جلبک اسپیرولینا تولید پروتئین هیدرولیز شده، با استفاده از آنزیم‌ها است. آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورها عمل کرده و فرآیند هیدرولیز پروتئین‌های جلبک را آغاز می‌کنند. هیدرولیز پروتئین‌ها به معنای تجزیه آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر است که به راحتی توسط بدن هضم می‌شوند [۲]. یکی از عوامل بسیار حائز اهمیت و تعیین‌کننده در فرآیند هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های تجاری، انتخاب مناسب آنزیم پروتئاز می‌باشد. انواع مختلفی از آنزیم‌های تجاری می باشند که با موفقیت واقعی در فرآیند هیدرولیز پروتئین‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این انتخاب دقیق و صحیح آنزیم پروتئاز می‌تواند تأثیر قابل توجهی در بهبود فعالیت و کارایی هیدرولیز پروتئین‌ها داشته باشد و در نهایت به بهبود کیفیت و خواص محصولات غذایی منجر شود. از جمله آنزیم‌های مورد استفاده در هیدرولیز آنزیمی، آنزیم‌های فلاورزایم و آلکالاز می‌باشند [٤، ۹، ۱۰]. این آنزیم‌ها به عنوان کاتالیزورها عمل کرده و فرآیند هیدرولیز پروتئین‌های جلبک را آغاز می‌کنند.آنزیم فلاورزایم یک آنزیم پروتئولیتیک است که به پروتئین‌ها وارد شده و آن‌ها را به پپتیدها و پپتیدهای کوچکتر تجزیه می‌کند. این فرآیند می‌تواند باعث افزایش قابلیت هضم و جذب پروتئین‌ها شود. آلکالاز یک آنزیم با قابلیت فعالیت در محیط‌های با pH غیراسیدی است. با ورود آلکالاز به پروتئین‌های جلبک، تجزیه آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر و آمینواسیدها انجام می‌شود [٤، ۹، ۱۰]. استفاده از آنزیم‌های فلاورزایم و آلکالاز در هیدرولیز جلبک اسپیرولینا منجر به تشکیل پپتیدهای کوچکتر و قابل هضم می‌شود. این فرآیند می‌تواند بهبود قابلیت هضم و جذب پروتئین‌ها را در بدن افزایش دهد و همچنین می‌تواند در تولید محصولات غذایی، مکمل‌های غذایی استفاده شود.

هدف از این مطالعه، استفاده از جلبک اسپیرولینا به عنوان یک منبع پروتئینی با ارزش، و بررسی ویژگی‌های ضداکسایش، عملکردی و سلامت‌بخشی هیدرولیز پروتئین‌های حاصل از این جلبک می باشد. در این تحقیق،

آنزیم‌های فلاورزایم و آلکالاز به عنوان آنزیم‌های مورد استفاده در هیدرولیز پروتئین‌های جلبک اسپیرولینا انتخاب شده‌اند. بر اساس این انتخاب، ویژگی‌های آنزیمی و بیولوژیکی پپتیدها و اسیدهای آمینه حاصله از هیدرولیز مورد ارزیابی قرار می‌گیرد.

## ۲- مواد و روش

### ۲-۱ مواد اولیه

جلبک اسپیرولینا، به شکل پودر سبزرنگ از شرکت نور دارو در شهرستان گنبد کاووس تهیه شد. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم (استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) و همچنین استاندارد اسیدهای آمینه از شرکت سیگما آلدریچ، 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 اندازه‌گیری میزان پروتئین اسپیرولینا

برای اندازه‌گیری میزان پروتئین در اسپیرولینا، از روش کلدال استفاده شد. در این روش، نمونه‌ها هضم شده و سپس با تیتراسیون، مقدار کل پروتئین رسوبی در فاز آبی محاسبه شد. این روش بر اساس استاندارد AOAC سال ۲۰۰۵ انجام شد [۱۱].

### ۲-۳ هیدرولیز پروتئین اسپرولینا

در این روش، ۵۰ گرم نمونه اسپیرولینا درون یک ارلن مایر با حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر قرار گرفت. سپس به ارلن مایر نسبت ۲:۱ حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه شد و با استفاده از همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. نمونه سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی غیرفعال شوند. سپس با اضافه کردن یک محلول هیدروکسید سدیم با غلظت ۰/۲ نرمال، pH بهینه برای فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز (۸/۵) و فلاورزایم (۷)) تنظیم شد. نمونه‌ها در حمام با دمای ۵۷ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم آلکالاز و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آنزیم فلاورزایم قرار گرفت. سپس با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه، آنزیم (با میزان ۱ درصد پروتئین نمونه اولیه) به نمونه اضافه شد. در زمان‌های مشخص (۱۰ و ۲۰ دقیقه) نمونه‌برداری شد و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) برای قطع واکنش آنزیمی، در حمام با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از خنک شدن، پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از سانتریفیوژ به دور ثابت ٦۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند و مایع شناور جمع‌آوری شد. سپس پروتئین‌های هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شده و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی به صورت پودر در آمد [۹، ۱۲].

### ۲-۳ درجه هیدولیزاسیون

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ٦۷۰۰ rpm و زمان ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید [۱۳]:

معادله ۱:

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

### ٤-۲ تعیین مقدار اسیدهای آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲٤ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ٦ 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 [٤].

**٥-٢ فعالیت آنتی اکسیدانی**

برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ١ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طور جداگانه با ١ میلی‌لیتر محلول ٠/١ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ١٥ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ٥١٧ nm در مقابل شاهد خوانده شد [١٤].

معادله ٣:

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH = (جذب شاهد / جذب شاهد–جذب نمونه) ×١٠٠

برای اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی فریک (FRAP)، ابتدا ٠/٥ میلی‌لیتر از نمونه محلول خود را با ٢/٥ میلی‌لیتر فسفات بافر ٠/٢ مولار (٦/٦ pH) و با ٢/٥ میلی‌لیتر فریک سیانید پتاسیم ١ درصد ترکیب شد. سپس ترکیب را به مدت ٢٠ دقیقه در انکوباتور در دمای ٥٠ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از این مدت، با ٢/٥ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ١٠درصد ترکیب و با سرعت ٣٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس ٢/٥ میلی‌لیتر از لایه بالایی این محلول را با ٢/٥ میلی‌لیتر آب مقطر و ٢/٥ میلی‌لیتر فریک کلرید (FeCl3 ٠/١ درصد ترکیب شد و به مدت ١٠ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد. سپس جذب در طول موج ٧٠٠ نانومتر قرائت شد [١٥].

**٦-٢ اندازه گیری خصوصیات عملکردی هیدرولیزها**

**١-٦-٢ حلالیت**

حلالیت پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از روش Bera و Mukherjee (١٩٨٩) انجام شد. یک گرم نمونه را در ١٠٠ میلی لیتر محلول آب مخلوط کرده و با استفاده از سود و اسید ٠/١ نرمال pH آن را به ٢–١٠ تنظیم کرده و سپس به مدت ٦٠ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ٢٠ دقیقه با سرعت ٥٠٠ سانتریفیوژ انجام شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (٤) محاسبه شد [١٦].

معادله ٤:

اندیس حلالیت در آب = (گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتت) ×١٠٠

**٢-٦-٢ ظرفیت و پایداری امولسیون کنندگی**

به ٣ گرم نمونه، ٥٠ میلی لیتر آب مقطر و ٥٠ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ٣٠ ثانیه با هموژنایزر (APU500b، دیلکوفناور، ایران) هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ٤ لوله آزمایش تقسیم گردید و با سانتریفوژ با دور ٢٠٠٠g به مدت زمان ٥ دقیقه سانتریفوژ (بهداد، ایران) شد EC طبق معادله (٥) زیر گزارش شد [١٧].

معادله ٥:

EC (%) = حجم قسمت امولیسفیه شده / حجم کل

١٠ میلی‌لیتر روغن گیاهی کلزا با ٣٠ میلی لیتر محلول پروتئینی ١درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ٢، ٤، ٦، ٨، ١٠ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ٢٠٠٠rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس با میکروسمپلر ٥٠ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های t= 0' و t =10' انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ٥ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ١٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ٥٠٠ نانومتر خوانده شد [١٧].

معادله ٦:

$$ESI = A0 \times \Delta t/\Delta A$$

$$\Delta A = A0 - A\ 10, \quad \Delta t = 10\ min$$

**٣-٦-٢ اندازگیری ظرفیت و پایداری کف کنندگی**

برای اندازگیری ظرفیت کف کنندگی ٢٠ میلی لیتر محلول‌های پروتئینی با pH ٨–٥ تهیه شد و در استوانه مدرج ٥٠ میلی لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با سرعت ١٠٠٠٠ دور بر دقیقه هم زده شد.

حجم مخلوط نهایی قرائت شـد. درصـد افزایش حجم در زمان صـفر نسـبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف کنندگی در نظر گرفته شد (معادله ۷) [۱۸].

معادله ۷:

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

برای محاسـبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ٤۰ و ٦۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شـد. سـپس با اسـتفاده از رابطه بالا، درصـد حجم کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شـاخص پایداری کف گزارش شد [۱۸]. (معادله ۸)

معادله ۸:

۱۰۰ ×(حجم کف بلافاصله پس از زده شدن /حجم کف پس از ٦۰ دقیقه)= پایداری کف

### ۸-۲ ارزیابی آماری

آزمایش‌ها در سه تکرار و در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 18انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن با سطح احتمال خطای ۵٪ انجام شد. رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel 2013 انجام پذیرفت.

## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱ مقادیر پروتئین در تیمارهای مختلف

میزان پروتئین اولیه در جلبک اسپیرولینا با میانگین ۱/۵۹±۵۷/۳۸ درصد تعیین شده است، در حالی که مقادیر پروتئین برای این جلبک در مطالعات مختلف به‌طور گسترده‌ای میان ۵۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است. به عنوان مثال، مطالعه Tańska و همکاران در سال ۲۰۱۷ مقدار پروتئین را ٦۰/۷ درصد [۱۹]، در حالی که مطالعه Koli و همکاران در سال ۲۰۲۲ مقدار پروتئین را ٦۵/۷۱درصد اعلام کردند [۲۰]. همچنین، مطالعه El-Hamed و همکاران در سال ۲۰۱۸ مقدار پروتئین را ۵۳/۹۲ درصد گزارش کرد[۲۱].

مقادیر پروتئین، پروتئین هیدرولیز شده جلبک اسپرولینا در تیمارهای مختلف در بازه ۷۰/۷٤- ۹٦/۰۳ درصد قرار داشته است. مطالعات بسیاری نشان داده‌اند که در پروتئین هیدرولیز شده آبزیان، محتوای پروتئینی حدود ۷۰ تا ۹۰ درصد وجود دارد. این افزایش در محتوای پروتئین به دلیل شکستن پروتئین به آمینواسیدها، انحلال پروتئین و حذف ماده جامد نامحلول با استفاده از سانتریفیوژ رخ می‌دهد [۲، ٤، ٦، ۹، ۲۲]. در نمونه‌ها با افزایش زمان هیدرولیز و استفاده از آنزیم آلکالاز، محتوای پروتئینی افزایش یافت. تحقیقی انجام شده توسط Taghdiriو همکاران (۲۰۲۳) نیز نتایج مشابهی در مورد پروتئین هیدرولیز شده جلبک کلرلا توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم گزارش کرده است. آنها میزان پروتئین را در محدوده ٦۵/۱۵- ۹۳/٤٦ درصد اعلام کردند و نشان دادند که مقادیر بالاتر پروتئین با استفاده از آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز بیشتر دست‌یافته می‌شود [۲۲]. این امر ممکن است به دلیل توانایی بالاتر آنزیم آلکالاز در شکستن پروتئین به آمینواسیدها و انحلال بیشتر آن باشد.

### ۳-۲بررسی مقادیر درجه هیدرولیزاسیون

درجه هیدرولیز به معنای میزان شکستن ساختار پروتئینی و تولید پپتید و اسیدهای آمینه است. هیدرولیز آنزیمی باعث تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها می‌شود و در نتیجه، ساختار پروتئین‌ها باز می‌شود و گروه‌های فعال آمینواسیدها که قابل واکنش با رادیکال‌های آزاد هستند، در معرض قرار می‌گیرند. نتایج تحلیل آماری نشان داده است (جدول ۱) که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز به طور قابل توجهی افزایش می‌یابد. همچنین، در تمامی زمان‌های هیدرولیز، میزان درجه هیدرولیز حاصل از آلکالاز به طور قابل توجهی بیشتر از فلاورزایم بوده است. بیشترین (۳٦/٤۵ درصد) میزان درجه هیدرولیز مربوط به آلکالاز پس از ۳۰ دقیقه و کمترین مقادیر (۱٤/۳۵ درصد) مربوط به فلاورزایم پس از ۱۰ دقیقه بوده است. با گذشت زمان هیدرولیز، آنزیم‌ها به طور مداوم با پروتئین‌ها تعامل می‌کنند و ساختار پروتئین را تخریب می‌کنند. این فرآیند هیدرولیز باعث برش زنجیره پروتئینی

می‌شود و پپتیدها و اسیدهای آمینه را به وجود می‌آورد. با افزایش زمان هیدرولیز، تعداد برش‌های زنجیره پروتئینی افزایش می‌یابد و بنابراین پپتیدهای کوچکتر و با وزن مولکولی کمتر تولید می‌شوند. همچنین، طول زنجیره پپتیدها نیز کوتاهتر می‌شود. در مورد آنزیم آلکالاز، علت بالاتر بودن درجه هیدرولیز توسط این آنزیم ممکن است به دلیل توانایی بالاتر آن در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد باشد. آلکالاز یک آنزیم پروتئاز است که قادر به شکست زنجیره پروتئینی به طور مؤثر است و پپتیدها را به پپتیدهای کوچکتر و حتی به اسیدهای آمینه تجزیه می‌کند. این توانایی بالاتر آلکالاز می‌تواند منجر به افزایش درجه هیدرولیز توسط این آنزیم شود [٤، ٢٣، ٢٤].

**Table 1.** Effect of enzyme hydrolysis type and time of protein hydrolyzed on protein content and degree of hydrolysis

| Enzyme | | Protein content (%) | Degree of hydrolysis (%) |
|---|---|---|---|
| Type | Time (min) | | |
| Alcalase | 10 | 72.96±0.78$^{e}$ | 20.99±1.04$^{c}$ |
| | 20 | 85.75±0.82$^{c}$ | 27.26±1.06$^{b}$ |
| | 30 | 96.03± 0.55$^{a}$ | 36.45±1.11$^{a}$ |
| Flavourzyme | 10 | 70.74±0.49$^{f}$ | 14.35±1.39$^{d}$ |
| | 20 | 81.46±1.05$^{d}$ | 19.87±1.55$^{c}$ |
| | 30 | 89.73±0.65$^{b}$ | 26.25±1.19$^{b}$ |

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

**۳-۳ ترکیب اسیدآمینه**

آنزیم‌های پروتئولیتیک، قادر به هیدرولیز پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر هستند که متشکل از ۲ تا ۲۰ اسید آمینه می‌باشند. این آنزیم‌ها با برش پیوندهای پپتیدی در ساختار پروتئین‌ها، آنها را به قطعات کوچکتر تجزیه می‌کنند. اسید آمینه‌های حاصل از این تجزیه و پپتیدهای با طول کوتاه می‌توانند خواص زیستی و ارزش غذایی متنوعی داشته باشند. به‌عنوان مثال، برخی از این پپتیدها می‌توانند فعالیت ضد میکروبی، ضد اکسیدانی، ضد التهابی و سایر خواص زیستی مفید را از خود نشان دهند. این خواص زیستی و ارزش غذایی پپتیدها می‌توانند در کاربردهای مختلفی از جمله صنایع غذایی و دارویی بهره‌برداری شوند [۲۲].

بر اساس نتایج، پروتئین‌های حاصل از هیدرولیز توسط هر دو آنزیم پروتئولیتیک، حاوی اسیدهای آمینه متنوعی می‌باشند. این پروتئین‌ها به عنوان یک منبع تغذیه مفید قابل استفاده هستند. با این حال، غلظت اسید آمینه فنیل آلانین در این پروتئین‌ها کمتر از مقداری است که توسط الگوی FAO گزارش شده است [۲۵].

مقادیر اسید آمینه آبگریز و شاخه در برای پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکلاز به ترتیب برابر با ۲۹/۸۲٪ و ۲۸/۳٤٪ و برای فلاورزایم به ترتیب برابر با ۱۹/۱۰٪ و ۱۷/۸۹٪ بوده است. اسیدهای آمینه آبگریز مانند فنیل آلانین، پرولین، متیونین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، تیروزین و والین همچنین اسیدهای آمینه شاخه دار نظیر والین، ایزولوسین و لوسین به دلیل توانایی آنها در جذب و نقل الکترون و همچنین تشکیل رادیکال‌های آزاد، نقش مهمی در بازدارندگی رادیکال‌های آزاد دارند. این اسیدهای آمینه با خاصیت آبگریزی، میزان دسترسی رادیکال‌های آزاد به

سلول‌های هدف را کاهش می‌دهند و در نتیجه می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه داشته باشند. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق کاهش تماس مستقیم رادیکال‌های آزاد با سلول‌ها، جلوگیری از آسیب اکسیداتیو و حفظ تعادل اکسیدانی سلولی را ایجاد می‌کند. علاوه بر این، برخی از این اسیدهای آمینه به عنوان پیش سازهای سنتز مولکول‌های ضد التهابی و ضد سرطانی مؤثر مانند تیروزین و فنیل آلانین عمل می‌کنند [۲٦، ۲۷، ۲۸].

در مطالعه حاضر، مشخص شد که درصد بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به آرژنین به ترتیب ۷/۷۵٪ و ۸/۱۵٪ بوده است. همچنین، درصد بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب گلوتامیک اسید ۱۱/۹۹٪، ۱۲/۲۵٪ مشاهده شد. در مطالعه انجام شده توسط Morsy و همکاران در سال ۲۰۱٤، درصد آرژنین در پروفایل اسید آمینه جلبک اسپرولینا حدود ۷/٦۵٪و گلوتامیک اسید حدود ۱۳/۷۹٪ گزارش شده است. این نتایج تقریبا با نتایج مطالعه حاضر همخوانی دارند [۲۹].

از طرفی، مطابق با معیارهای ارائه شده توسط سازمان غذا و کشاورزی جهانی (FAO/WHO) در سال ۱۹۹۰، نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه‌ها باید حداقل ٤۰٪ و نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری نباید کمتر از ۰/٦ باشد [۲۵]. با توجه به نتایج مطالعه، پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای ترکیبی مناسب از اسیدهای آمینه هستند. نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب برابر با ۱/۰۷و ۰/۹۹ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید امینه موجود به ترتیب برابر با ۵۱/۸۲ و ٤۹/۸۱ است.

**Table 2:** Effect of enzyme hydrolysis type (at 30 min) of protein hydrolyzed on amino acid composition

| Amino acid (g 100 $g^{-1}$) | Alcalase | Flavourzyme | FAO/ WHO, 1990 |
|---|---|---|---|
| Threonine[a] | 4.28 | 4.7 | 3.4 |
| Valine[a] | 4.54 | 4.15 | 3.5 |
| Methionine[a] | 2.78 | 2.67 | |
| Isoleucine [a] | 7.45 | 6.49 | 2.8 |
| Leucine[a] | 7.11 | 6.75 | 6.6 |
| Phenyl alanine[a] | 3.59 | 3.21 | 6.3 |
| Histidine [a] | 5.59 | 5.55 | 1.9 |
| Lysine[a] | 4.25 | 4.11 | 5.8 |
| Arginine[a] | 7.75 | 8.11 | |
| Glycine | 5.11 | 6.35 | |
| Aspartic acid | 8.95 | 9.11 | |
| Glutamic acid | 11.99 | 12.25 | |
| Serine | 4.11 | 4.75 | |
| Alanine | 6.99 | 6.68 | |
| Tyrosine | 3.40 | 3.59 | 1.1 |

| | | |
|---|---|---|
| Cystein | 0.95 | 1.01 |
| Prolin | 2.50 | 2.48 |
| Total amino acid | 91.34 | 92.04 |
| HAA[b] | 29.82 | 28.34 |
| BCAA[c] | 19.10 | 17.98 |

[a] Essential amino acids
[b] Combined total of hydrophobic amino acids (HAA)= alanine, valine, isoleucine, leucine, tyrosine, phenylalanine, methionine and cysteine
c Branched-chain amino acids (valine, isoleucine, leucine)

**۳-٤ خاصیت آنتی اکسیدانی**

آزمون فعالیت رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) یک روش سریع، ارزان و بدون اثر منفی برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد غذایی است. در این روش، DPPH که یک رادیکال آزاد است، با اهداکنندگان الکترونی تعامل می‌کند و در نتیجه واکنش می‌دهد. پپتیدهای حاصل از پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز می‌توانند نقش اهداکنندگان الکترون را ایفا کرده و با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند تا واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون را متوقف کنند.DPPH در فرم پایدار رادیکال آزاد، در طول موج ۵۱۷ نانومتر در اتانول، حداکثر جذب را دارد. اما زمانی که نزدیک به یک ماده اهداکننده پروتون قرار می‌گیرد، رادیکال‌های آزاد DPPH مهار شده و جذب آنها کاهش می‌یابد [۳۰، ۳۱، ۳۲]. در این مطالعه، با افزایش مدت زمان هیدرولیز پروتئین تا ۳۰ دقیقه و افزایش درجه هیدرولیز، میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH نمونه‌ها به طرز قابل توجهی افزایش یافت. بیشترین مقادیررادیکال‌های آزاد DPPH مربوط به آلکالاز پس از ۳۰ دقیقه (۳٦/٤٥ درصد) و کمترین مقادیر مربوط به فلاورزایم پس از ۱۰ دقیقه بوده است (۱٤/۳۵ درصد). براساس نتایج این تحقیق، پروتئین‌های هیدرولیز شده از جلبک اسپیرولینا قادر به اهداء پروتون در واکنش با رادیکال‌های آزاد هستند و در نتیجه منجر به پایان واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد می‌شوند. این پپتیدها با خاصیت الکترون‌دهندگی بیشتری که به طور مستقیم با افزایش مدت زمان هیدرولیز پروتئین مرتبط است، قادر به تحویل الکترون به رادیکال‌های آزاد هستند و باعث تبدیل آن‌ها به ترکیبات پایدار می‌شوند. این نتایج نشان می‌دهند که با افزایش زمان هیدرولیز پروتئین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافته و واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد مهار می‌شوند [۳۳، ۳٤]. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از فلاورزایم بود. این فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور مستقیم به ترکیب اسید آمینه، ساختار و وزن مولکولی پپتیدها بستگی دارد. آمینو اسیدهای هیدروفوب (HAA) دارای خواص ضد اکسیداسیون هستند. این آمینو اسیدها، از جمله تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین، دارای ساختار حلقه آروماتیک هستند که می‌توانند به طور مستقیم با رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال واکنش نشان دهند، و بنابراین قدرت ضد اکسیداسیون را از خود نشان می‌دهند. میزان اسید آمینه‌های HAA در پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر بود. این موضوع نشان می‌دهد که هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم آلکالاز می‌تواند به تولید پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت مهار رادیکال‌های آزاد بیشتری منجر شود [٤، ۳۵]. در مطالعه انجام شده توسط Taghdiri و همکاران در سال ۲۰۲۳، با هیدرولیز پروتئین‌های جلبک کلرلا با آنزیم فلاورزایم و آلکالاز، با افزایش زمان هیدرولیز و افزایش درجه هیدرولیز پروتئین، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها به طرز قابل توجهی افزایش یافته است و بالاترین مقادیر در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز مشاهده شد [۲۳]. این نتایج تطابقی با نتایج مطالعه حاضر دارند و نشان می‌دهند که

هیدرولیز بیشتر پروتئین‌ها منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌شود.

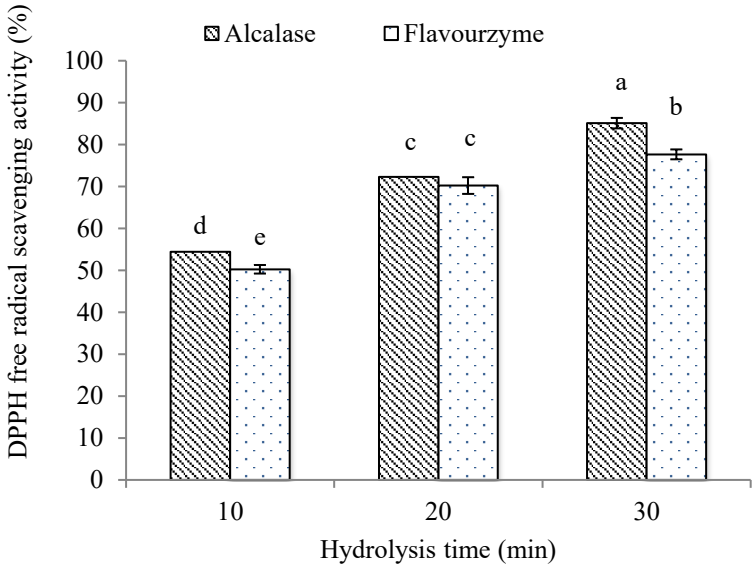


**Figure 1:** The DPPH free radical savaging activity of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at $p<0.05$.

یکی از روش‌های استفاده شده برای ارزیابی توانایی ضد اکسیدانی یک ترکیب، روش سنجش قدرت احیای آهن با دادن الکترون یا هیدروژن است. تحقیقات متعدد نشان داده است که بین میزان فعالیت ضد اکسیدانی و قدرت کاهندگی یک ترکیب زیست فعال ارتباط مستقیم وجود دارد. در این روش، توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای یون $Fe^{3+}$ به یون $Fe^{2+}$ مورد ارزیابی قرار می‌گیرد [٤، ۱۰]. با توجه به نتایج استفاده از آنزیم آلکالاز نسبت به فلاورزایم، قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (فریک) افزایش می‌یابد. نتایج آماری نیز نشان می‌دهند که این افزایش قابل توجه است و با افزایش زمان هیدرولیز نیز، قدرت احیاکنندگی به طور معنادار افزایش می‌یابد. بنابراین، استفاده از زمان هیدرولیز بالاتر توصیه می‌شود. باید توجه داشت که آنزیم آلکالاز توانایی بیشتری در افزایش خاصیت احیاکنندگی دارد. بنابراین، استفاده از آنزیم آلکالاز به جای فلاورزایم می‌تواند منجر به افزایش قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی شود [٤].

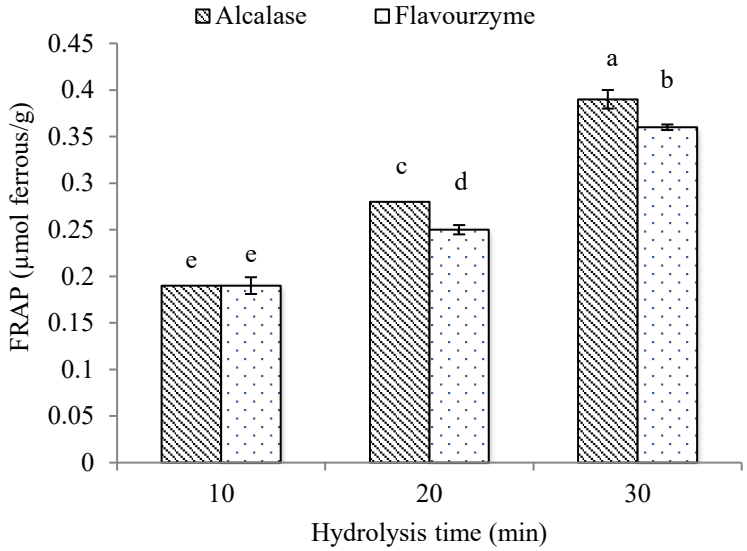


**Figure 2:** The FRAP of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at $p<0.05$.

### ۳-۵ خواص عملکردی

از بین تمام خواص عملکردی پروتئین‌ها، حلالیت بیشترین تأثیر را در ارتباط با سودمندی پروتئین‌های هیدرولیز شده در سیستم‌های غذایی دارد. سایر خصوصیات خواص عملکردی مانند کف و امولسیون و ویژگی‌های ژل سازی معمولاً به محلول بودن پروتئین در محیط مربوطه نیاز دارند. بنابراین، به نظر می‌رسد پروتئین‌های نامحلول پتانسیل کاربرد بسیار کمتری در مواد غذایی داشته باشند [۳۶].

بر اساس نتایج تحقیق فعلی، آنزیم آلکالاز نسبت به فلاورازایم، توانایی بیشتری در افزایش حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده از خود نشان داده است. همچنین، مشخص شد که با افزایش زمان هیدرولیز، حلالیت به طور معناداری افزایش می‌یابد. نتایج نشان داده است که درجه هیدرولیز و حلالیت پروتئین‌ها رابطه مستقیمی دارند، به این معنی که با افزایش درجه هیدرولیز، حلالیت نیز افزایش می‌یابد. این افزایش در حلالیت به دلیل آزاد شدن پپتیدهای کوچک و تشکیل گروه‌های کربوکسیلیک و آمین جدید از اسیدهای آمینه ایجاد شده است. این یافته‌ها نشان می‌دهند که پروتئین‌های هیدرولیز شده با حلالیت بالا، پتانسیل بالقوه‌ای در فرمولاسیون مواد غذایی دارند [۳۲]. این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده با حلالیت بالا می‌توانند به عنوان عوامل پایداری و افزایش کف‌زنی در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده شوند. در تحقیقات Yathishaو همکاران (۲۰۲۲)، نشان داده شده است که حلالیت پروتئین هیدرولیز شده از ماهی روبان (*Lepturacanthus Savala*) با افزایش زمان و درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد [۲۷]. این نتایج نشان می‌دهند که زمان و شدت هیدرولیز بر حلالیت پروتئین‌ها تأثیر مهمی دارد و با افزایش آنها، حلالیت پروتئین‌ها نیز افزایش می‌یابد. تحقیقات Ma و همکاران (۲۰۱۸) نشان داده است که با افزایش زمان هیدرولیز، حلالیت پروتئین حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین سویا نیز افزایش می‌یابد. این افزایش ممکن است به دلیل تجزیه پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر و قابل حل در محیط‌های مختلف باشد که حلالیت بیشتری دارند [۳۷].

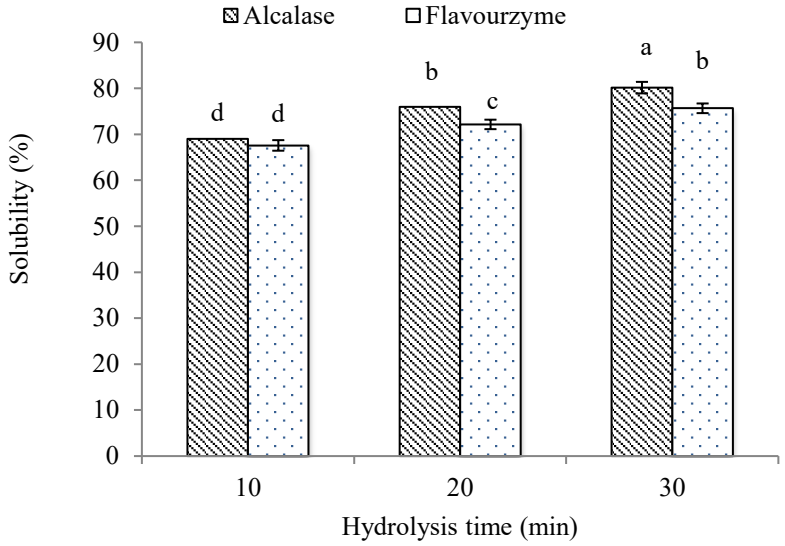


**Figure 3:** The solubility of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at $p<0.05$.

خاصیت امولسیون کنندگی پروتئین‌ها می‌تواند به عنوان توانایی پروتئین در تشکیل و تثبیت امولسیون‌ها تعریف شود. توانایی تشکیل امولسیون ویژگی اساسی مورد نیاز هر بخش پروتئینی می‌باشد که به عنوان ماده غذایی با خاصیت عملکردی مناسب می‌تواند در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد [۳۸]. مطالعه حاضر نتایجی را نشان داده است که تطابق بین خاصیت امولسیون‌زایی و پایداری امولسیون وجود دارد. تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده در این مطالعه اثبات کرده‌اند که دارای خاصیت امولسیون‌زایی بالا هستند و پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز و زمان هیدرولیز بالاتر، مقادیر بیشتری از خاصیت امولسیون کنندگی را دارا بود. وزن مولکولی و حلالیت پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها دو عامل مهم در تعیین شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون هستند. هیدرولیز پروتئین‌ها باعث کاهش وزن مولکولی آن‌ها می‌شود و افزایش درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر می‌شود. پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر به دلیل حلالیت بالا، قادر به ایجاد خواص امولسیفایری مطلوب هستند. بنابر این در مطالعه حاضر نیز به طور خاص، پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه، بیشترین خاصیت امولسیون‌زایی و پایداری امولسیون را دارا هستند. Ghelich و همکاران (۲۰۲۲) نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز ویژگی‌های امولسیونی پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم بهبود می یابد و همچنین استفاده از آنزیم آلکالاز نسبته به فلاورزایم سبب افزایش ظرفیت امولسیون ککندگی شد [۲۴].

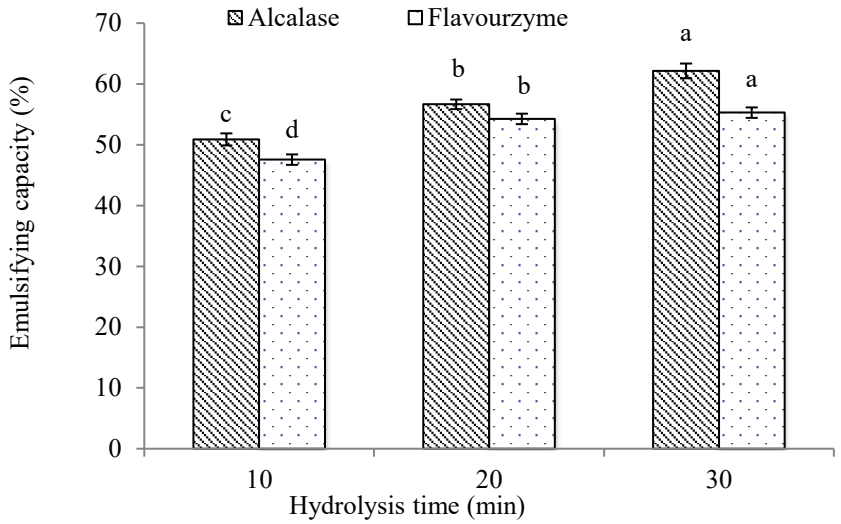


**Figure 4:** The emulsifying capacity of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at p<0.05

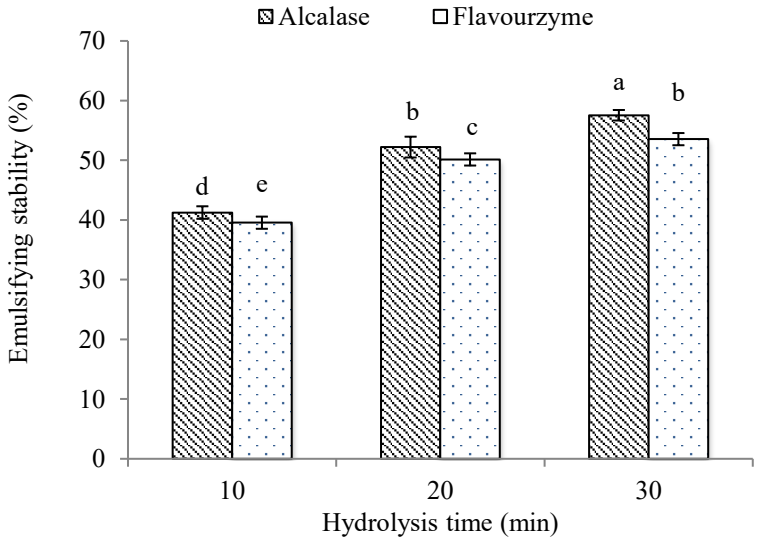


**Figure 5:** The emulsifying stability of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at p<0.05.

کف مخلوط کلوئیدی با فاز پیوسته مایع و فاز پراکنده گاز، از نظر ترمودینامیکی به عنوان یک سیستم ناپایدار محسوب می‌شود [۳۹]. نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داده‌اند که کف کنندگی و پایداری کف با یکدیگر همخوانی دارند. تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده نشان داده‌اند که دارای کف کنندگی بالا هستند و پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در تمامی زمان‌های هیدرولیز دارای مقادیر بالاتری از ظرفیت کف کنندگی هستند. با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر ظرفیت کف کنندگی نیز افزایش می‌یابد. به طور خاص، پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه، بیشترین ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف را دارا می‌باشند. این نتایج نشان می‌دهند که هیدرولیز پروتئین‌ها توسط آنزیم آلکالاز می‌تواند بهبود قابل توجهی در کف کنندگی و پایداری کف مخلوط کلوئیدی ایجاد کند. سه ویژگی مهم جهت نشان دادن ظرفیت کف کنندگی خوب

عبارتند از مهاجرت سریع در حد فاصل آب و هوا، رها شدن و بازسازی مجدد در این حد فاصل. نمونه‌های هیدرولیز شده معمولاً شامل پپتیدهایی با اسیدهای آمینه هیدروفوب و دارای ویژگی آبگریزی بیشتر هستند، که به سرعت در این حد فاصل جذب می‌شوند. پروتئین‌ها به علت داشتن ترکیبات فعال سطحی منجر به تشکیل کف می‌شوند و با افزایش حلالیت پروتئین‌ها، کشش سطحی در فضای بین سطحی حباب‌ها و مایع کاهش بیشتری از خود نشان می‌دهد و ظرفیت تشکیل کف افزایش می‌یابد. با انجام فرایند هیدرولیز، وزن مولکولی پروتئین‌ها کاهش یافته و در نتیجه حلالیت افزایش یافته و خاصیت تشکیل کف توسط پروتئین‌ها کوچکتر و بیشتر می‌شود. این ویژگی‌ها باعث می‌شود که پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم‌ها به عنوان عامل‌های کف کننده مناسب عمل کنند [٤۰، ٤۱، ٤۲].

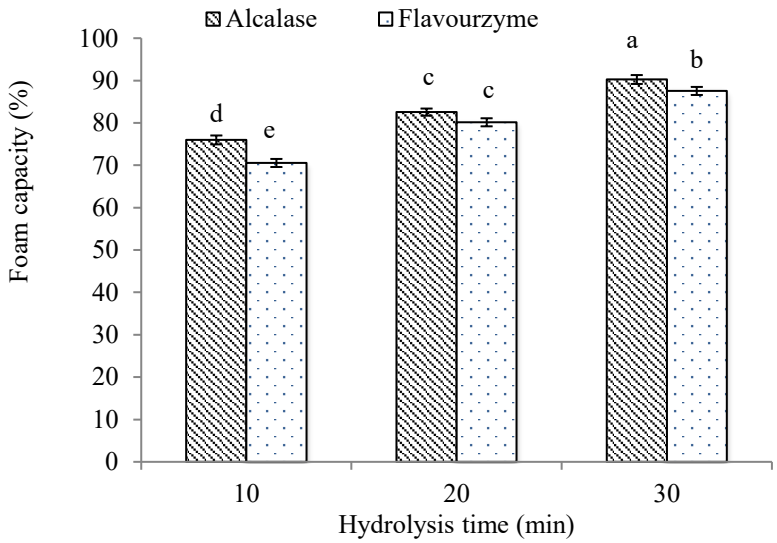


**Figure 6:** The foaming capacity of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at p<0.05.

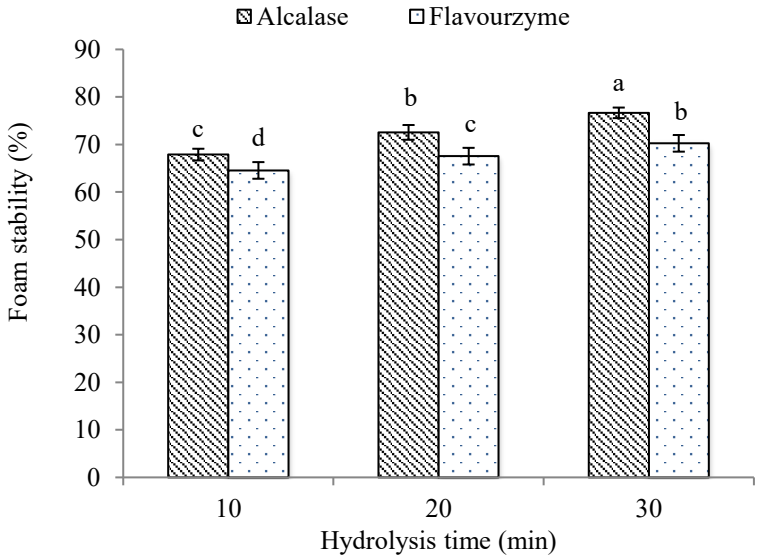


**Figure 7:** The foaming stability of spurlina protein hydrolysates
Different letters in the same times showed a significant difference at p<0.05.

## ٤- نتیجه گیری نهایی:

نتایج حاکی از این بررسی نشان داد که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا قابلیت مهار کردن

رادیکال‌های آزاد را دارا هستند و در عین حال خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار می باشند. همچنین، این پپتیدها به دلیل ویژگی‌های عملکردی مناسبی که شامل هضم و جذب آسان است، می‌توانند به عنوان ترکیبات مفید در صنایع مختلفی از جمله صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا با استفاده از آنزیم آلکالاز منجر به افزایش ارزش پروتئینی و تولید پپتیدهای بیولوژیکی با خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی قابل قبول می‌شود. بنابراین، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی جلبک اسپیرولینا به عنوان ترکیبات مفید در محصولات غذایی و سایر صنایع مورد توجه قرار می‌گیرند.

## ۵-منابع


[1] Jia, J., Maa, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., & Luo, L. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chemistry , 119, 336–342.

[2] Nemati, M., Shahoseini, S. R., & Ariaii, P. (2024). Review of fish protein hydrolysates: Production Methods, Antioxidant and antimicrobial activity and nanoencapsulation. Journal of Food Science and Biotechnology.

[3] Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G. F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. Journal of Functional Foods , 15, 301-313.

[4] 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.

[5] Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., & Varidi, M. J. (2015). Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein. Science of Food and Agriculture , 15, 3165–3176.

[6] Shahosseini, S. R., Javadian, S. R., & Safari, R. (2023). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. Journal of Innovation in Food Science and Technology , 15(1), 143-155.

[7] Bumandalai, O., Bayliss, K. L., & Moheimani, N. R. (2024). Innovative processes for combating contaminants in fresh Spirulina. Algal Research , 78, 103397.

[8] Lafarga, T., Fernández-Sevilla, J. M., González-López, C., & Acién-Fernández, F. G. (2020). Spirulina for the food and functional food industries. Food Research International , 137, Article 109356.

[9] 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.

[10] Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., & Fattahi, E. (2020). Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. International Journal of Peptide Research and Therapeutics , 26, 625–632.

[11] AOAC. (2005). Official Method of Analysis (17th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

[12] 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.

[13] Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(1), 43-81.

[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, 1198-1205.

[15] Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology, 100(13), 3419-3425.

[16] Bera, M. B., & Mukherjee, R. K. (1989). Solubility, emulsifying, and foaming properties

of rice bran protein concentrates. Journal of Food Science, 54(1), 142-145.

[17] 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.

[18] Shahidi, F., & Onodenalore, A. (1995). Water dispersions of myofibrillar proteins from capelin (Mallotus villosus). Food Chemistry, 53, 51-54.

[19] Tańska, M., Konopka, I., & Ruszkowska, M. (2017). Sensory, physico-chemical, and water sorption properties of corn extrudates enriched with Spirulina. Plant Foods for Human Nutrition, 72, 250-257.

[20] Koli, D. K., Rudra, S. G., Bhowmik, A., & Pabbi, S. (2022). Nutritional, functional, textural, and sensory evaluation of Spirulina enriched green pasta: A potential dietary and health supplement. Foods, 11(7), 979. https://doi.org/10.3390/foods11070979

[21] El-Hameed, A., Mahmoud, K., El-Maatti, A., El-Saidy, S. M., & Ahmed, S. M. (2018). Effect of adding Spirulina platensis in pasta products (spaghetti). Journal of Agricultural Research, 45, 293-300.

[22] Taghdiri, S., Emtyazjoo, M., Azizi, M. H., Ariaii, P., & Sedaghati, M. (2023). The effect of hydrolyzed protein obtained from Chlorella vulgaris on the shelf life and quality of oil cake during the storage period. Food Measure. Advance online publication. https://doi.org/10.1007/s11694-023-02186-y

[23] 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.

[24] 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. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 28(1), 69.

[25] 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.

[26] Firmansyah, M., & Abduh, M. Y. (2019). Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from Hermetia illucens. Heliyon, 5(6), e02005.

[27] 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.

[28] Chew, R. M., Mohd Zin, Z., Ahmad, A., Mohtar, N. F., Rusli, N. D., & Zainol, M. K. (2020). Physicochemical and sensory properties of deep-fried battered squid containing Brownstripe red snapper (Lutjanus vitta) protein hydrolysate. Food Research, 4(4), 1245-1253.

[29] Morsy, O. M., Sharoba, A. M., El-Desouky, A. I., Bahlol, H. E. M., & Abd El Mawla, E. M. (2014). Production and evaluation of some extruded food products using spirulina algae. Annals of Agricultural Science, Moshtohor, 52(4), 495-510.

[30] Varedesara, M. S., Ariaii, P., & Hesari, J. (2021). The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and the viability of Lactobacillus casei in it. Food Science and Nutrition, 9, 2180–2190.

[31] Aderinola, T., Fagbemi, T., Enujiugha, V., Monisola Alashi, A., & Emmanuel Aluko, R. (2018). Amino acid composition and antioxidant properties of Moringa oleifera seed protein isolate and enzymatic hydrolysates. Heliyon, 4(10), e00877.

[32] Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). Food Chemistry, 107, 1485-1493.

[33] Bahram, S., Khezri, M., & Javadian, S. R. (2020). Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of hydrolyzed protein of Saurida tumbil. Experimental Animal Biology, 9(2), 23-35.

[34] Sheih, I. C., Wu, T. K., & Fang, T. J. (2009). Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology, 100(13), 3419-3425.

[35] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2019). Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates. Food Chemistry, 299, 30: 125165.
[36] Wouters, A. G. B., Rombouts, I., Fierens, E., Brijs, K., & Delcour, J. A. (2016). Relevance of the functional properties of enzymatic plant protein hydrolysates in food systems. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 15(4), 786-800.
[37] Ma, W., Qi, B., Sami, R., Jiang, L., Li, Y., & Wang, H. (2018). Conformational and functional properties of soybean proteins produced by extrusion-hydrolysis approach. International Journal of Analytical Chemistry, 2018, 9182508.
[38] Zayas, J. F. (1997). Emulsifying properties of proteins. In Functionality of Proteins in Food (pp. 134–227). Springer.
[39] Boye, J. I., Aksay, S., Roufik, S., Ribéreau, S., Mondor, M., Farnworth, E., & Rajamohamed, S. H. (2010). Comparison of the functional properties of pea, chickpea and lentil protein concentrates processed using ultrafiltration and isoelectric precipitation techniques. Journal of Food Research International, 43, 538–546.
[40] García-Moreno, P. J., Guadix, A., Guadix, E. M., & Jacobsen, C. (2016). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. Food Chemistry, 253, 124-135.
[41] Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. ARYA Atherosclerosis, 15(5), 218-227.
[42] Sakanaka, S., Tachibana, Y., & Okada, Y. (2005). Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). Food Chemistry, 89, 569-575.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

# Evaluation of the functional and antioxidant properties of peptides derived from enzymatic hydrolysis of Spirulina algae

**Andisheh Tavakoli[1], Reza Farahmandfar[2*], Ali Motamedzadegan[3], Peiman Ariaii[4], Maryam Asnaashari[5]**

1- PhD student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
3- Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
4- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
5- Department of Animal Processing, Animal Science Research Institute of Iran (ASRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Karaj, Iran

**ARTICLE INFO**

**Article History:**

Received:20234/5/12

Accepted:2024/12/22

**Keywords:**

hydrolyzed protein,
Spirulina algae,
antioxidant properties,
functional properties.

**DOI: 10.22034/FSCT.22.161.69.**

*Corresponding Author E-
m.asnaashari@yahoo.com

**ABSTRACT**

Enzymatic hydrolysis of Spirulina algae protein, commonly practiced in the food industry, leads to increased protein value and the production of biologically active and functional peptides with high digestibility and desirable antioxidant properties. This study aims to investigate the antioxidant and functional properties of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of Spirulina algae. In the evaluation process, Spirulina algae proteins were hydrolyzed using alcalase and flavozyme enzymes for different durations of 10, 20, and 30 minutes. The degree of hydrolysis, protein recovery, antioxidant properties of the peptides assessed through DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) assays, as well as the functional characteristics of the peptides including solubility, emulsifying and foam capacity and stability were evaluated. The results of these evaluations demonstrated that peptides derived from enzymatic hydrolysis of Spirulina algae exhibited high antioxidant properties and could act as scavengers of free radicals. Furthermore, these peptides displayed favorable functional properties, indicating their potential applications in various industries, including the food sector. Additionally, based on the results, alcalase enzyme showed higher capability in producing hydrolyzed proteins with higher degree of hydrolysis, protein content, and recovery, as well as better antioxidant and functional properties compared to flavozyme enzyme. The hydrolysis time also had a positive impact on these parameters. Therefore, this study highlights the antioxidant and functional properties of peptides derived from enzymatic hydrolysis of Spirulina algae, suggesting their potential utility as valuable compounds in food products and other industries.