

مقایسه‌ی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله با آلکالاز و پانکراتین

شیمیا کاوه¹، علیرضا صادقی ماهونک^{2*}، محمد قربانی²، خشایار سراپندی³

1- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

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

3- دانش‌آموخته‌ی دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ پذیرش: 97/02/08

تاریخ دریافت: 96/12/18

چکیده

در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین شنبلیله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در نسبت آنزیم به سوبسترا 2% و فواصل زمانی 200-40 دقیقه انجام گردید. درجه‌ی هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (فعالیت مهار رادیکال DPPH، قدرت شلاته-کنندگی آهن، قدرت احیاءکنندگی یون آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل) ارزیابی شدند. نتایج نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه‌ی هیدرولیز نمونه‌ها افزایش یافت و نمونه‌های حاصل از آلکالاز دارای درجه‌ی هیدرولیز بالاتری بودند. بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن و احیاءکنندگی به ترتیب به میزان 72/65% و 0/967، توسط پانکراتین و پس از 200 دقیقه هیدرولیز حاصل شد. نمونه‌های حاصل از آلکالاز نسبت به پانکراتین قدرت بیشتری در مهار رادیکال DPPH داشتند و فعالیت آن‌ها با افزایش زمان روند افزایشی داشت و پس از 200 دقیقه هیدرولیز به 53/38% رسید. با انجام هیدرولیز تا 160 دقیقه نمونه‌های حاصل از پانکراتین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل بیشتری از خود نشان دادند اما با افزایش زمان تا 200 دقیقه فعالیت نمونه‌ها تفاوت زیادی نداشت و به حدود 70% رسید. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در بین نمونه‌های هیدرولیز شده پس از 40 دقیقه هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به میزان 0/971 و 1/004 حاصل شد و بیشترین میزان فعالیت پس از 200 دقیقه هیدرولیز با آنزیم آلکالاز و به میزان 1/69 حاصل شد. بنابر نتایج به دست آمده پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل می‌توانند به‌عنوان مکمل‌های دارویی و فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان ترکیبات سلامتی بخش مورد استفاده قرار گیرند.

واژه‌های کلیدی: آلکالاز، آنتی‌اکسیدان، پانکراتین، شنبلیله، هیدرولیز آنزیمی

*مسئول مکاتبات: sadeghiaz@yahoo.com

1-مقدمه

درون بافت‌های بدن، رادیکال‌های آزاد به‌طور مداوم به-عنوان محصولات جانبی متابولیسم‌های اکسیداتیو تولید می-شوند، اگرچه آنها برای سلول‌ها ضروری هستند اما تجمع آنها و عدم وجود آنتی‌اکسیدان‌های درون سلولی منجر به وقوع تنش اکسیداتیو می‌گردد و بیماری‌های گوناگونی مانند دیابت، سرطان و اختلالات قلبی عروقی را در پی دارد (17). اکسیداسیون لیپیدها از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت مواد غذایی نیز می‌باشد چرا که منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب، رنگ تیره و ترکیبات سمی در مواد غذایی می-گردد (30). به‌دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی بلندمدت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA و BHT وجود دارد تقاضا به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش پیدا کرده است (52). در گذشته پروتئین‌های غذایی، تنها به‌عنوان منبعی از انرژی و آمینواسیدهای ضروری مورد نیاز برای رشد و تنظیم عملکرد فیزیولوژیکی بدن در نظر گرفته می‌شدند. امروزه توجه محققین به شناسایی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع گیاهی و حیوانی سوق پیدا کرده است. این پپتیدها بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که در پروتئین اولیه غیرفعال هستند و پس از هیدرولیز آنزیمی از خود ویژگی‌های فیزیولوژیکی متفاوتی نشان می‌دهند. این پپتیدها دارای 2-20 آمینو اسید (36) و وزن مولکولی کمتر از 6000 دالتون هستند (45). ویژگی‌های پپتیدهای زیست‌فعال به ترکیب و توالی آمینواسیدی آنها وابسته است (13). از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به اثرات ایمنی بخشی (18)، آرام بخشی (44)، ضد میکروبی (33)، آنتی‌اکسیدانی (36)، ضد فشار خون (24) و ضد سرطان (35) اشاره نمود. تحقیقات زیادی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده را به اثبات رسانده است، ساکاناکا و همکاران (43)، با تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از زرده‌ی تخم مرغ گزارش کردند که هیدرولیز منجر به تولید پپتید-هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه در سیستم اکسیداسیون لینولیک اسید شده است، جامدار و همکاران

¹ Fabaceae

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

آلکالاز، پانکراتین، تری کلرواستیک اسید، کوماسی بریلیانت بلو (G250)، DPPH، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، سولفات آهن، پراکسید هیدروژن، دی کلرید آهن، فروزین، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما و اتانول، سود، اسید کلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و دانه شنبلیله از مرکز تحقیقات علوم کشاورزی گرگان خریداری شدند.

2-2- تهیه کنسانتره پروتئین شنبلیله

ابتدا دانه‌های شنبلیله شسته و در دمای اتاق خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند و فرآیند چربی‌زدایی، با اختلاط با هگزان به نسبت 1:4 (وزنی/حجمی) و به مدت 3 ساعت همزدن در دمای اتاق با استفاده از شیکر با دور 150rpm انجام گرفت. سپس با استفاده از کیف بوختر هگزان جدا و پودر چربی‌گیری شده به مدت 1 ساعت در آون با دمای 30 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و از الک با مش 40 عبور داده شدند. سپس جهت استخراج پروتئین، پودر شنبلیله به نسبت 1:10 با محلول کلرید سدیم 0/3 مولار، مخلوط و pH آن با افزودن سود آنرمال روی 9/2 تنظیم و پس از 1 ساعت همزدن، محلول حاصل در 4500×g به مدت 30 دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت روی 4/5 (pH ایزوالکتریک پروتئین شنبلیله) تنظیم شد و در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در 4500×g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه

رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در 4500×g، به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ شد. کنسانتره پروتئینی حاصل با خشک کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (16).

2-3- هیدرولیز آنزیمی

برای تهیه‌ی پروتئین هیدرولیز شده از کنسانتره‌ی پروتئینی شنبلیله از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در شرایط بهینه‌ی فعالیت هر یک از آنزیم‌ها استفاده شد (جدول 1). کنسانتره-ی پروتئینی در غلظت (w/v) 5 درصد در بافر فسفات 0/2M مولار درون ارلن‌های 100 میلی‌لیتری حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به مدت 30 دقیقه در دمای محیط فراهم شد. پس از رسیدن دمای انکوباتور به دمای مورد نظر نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دمای انکوباتور، آنزیم به نسبت 2% به محلول اضافه شد. فرآیند هیدرولیز در شرایط همزدن مداوم با دور 200rpm در فواصل زمانی 40، 80، 120، 160 و 200 دقیقه انجام شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 10 دقیقه قرار داده شده و سپس با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. سپس نمونه‌ها با دور 8000 ×g به مدت 20 دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جدا و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (2).

آنزیم	pH	دما (°C)	بافر (0/2M)
آلکالاز	8	50	K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄
پانکراتین	7/4	40	K ₂ HPO ₄ -KH ₂ PO ₄

جدول 1- شرایط انجام هیدرولیز کنسانتره‌ی پروتئین شنبلیله

5-2- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (0/44M) در نسبت حجمی 1:1 مخلوط و به مدت 15 دقیقه در دمای °C 4 انکوبه شد. سپس، مخلوط در 10000rpm و به مدت 10min سانتیفریوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید 0/22 M با روش بردفورد (10) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

$$DH (\%) = \frac{[\text{Protein (TCA+Supernatant)}]}{\text{Protein (fenugreek hydrolysate suspension)}} \times 100 \quad (1)$$

6-2- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

ابتدا، 1ml نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت 40 (mg/ml) با 0/05ml محلول دی کلرید آهن (2mM) و 1/85ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، 0/1ml محلول فروزین (5mM) افزوده و مخلوط به شدت هم زده - شد. جذب پس از 10min نگهداری مخلوط در دمای محیط در 562nm خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (21):

$$\text{Chelating activity } (\%) = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

7-2- تعیین قدرت احیاء کنندگی

برای تعیین قدرت احیاء کنندگی نمونه های هیدرولیز شده، 0/5ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40mg/ml) با 0/5ml بافر فسفات (0/2M pH 6.6) و 0/5ml پتاسیم فری سیانید (W/V) 1 درصد مخلوط و در دمای °C 50 برای 20min دقیقه انکوبه شد. سپس، 0/5ml محلول تری کلرو استیک اسید 10 درصد به مخلوط اضافه و به مدت 10min در 2500rpm سانتیفریوژ شد. در نهایت، 1ml سوپرناتانت با 1ml آب مقطر و 0/2ml فریک کلراید (W/V) 0/1 درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در 700nm پس از 10min نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاء کنندگی است (3).

8-2- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (40mg/ml) حل شدند. سپس، 1/5ml از هر نمونه با 1/5ml از محلول اتانولی DPPH (0/15mM) مخلوط و به مدت 20 ثانیه و رتکس شد. سپس، مخلوط حاصل به مدت 30min در تاریکی نگهداری شد و سپس در 2500rpm به مدت 10min سانتیفریوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج 517nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (48):

$$I (\%) = \left[\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100 \quad (3)$$

9-2- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

ابتدا 1 ml از 10 فناترولین (1/865 mM) و 2 ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت 40 mg/ml) با 1ml از محلول $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1/865 mM) مخلوط شدند سپس 1ml H_2O_2 (0/03% w/v) به مخلوط اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت 60 دقیقه در دمای 37 درجه سانتی-گراد، جذب مخلوط در 536 نانومتر خوانده شد. مخلوط بدون هیچ آنتی اکسیدان به عنوان کنترل منفی و مخلوط بدون H_2O_2 بعنوان بلانک استفاده شد. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (14):

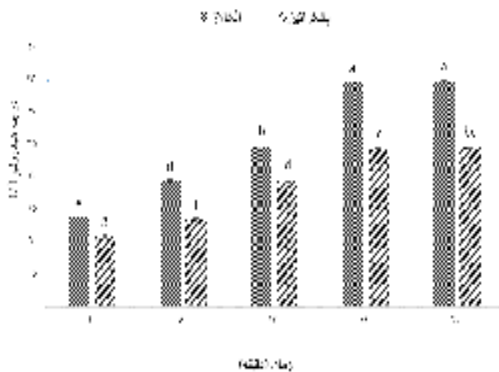
$$\text{HRSA } (\%) = \left[\frac{(A_s - A_n)}{(A_b - A_n)} \right] \times 100 \quad (4)$$

A_s جذب نمونه، A_b جذب بلانک، A_n جذب کنترل منفی می باشد.

10-2- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر مبنای احیاء مولیبدن 6 ظرفیتی به مولیبدن 5 ظرفیتی می باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. در این روش 0/1 ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت 50mg/ml -10) با 1ml معرف (اسیدسولفوریک 0/6 مولار، فسفات سدیم 28 میلی مولار و آمونیوم مولیبدات 4 میلی مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت 90 دقیقه در حمام آب 90 درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب

هیدرولیز و غیر فعال شدن آنزیم باشد (19). این نتایج مشابه یافته‌های موتیلاتنگی و همکاران (38)، جامدار و همکاران (21)، کریتینسون و راسکو (28) و یو و همکاران (51) می‌باشد که به ترتیب اثر آنزیم‌های مختلف را بر درجه هیدرولیز پروتئین‌های آب‌پنیر (تریپسین، کیموتریپسین، آلکالاز و نوترناز)، بادام زمینی (آلکالاز)، ماهی سالمون (آلکالاز، فلاورزیم و کرولاز) و ماهی تیان (پاپائین و پروتامکس) بررسی کردند.



شکل 1- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر درجه هیدرولیز پروتئین شنبلله

3-2- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

یون Fe^{2+} به‌عنوان کاتالیزور واکنش‌های اکسیداسیون عمل می‌کند و منجر به تولید رادیکال‌های خطرناک برای بدن می‌شود. فروزین حتی در مقادیر کم می‌تواند با یون Fe^{2+} ترکیب شود اما در حضور عوامل شلاته‌کننده این کمپلکس از هم گسیخته شده و منجر به کاهش رنگ بنفش می‌گردد، بنابراین با اندازه‌گیری میزان کاهش رنگ می‌توان میزان فعالیت شلاته‌کنندگی ترکیب را تخمین زد (49). با توجه به شکل 2، فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به میزان قابل توجهی از پروتئین اولیه بیشتر بود ($p < 0/05$)؛ این امر نشان‌دهنده‌ی عملکرد مناسب آنزیم‌های انتخابی در تولید پپتیدهایی با قابلیت شلاته‌کنندگی می‌باشد. درصد شلاته‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب بین 44/61-68/58 و 26/74-72/65 درصد متغیر و کمتر از فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ی کنترل

نمونه‌ها در 695 نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (41).

2-11- تجزیه و تحلیل آماری

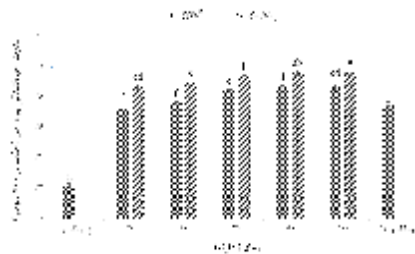
در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (40، 80، 120، 160 و 200 دقیقه) و نوع آنزیم (آلکالاز و پانکراتین) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی شنبلله با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 16 مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در 3 تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در $P < 0/05$ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

3- نتایج و بحث

3-1- درجه هیدرولیز

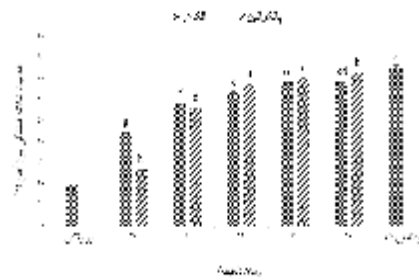
درجه هیدرولیز معیاری از میزان هیدرولیز ساختار پروتئین می‌باشد. شکل 1، اثر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم را بر میزان درجه هیدرولیز پروتئین شنبلله نشان می‌دهد. آنالیز آماری نشان‌دهنده‌ی اثر قابل ملاحظه‌ی زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر درجه هیدرولیز می‌باشد ($p < 0/05$)، به طوری که پس از گذشت 200 دقیقه از فرآیند هیدرولیز با پانکراتین درجه هیدرولیز 24/63% به دست آمد در حالی که درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آلکالاز 35/17% بود. نتایج کانگ و همکاران نیز در هیدرولیز گلوتن گندم حاکی از فعالیت بیشتر آنزیم آلکالاز در مقایسه با پانکراتین بود (27). درجه هیدرولیز با فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در 120 دقیقه‌ی اول با شیب زیادی افزایش یافت اما پس از آن از سرعت افزایش درجه هیدرولیز کاسته شد، این امر می‌تواند به دلیل تجزیه‌ی بیش از حد سوبسترا و همچنین اثر بازدارندگی محصول نهایی باشد که بر روی فعالیت آنزیم اثر منفی می‌گذارد و اهمیت زیادی در هنگام افزایش زمان هیدرولیز دارد (42). همچنین کاهش سرعت هیدرولیز می‌تواند به دلیل کاهش میزان باندهای پپتیدی موجود برای

تمامی نمونه‌های حاصل از فعالیت پانکراتین و نیز نمونه‌های حاصل از آلکالاز پس از 120 دقیقه هیدرولیز، دارای قدرت احیاء کنندگی بیشتر از نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) بودند ($p < 0/05$)، این یافته‌ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین بر افزایش قدرت احیاء-کنندگی پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاء-کنندگی شد، این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این‌که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (53)، از طرف دیگر افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر آمینواسیدهای الکترون دهنده مانند لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌گردد در نتیجه قدرت احیاء کنندگی افزایش می‌یابد (21). نتایج نشان دادند که قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پانکراتین بیشتر از آلکالاز بوده است که حاکی از عملکرد بهتر پانکراتین نسبت به آلکالاز در افزایش قدرت احیاء کنندگی می‌باشد. آمیگایلان و همکاران نیز با هیدرولیز پروتئین هسته‌ی خرما، با آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم و ترمولیزین گزارش کردند که پپتیدهای حاصل از آنزیم آلکالاز دارای قدرت احیاء کنندگی کمتری بودند (4). یو و همکاران (51)، زو و همکاران (53)، وو و همکاران (48)، به ترتیب افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی تیان، زئین و ماهی ماکرل را گزارش کردند.



شکل 3- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر قدرت احیاء-کنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

(ویتامین ث) بود. نتایج ارزیابی درصد شلاته کنندگی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی تاثیر قابل توجه زمان و درجه هیدرولیز بر فعالیت شلاته کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. به‌طور کلی قابلیت شلاته کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد (40). علاوه بر این موارد، پروتئین شنبلیله غنی از لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد (7) و (16)، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به دلیل دارا بودن حلقه‌ی ایمیدازول، توانایی شلاته کنندگی و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد را دارند بنابراین احتمالاً افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته کنندگی یون آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است (23 و 46). جامدار و همکاران (21) و کلامپانگ و همکاران (26) نیز به ترتیب افزایش فعالیت شلاته کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی بادام زمینی و نوعی ماهی² را با افزایش درجه هیدرولیز گزارش کردند.



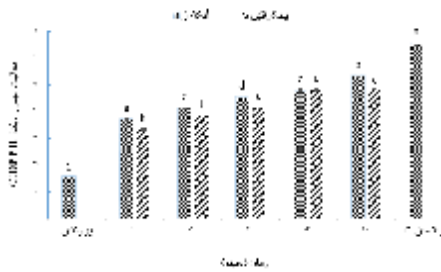
شکل 2- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته-کنندگی یون Fe^{2+} پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

3-3- تعیین قدرت احیاء کنندگی

ارزیابی قدرت احیاء کنندگی در جهت سنجش قابلیت الکترون‌دهندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کار می‌رود. مطالعات مختلفی نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاء کنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال وجود دارد (50). همانطور که در شکل 3، مشاهده می‌گردد، کمترین میزان قدرت احیاء کنندگی مربوط به پروتئین اولیه و به میزان 0/216 (جذب در 700 نانومتر) بود،

² Selaroides leptolepis

اهی تیان و کلاژن خوکی، رابطه‌ی مستقیمی را بین قدرت مهار رادیکال DPPH و درجه هیدرولیز گزارش کردند.



شکل 4- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده شنبله

3-5- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

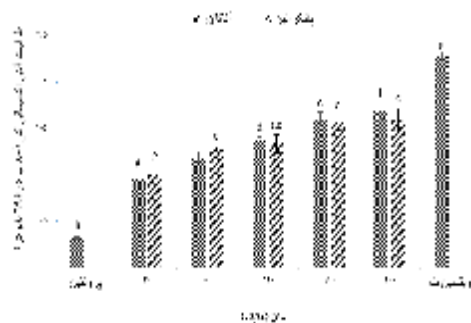
رادیکال هیدروکسیل به‌عنوان یکی از گونه‌های فعال اکسیژن که در بدن انسان تولید می‌شوند، به‌سرعت با مولکول‌های زیستی مانند آمینو اسیدها، DNA و پروتئین‌ها واکنش داده و منجر به اختلال در عملکرد بدن می‌گردد، بنابراین حذف رادیکال‌های هیدروکسیل منجر به حفاظت بدن از بسیاری از بیماری‌های خطرناک می‌گردد (23) و (11). آنالیز آماری نتایج نشان داد که به‌طور کلی نمونه‌های حاصل از فعالیت پانکراتین نسبت به آلکالاز دارای فعالیت مهارکنندگی بیشتری بودند. در پژوهشی دانگ و همکاران با هیدرولیز پروتئین ماهی کپور با دو آنزیم آلکالاز و فلاورزیم گزارش کردند که قدرت مهارکنندگی نمونه‌های حاصل از آلکالاز بیشتر از فلاورزیم بوده است (15). آن‌ها علت این امر را درجه‌ی هیدرولیز بیشتر نمونه‌های حاصل از آلکالاز گزارش کردند، بنابراین توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در جلوگیری از اکسیداسیون به‌ماهیت ماده‌ی اولیه و نوع پروتئاز مورد استفاده بستگی دارد (40). با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل 5، در این پژوهش کمترین میزان فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل مربوط به پروتئین شنبله و به میزان 10/93 درصد بود، مقدار این شاخص برای ویتامین ث 84/02 درصد محاسبه شد. افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل به میزان قابل ملاحظه‌ای گردید ($p < 0/05$). به‌طوریکه پس از انجام هیدرولیز به مدت 200 دقیقه با آنزیم‌های آلکالاز و

3-4- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH، رادیکال آزاد محلول در چربی است که دارای ماکزیمم جذب در 517 نانومتر است و پس از دریافت هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان به ترکیبی پایدار تبدیل می‌شود و جذب آن کاهش می‌یابد (51 و 53). نتایج حاصل از ارزیابی زمان هیدرولیز نشان می‌دهد که کمترین قدرت مهار رادیکال DPPH مربوط به پروتئین اولیه بوده و با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH، پروتئین‌های هیدرولیز شده به میزان قابل توجهی افزایش یافت ($p < 0/05$), به‌طوریکه در مورد نمونه‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب در محدوده‌ی 37/16-53/38 درصد و 33/25-47/86 درصد بود. مقدار این شاخص برای ویتامین ث 65/54 درصد به‌دست آمد. بنابراین افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهای دهنده‌ی پروتون شده که می‌توانند با رادیکال DPPH، واکنش داده و آن را به ترکیبات پایدار تبدیل کنند و به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی خاتمه دهند. با توجه به شکل 4، بین قدرت مهارکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم پانکراتین و آلکالاز تفاوت معنی‌داری وجود داشت و نمونه‌های حاصل از فعالیت آلکالاز دارای قدرت مهارکنندگی بیشتری بودند به‌طوری‌که پس از 200 دقیقه هیدرولیز با آنزیم آلکالاز قدرت مهار رادیکال DPPH، 53/38 درصد حاصل شد، علت این امر می‌تواند تفاوت در ترکیب و توالی و اندازه‌ی متفاوت در نتیجه‌ی درجه هیدرولیز متفاوت پپتیدهای حاصل از فعالیت این دو آنزیم باشد (12). باتیستا و همکاران با هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی³، گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد (6). آن‌ها علت این امر را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، بیان کردند. جامدار و همکاران (21)، یو و همکاران (51) و چن و همکاران (31)، نیز به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های سویا،

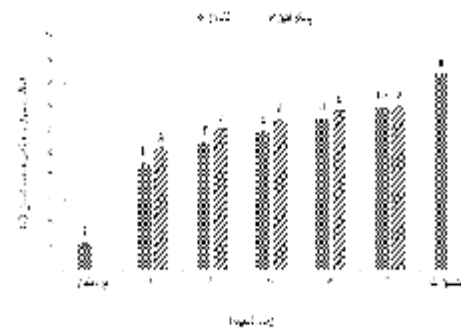
³ Apanopus carbo

آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبلیله گردید، افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها شد به طوری که بعد از انجام هیدرولیز به مدت 40 دقیقه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب 0/971 و 1/004 (جذب در 695 نانومتر) بود و با ادامه‌ی فرآیند هیدرولیز تا 200 دقیقه قدرت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$) و به میزان 1/69 و 1/6 رسید اما از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ویتامین ث (2/27) کمتر بود. در واقع با افزایش زمان فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین، رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی افزایش یافته است. این پپتیدها توانسته‌اند رادیکال‌های آزاد را به ترکیباتی پایدار با واکنش‌پذیری کمتر تبدیل کنند، در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها با افزایش زمان افزایش یافته است (5). آما یا پارواتی و همکاران (47)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی صدف خوراکی را وابسته به غلظت گزارش کردند و بیان کردند که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت 1 (mg/ml) حاصل شد اما از نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) کمتر بود. بوگاتف و همکاران، با هیدرولیز پروتئین ماهی گزارش کردند که با افزایش غلظت فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافت و نمونه‌ای حاصل از فعالیت تریپسین نسبت به پپسین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتری داشتند (9).



شکل 6- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

پانکراتین فعالیت مهارکنندگی به ترتیب به میزان 69/42 و 70/17 درصد افزایش یافت. افزایش زمان هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز منجر به تغییر در اندازه و ترکیب آمینواسیدی پپتیدها شده است و در نتیجه خاصیت آنتی-اکسیدانی آن‌ها افزایش یافته است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پپتیدهای حاوی هیستیدین دارای خاصیت شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل هستند، همچنین پپتیدهای دارای آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با قابلیت پروتون‌دهی به رادیکال‌های آزاد فعالیت ضداکسایشی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند (13)، بنابراین احتمالاً افزایش درجه هیدرولیز منجر به رهایش بیشتر پپتیدهای حاوی هیستیدین و تریپتوفان گشته است و در نتیجه فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل پپتیدها حاصل افزایش یافته است. این نتایج مطابق با یافته‌های یانگ جی و همکاران (22) و یو و همکاران (51) است که به ترتیب هیدرولیز پروتئین‌های جگر ماهی تن (آلکالاز، نوترناز، پروتامکس و فلاورزیم) و ماهی تیان (پاپائین و پروتامکس) را مورد بررسی قرار دادند.



شکل 5- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

3-6- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ارزیابی فسفومولیدن یک روش کمی برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی کل ترکیبات زیست فعال می‌باشد، همانطور که در شکل 6 نشان داده شده است، در این پژوهش هیدرولیز به میزان قابل توجهی منجر به افزایش ظرفیت

2. Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., and Agboola, S. 2014. Whey protein peptides as components of Nano emulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122: 15–27.
3. Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. In model and food systems. *Food Chemistry*, 105: 57–64.
4. Ambigaipalan, P., Al-Khalifa, A. S., and Shahidi, F. 2015. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *Journal of Functional Food* 27s, 18: 1125-1137.
5. Arabshahi-Delouee, S., and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4): 1233-1240.
6. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., and Nunes, M. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18-24.
7. Billaud, C., and Adrian, J. 2001. Fenugreek: Composition, nutritional value and physiological properties. *Sciences-des-ailments*, 21(1): 3-26.
8. Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A., and Isidra, R. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17: 42–49.
9. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and 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.
10. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–54.

4- نتیجه‌گیری

استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدان جهت جلوگیری از اکسیداسیون امری رایج در صنعت مواد غذایی است اما نگرانی‌هایی که در مورد مضرات آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، منجر به افزایش توجه دانشمندان به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گشته است. پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. در این پژوهش هیدرولیز پروتئین شنبلله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین انجام شد. نتایج نشان داد که، خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی شنبلله، با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به درجه‌ی هیدرولیز نمونه‌ها بستگی دارد و با افزایش درجه‌ی هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (قدرت مهار رادیکال DPPH، مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته‌کنندگی یون آهن، احیاءکنندگی و فعالیت آنتی-اکسیدانی کل) به میزان قابل توجهی افزایش یافت. پس از 200 دقیقه هیدرولیز، بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH و آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به نمونه‌های حاصل از آلکالاز، با درجه‌ی هیدرولیز 34/91 درصد و بیشترین قدرت شلاته‌کنندگی و احیاءکنندگی مربوط به نمونه‌های حاصل از پانکراتین و با درجه‌ی هیدرولیز 24/63 درصد بود. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل نمونه‌های حاصل از هر دو آنزیم پس از 200 دقیقه هیدرولیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. بنابراین، هیدرولیز آنزیمی پروتئین شنبلله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین راهکاری مناسب جهت تولید پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌باشد. با انجام آزمون‌های درون زیستی از این پپتیدها می‌توان در صنعت مواد غذایی به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی استفاده نمود.

5- منابع

1. مدرسی، م، و مهدیان، ب. 1390. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی دانه شنبلله بر فیزیولوژی تولید مثل جنس ماده Balb/c. فصلنامه‌ی داروهای گیاهی. شماره 4، ص 261-267.

- protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20: 489–498.
20. Guimaraes, F., and Maria, F. 2017. Identification of Peptides Released from Flaxseed (*linum Usitatissimum*) Protein By Alcalase (r) Hydrolysis: Antioxidant Activity. *LWT-Food Science and Technology*.
 21. Jamdar, SN., Rajalakshmi, V., Pednekar, MD., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121: 178–84.
 22. Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., and Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9): 1266-1272.
 23. Je, J. Y., Park, P. J., and Kim, S. K. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38: 45–50.
 24. Jia, J., Maa, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., and Luo, L. 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119: 336–42.
 25. Osman, M.K. and Simon, L.S., 1991. Biochemical studies of some non-conventional sources of protein. Part 5. Extraction and characterization of protein from fenugreek seed (*Trigonella foenum L.*). *Food/Nahrung*, 35(3): 303-308.
 26. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4): 1317-1327.
 27. Kong, X., Zhou, H., and Qian, H. 2007. Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101(2): 615-620.
 11. Cacciuttoloa, M. A., Trinha, L., Lumpkina, J. A., and Rao, G. 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 14: 267–276.
 12. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., and Kumar, B. D. 2015. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition*, 31(2): 388-398.
 13. Chen, HM., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., and Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46: 49–53.
 14. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., and 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.
 15. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107: 1485–1493.
 16. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., and Varidi, M.J. 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, science of food and agriculture, 15: 3165–3176.
 17. Fiaschi, T. and Chiarugi, P., 2012. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology*, 762-825.
 18. Gauthier, SF., Pouliot, Y., and Saint-Sauveur, D. 2006. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11):1315–23.
 19. Guerard, F., Guimas, L., and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral

- Agricultural and Food Chemistry, 53: 581–7.
37. Mullally, M.M., Callaghan, D.M., FitzGerald, R.J., Donnelly, W.J. and Dalton, J.P. 1995. Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. *Journal of Food Science*, 60: 227–233.
 38. Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., and Kilara, A. 1995. Hydrolysates from Proteolysis of Heat-denatured Whey Proteins. *Journal of food science*, 60(5): 1104-1109.
 39. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1): 238-242.
 40. Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 16: 1306–14.
 41. Prieto, P., Pineda, M., and 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: 337–41.
 42. Richardson, T. and Hyslop, D.B. 1985. Enzymes. Ch. 6 in *Food Chemistry*, O.R. Fennema (Ed.), p. 371-476. Marcel Dekker, Inc., New York.
 43. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., and Juneja, L. R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86(1): 99-103.
 44. Sienkiewicz-Szlapka, E., Jarmolowska, B., Krawczuk, S., Kostyra, E., Kostyra, H., and Iwan, M. 2008. Contents of agonistic and antagonistic opioid peptides in different cheese varieties. *International Dairy Journal*, 19(4): 258–63.
 45. Sun, J., He, H., and Xie BJ. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma*
 28. Kristinsson, H. G., Barbara, A., and Rasco, B.A. 2000. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36(1): 131-139.
 29. Leela, NK., and Shafeekh, KM. 2008. Fenugreek In *Chemistry of spices*, ed. By Parthasarathy VA, Chempakam B, Zachariah TJ. CAB International, 242-259.
 30. Lin, C. C., and Liang, J. H. 2002. Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system. *Journal of Food Science*, 67: 530–533.
 31. Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., and Wu, Y. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102: 1135–1143.
 32. Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444–3452.
 33. McCann, KB., Shiell, BJ., Michalski, WP., Lee, A., Wan, J., and Roginski, H. 2006. Isolation and characterisation of a novel antibacterial peptide from bovine aS1-casein. *International Dairy Journal*, 16: 316–23.
 34. Megias, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., and Vioque, J. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10): 1973-1977.
 35. Meisel, H., and FitzGerald, RJ. 2003. Bio functional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1289–95.
 36. Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, SK. 2005. Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of*

- zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(8): 2714-2721.
- lucidum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 6646-52.
46. Uchida, K., and Kawakishi, S. 1992. Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40: 13-16.
47. Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T. 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). Biomedicine & Preventive Nutrition, 4(3): 343-353.
48. Wu, H-C., Chen, H-M., and Shiau C-Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949-57.
49. Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimira, Y., and Nakazawa, H. 2000. Antioxidant and anti-glycation of carcinol from *Garcinia indica* fruit rind. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 180-5.
50. Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F., and Bilaloglu, V. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (*Tilia argentea* Desf Ex DC), sage (*Salvia triloba* L.) and black tea (*Camellia sinensis*) extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48: 5030-5034.
51. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 10: 235-40.
52. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., and Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 1619-1624.
53. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., and Xiong, Y. L. 2008. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated