

ویژگی‌های ضد اکسایشی پتیدهای زیست‌فعال شنبلیله حاصل از آنزیم پانکراتین

شیمیا کاوه^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۳، سید مهدی جعفری^۳ و خشایار سرابندی^۴

۱، ۲، ۳ و ۴- به ترتیب دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، استاد، دانشیار و دانش‌آموخته‌ی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۹۷/۹/۲۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۲۶

چکیده

در این پژوهش، به بهینه‌سازی فرایند آبکافت (هیدرولیز) پروتئین شنبلیله با آنزیم پانکراتین پرداخته شد و هدف از آن ارزیابی تأثیر متغیرهای زمان (۲۷۰-۳۰ دقیقه)، دما (۶۰-۲۰ درجه سلسیوس) و غلظت آنزیم (۳/۲۵-۰/۲۵ درصد) بر فعالیت مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن با استفاده از روش سطح پاسخ بود. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH (۴۲/۷۷ درصد)، و شلاته‌کنندگی یون آهن (۷۸/۵۷ درصد)، زمان ۱۴۱/۱۷ دقیقه، دما ۴۱/۹۳ درجه سلسیوس و غلظت آنزیم ۲/۱۴ درصد مشخص شد. در این شرایط، درجه هیدرولیز به میزان $36/8 \pm 0/35$ به دست آمد. مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت (هیدرولیز) شده و پروتئین اولیه نشان داد که آبکافت (هیدرولیز) به میزان قابل توجهی منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبلیله شده است. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تیمار بهینه در غلظت‌های ۵۰-۱۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بررسی شد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH (۵۰/۶۵ درصد) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب ۱/۶۵ در طول موج ۶۹۵ نانومتر)، مهار رادیکال هیدروکسیل (۶۹/۰۳ درصد) و شلاته‌کنندگی یون آهن (۷۹/۷۲ درصد) در غلظت ۵۰ (میلی‌گرم بر لیتر) و احیاکنندگی آهن (جذب ۰/۸ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در غلظت ۴۰ (میلی‌گرم بر لیتر) حاصل شد. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد فرآیند آبکافت (هیدرولیز) پروتئین شنبلیله با آنزیم پانکراتین، روشی مؤثر برای تولید پتیدهای آنتی‌اکسیدان است. از این پتیدها می‌توان به‌عنوان مکمل پروتئینی در فرمولاسیون مواد غذایی در تولید محصولات فراسودمند استفاده کرد.

کلید واژه‌ها

آبکافت پروتئین، روش سطح پاسخ، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

توانایی به‌تاخیرانداختن یا مهار فرآیند اکسیداسیون را داشته باشد. در صنعت مواد غذایی، از آنتی‌اکسیدان‌ها برای افزایش پایداری مواد غذایی مستعد اکسیداسیون استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند هیدروکسی آنیسول بوتیل‌اته، پروپیل گالات و ترشری بوتیل هیدروکینون به‌دلیل نگرانی‌های مرتبط با عوارض نامطلوب آنها بر سلامت انسان، تحت کنترل و

فرآیند اکسایش (اکسیداسیون) و تشکیل رادیکال‌های آزاد در اندام‌های هوایی اجتناب‌ناپذیر است. رادیکال‌های آزاد با تشدید واکنش‌های اکسایشی (اکسیداتیو) بیماری‌هایی خطرناک چون سرطان، آلزایمر، پیری زودرس و تصلب شرایین ایجاد می‌کنند (Hancock et al., 2001). آنتی‌اکسیدان ترکیبی است که در غلظت کم

لیزین و L-تریپتوفان است و خواص دارویی متعددی مانند کاهندگی قند و چربی خون، ضد درد و ضد سرطان دارد (Leela & Shafeekh, 2008). روش سطح پاسخ روشی سودمند برای ارزیابی فرآیندهای پیچیده است که به صورت موفقیت آمیزی در بهینه سازی فرآیندهای غذایی نیز به کار برده شده است. (Diniz & Martin, 1996).

هدف از این پژوهش، بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبلیله با استفاده از آنزیم پانکراتین به روش سطح پاسخ برای دستیابی به بیشترین قدرت شلاته کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH است. در این تحقیق، تأثیر غلظت های مختلف تیمار بهینه تولیدی (۵۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر) بر قابلیت آنتی اکسیدانی آن نیز بررسی و با قدرت آنتی اکسیدانی ویتامین ث و پروتئین هیدرولیز نشده مقایسه شد.

مواد و روش ها

مواد

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

چربی گیری از دانه شنبلیله

دانه های شنبلیله شسته و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند. آرد حاصل به نسبت ۱:۴ (وزنی/حجمی) با هگزان

نظارت شدید هستند. در سال های اخیر، افزایش آگاهی مصرف کنندگان در ارتباط بین سلامت و رژیم غذایی موجب شده است تقاضا برای غذاهای فراسودمند بالا رود (FitzGerald & Meisel, 2000). این عوامل توجه دانشمندان را به شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان از منابع طبیعی مانند پروتئین های غذایی افزایش داده است. پپتیدهای زیست فعال، دارای ۲۰-۲ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۶ کیلو دالتون هستند که در ساختار پروتئین اولیه غیر فعال اند و با واکنش هایی هیدرولیزی که به هنگام تخمیر یا هضم مواد غذایی رخ می دهند، فعال می شوند و ویژگی های سلامتی بخش مانند آنتی اکسیدانی، کاهندگی کلسترول و فعالیت ضد فشار خون دارند (Shimizu et al., 2009). منابع گیاهی، به دلیل قیمت مناسب و آلرژی زایی کمتر نسبت به منابع حیوانی، بیشتر مورد توجه دانشمندان قرار گرفته اند. مطالعات فراوان درون زیستی و برون زیستی، ویژگی های آنتی اکسیدانی پپتیدهای موجود در گیاهان را به اثبات رسانده اند. جامدار و همکاران (Jamdar et al., 2010) با هیدرولیز پروتئین بادام زمینی با آنزیم آلكالاز گزارش دادند که افزایش درجه هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت شلاته کنندگی یون آهن و مهار رادیکال DPPH می شود. ژو و همکاران (Zhu et al., 2006) با تولید پروتئین هیدرولیز شده جوانه گندم با آلكالاز می گویند قدرت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده های حاصل نزدیک به قدرت آنتی اکسیدانی α -توکوفرول است. در میان منابع پروتئینی گیاهی، دانه شنبلیله با نام علمی *Trigonella foenum Graceum* منبعی از پروتئین های گیاهی با مقدار کل پروتئین ۲۸۶-۲۵۰ گرم در کیلوگرم و غنی از

ادامه یافت. به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. محلول تا دمای محیط خنک شد. نمونه‌ها با سرعت ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Adjonu et al., 2014).

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

یک میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر با ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول دی کلرید آهن ۲ میلی‌مولار و ۱/۸۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیرشده مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فروزین ۵ میلی‌مولار افزوده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط در ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. از آب دوبار تقطیرشده به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید (Jamdar et al., 2010) که در آن A_c : جذب نمونه شاهد و A_s : جذب نمونه است.

$$\text{Fe Chelating activity(\%)} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100 \quad (1)$$

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

یک و نیم میلی‌لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر لیتر با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. مخلوط حاصل با سرعت ۲۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه ۲ محاسبه گردید (Wu et al., 2003) که در آن A_{blank} جذب نمونه شاهد و A_{sample} جذب نمونه است.

مخلوط و ۳ ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر با سرعت ۱۵۰ دور بر دقیقه هم‌زده شد. با استفاده از قیف بوخنر، هگزان جدا شد. پودر حاصل ۱ ساعت در آون با دمای ۳۰ درجه سلسیوس گذاشته و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد (Feyzi et al., 2015).

تهیه کنسانتره پروتئین شنبلیله

شنبلیله به نسبت ۱:۱۰ با محلول کلرید سدیم ۰/۳ مولار، مخلوط و pH آن با سود ۱ نرمال روی ۹/۲ تنظیم و به مدت ۱ ساعت هم‌زده شد. محلول حاصل با سرعت ۴۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس pH سوپرناتانت روی ۴/۵ (pH ایزوالکتریک پروتئین شنبلیله) تنظیم شد و در $4500 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل (کنسانتره پروتئین) با آب مقطر دو بار شسته و در $4500 \times g$ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. کنسانتره پروتئینی حاصل با خشک کن انجمادی خشک و تا آغاز آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد (Feyzi et al., 2015).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

میزان پروتئین، خاکستر و رطوبت با استفاده از روش AOAC اندازه‌گیری شد (AOAC, 2000).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده

کنسانتره پروتئین شنبلیله در غلظت ۵ درصد (حجمی/وزنی) در بافر فسفات ۰/۲ مولار (۷/۴ = pH) حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با هم‌زدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم آمد. آنزیم به نسبت‌های مورد نظر (جدول ۴) به محلول اضافه شد. تمامی واکنش‌ها در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه، در دما و زمان مورد نظر برای هر تیمار (جدول ۴)

واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی است (Ahmadi et al., 2007).

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد

DPPH

برای بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف (۵۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر) نمونه‌ها بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به ترتیب از روش جامدار و همکاران (Jamdar et al., 2010) و وو و همکاران (Wu et al., 2003) استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

ابتدا ۱ میلی لیتر از ۱ و ۱۰ فنلانترولین (۱/۸۶۵ میلی مولار) و ۲ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر) با ۱ میلی لیتر از محلول $FeSO_4 \cdot H_2O$ (۱/۸۶۵ میلی مولار) مخلوط گردید و پس از آن ۱ میلی لیتر H_2O_2 با غلظت ۰/۰۳ درصد (حجمی/وزنی) به مخلوط اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، جذب مخلوط در ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط بدون آنتی‌اکسیدان به عنوان کنترل منفی و مخلوط بدون H_2O_2 به عنوان بلانک استفاده شد (Prieto et al., 1999). قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد که در آن: A_s جذب نمونه، A_b جذب بلانک، A_n جذب کنترل منفی است.

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

ظرفیت ضد اکسایشی کل

ابتدا ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر) با ۱ میلی لیتر از معرف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار،

$$I(\%) = \left(\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right) \times 100 \quad (2)$$

درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید ۰/۴۴ مولار در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس انکوبه شد. مخلوط با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ مولار با روش بردفورد (Bradford, 1976) و سرانجام درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه ۳ تعیین شد.

$$DH(\%) = \left(\frac{\text{Protein(TCA+Supernatant)}}{\text{Protein (hydrolysate suspension)}} \right) \times 100 \quad (3)$$

بررسی تأثیر غلظت بر خصوصیات آنتی اکسیدانی تیمار بهینه هیدرولیز شده قدرت احیاکنندگی آهن

نیم میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۵۰-۱۰ میلی گرم بر لیتر) با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار، (pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، خوانده شد. حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط

چربی‌گیری نشده شنبليله ۱۲/۲۵ درصد یعنی بیشتر از مقداری است که فیضی و همکاران (Feyzi *et al.*, 2015) و هماواتی و همکاران (Hemavathy & Prabhakar, 1989) گزارش داده اند. احتمالاً این تفاوت ناشی از تفاوت در گونه شنبليله مورد استفاده و روش روغن‌گیری است. دلیل کاهش میزان چربی موجود در کنسانتره پروتئینی شنبليله نسبت به پودر اولیه، فرآیند استخراج پروتئین در محلول قلیایی، ترسیب در نقطه ایزوالکتریک و چربی‌گیری با هگزان است. میزان کم چربی موجود در کنسانتره حاصل (۲/۲ درصد) حاکی از کارایی مناسب هگزان به‌عنوان حلال برای فرآیند چربی‌گیری از دانه شنبليله است. در جدول ۱ مشاهده می‌شود که کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی حاصل است که دلیل آن استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سلسیوس برای خارج کردن باقی‌مانده هگزان پس از فرآیند چربی‌گیری و نیز استفاده از خشک کن انجمادی به منظور خشک کردن رسوب پروتئینی حاصل پس از فرآیند استخراج پروتئین است. مقدار پروتئین در پودر چربی‌گیری نشده ۲۷/۵۷ درصد بود که این میزان به‌شکلی چشمگیر کمتر از مقدار پروتئین گزارش شده توسط النصری و همکاران (Elnasri & El Tinay, 2007) و شاید و همکاران (Sayed *et al.*, 2000) و تقریباً یکسان با میزان گزارش شده توسط ساویر و همکاران (Sauvaire *et al.*, 1984) است.

سدیم فسفات ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیرشده به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (Chi *et al.*, 2015).

تجزیه و تحلیل آماری

شرایط هیدرولیز با نرم افزار Design expert نسخه ۷ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه سازی شد. متغیرهای مستقل دما، زمان و غلظت آنزیم در پنج سطح (+ α ، +۱، ۰، -۱، - α) و چهار نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ مورد بررسی قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نظر گرفته شد. اثر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ارزیابی شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵ درصد مقایسه و نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شدند.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی

میزان رطوبت، خاکستر و پروتئین کنسانتره پروتئین حاصل در جدول ۱ نشان داده شده است. مشاهده می‌شود که میزان چربی در پودر

جدول ۱- ترکیبات شیمیایی پودر چربی‌گیری شده، پودر چربی‌گیری نشده و کنسانتره پروتئین شنبليله

نمونه	ترکیبات	پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر (درصد)
پودر چربی‌گیری نشده	۲۷/۵۷±۰/۳۳ ^c	۸/۰۳±۰/۳۵ ^a	۱۲/۲۵±۰/۵۳ ^a	۷/۶۵±۰/۱۴ ^a	
پودر چربی‌گیری شده	۴۵/۰۳±۰/۶۱ ^b	۷/۲±۰/۲۶ ^b	۴/۰۶±۰/۲۷ ^b	۳/۵۳±۰/۱۱ ^b	
کنسانتره پروتئین شنبليله	۷۵/۲۷±۰/۵۵ ^a	۶/۲±۰/۲۵ ^c	۲/۲۰±۰/۳۰ ^c	۱/۱۱±۰/۱۵ ^c	

حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف آماری معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

در این جدول ۳ دیده می‌شود اثر دما و متغیرهای کمترین میزان خاکستر به ترتیب مربوط به پودر چربی گیری نشده و کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن فرآیند استخراج پروتئین است که در آن مقدار زیادی از ترکیبات غیر پروتئینی در $pH=9$ رسوب می‌کنند.

بهبودسازی هیدرولیز کنسانتره پروتئین شنبلیله

در نقاط تعریف شده در جدول ۲ هیدرولیز اجرا شد. تأثیر متغیرهای دما (A)، زمان (B) و غلظت آنزیم (C) بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با تجزیه و تحلیل ضریب‌های رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جدول‌های ۳ و ۴ بررسی شد.

تأثیر زمان، دما و غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

در جدول ۳ دیده می‌شود اثر دما و متغیرهای کمترین میزان خاکستر به ترتیب مربوط به پودر چربی گیری نشده و کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن فرآیند استخراج پروتئین است که در آن مقدار زیادی از ترکیبات غیر پروتئینی در $pH=9$ رسوب می‌کنند.

بهبودسازی هیدرولیز کنسانتره پروتئین شنبلیله

در نقاط تعریف شده در جدول ۲ هیدرولیز اجرا شد. تأثیر متغیرهای دما (A)، زمان (B) و غلظت آنزیم (C) بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با تجزیه و تحلیل ضریب‌های رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جدول‌های ۳ و ۴ بررسی شد.

تأثیر زمان، دما و غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

بهبودسازی هیدرولیز کنسانتره پروتئین شنبلیله

در نقاط تعریف شده در جدول ۲ هیدرولیز اجرا شد. تأثیر متغیرهای دما (A)، زمان (B) و غلظت آنزیم (C) بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌ها با تجزیه و تحلیل ضریب‌های رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جدول‌های ۳ و ۴ بررسی شد.

تأثیر زمان، دما و غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

$$(5) \quad = \text{فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن} \\ 64.73 + 8.69AB - 5.51BC - 5.55A^2 - 7.57B^2$$

جدول ۲- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و پاسخ متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل

تیمار	زمان (دقیقه)	دما (درجه سلسیوس)	غلظت آنزیم (درصد)	فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (درصد)	فعالیت مهار رادیکال DPPH (درصد)
۱	۳۰	۴۰	۱/۷۵	۲۴/۲۷	۳۴/۷۵
۲	۹۰	۵۰	۱/۰۰	۳۵/۹	۳۳/۳۰
۳	۹۰	۵۰	۲/۵۰	۳۷/۱۶	۳۷/۳۵
۴	۹۰	۳۰	۱/۰۰	۵۴/۲۹	۳۳/۸
۵	۹۰	۳۰	۲/۵۰	۷۲/۴۱	۳۴/۶۵
۶	۱۵۰	۴۰	۰/۲۵	۵۸/۲۴	۳۲/۱۰
۷	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۶۴/۷۲	۳۹/۴۰
۸	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۶۵/۱	۳۸/۸۰
۹	۱۵۰	۲۰	۱/۷۵	۳۶/۳	۲۳/۷۱
۱۰	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۶۴/۳	۳۹/۶۱
۱۱	۱۵۰	۴۰	۳/۲۵	۶۰/۲۴	۳۴/۹۰
۱۲	۱۵۰	۶۰	۱/۷۵	۳۲/۵۳	۳۵/۲۵
۱۳	۲۱۰	۳۰	۱/۰۰	۳۶/۲۲	۲۷/۰۰
۱۴	۲۱۰	۵۰	۲/۵۰	۵۱/۴	۳۴/۳۵
۱۵	۲۱۰	۳۰	۲/۵۰	۵۷/۰۸	۳۴/۳۰
۱۶	۲۱۰	۵۰	۱/۰۰	۴۷/۷۵	۳۹/۵۵
۱۷	۲۷۰	۴۰	۱/۷۵	۵۰/۷۱	۳۱/۱۵

جدول ۳- تجزیه واریانس فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

درجه آزادی	عدد P	ضریب رگرسیون	مدل
۹	۰/۰۰۲۴	۶۴/۷۳	A
۱	۰/۱۲۶۲	۲/۲۲	B
۱	۰/۰۶۲۶	-۲/۸۳	C
۱	۰/۱۰۶۹	۲/۳۷	AB
۱	۰/۰۰۲۰	۸/۶۹	AC
۱	۰/۷۴۶۷	-۰/۶۱	BC
۱	۰/۰۱۸۸	-۵/۵۱	A ²
۱	۰/۰۰۲۰	-۵/۵۵	B ²
۱	۰/۰۰۰۳	-۷/۵۷	C ²
۱	۰/۲۷۹۷	-۱/۳۶	R ² -Pred
		۰/۸۰۲۱	R ² -Adj
		۰/۸۴۶۱	Lac of fit
۵	۰/۲۱۶		

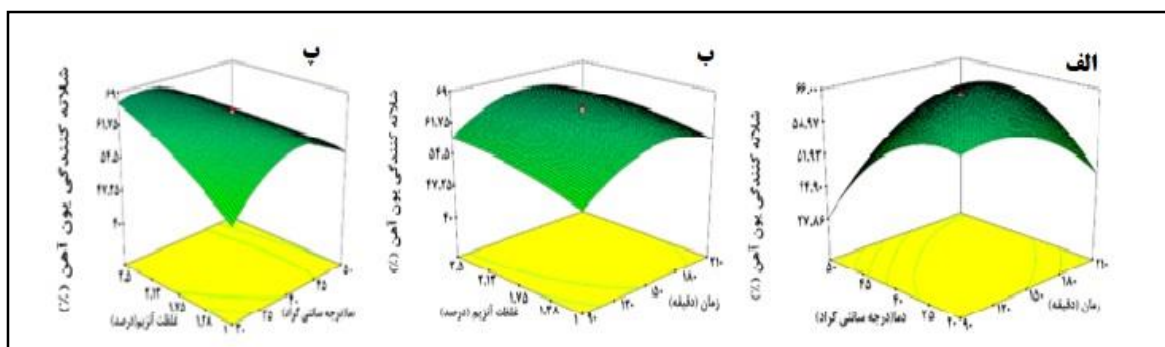
* A: زمان; B: دما; C: غلظت آنزیم است.

هیدرولیزشده ژلاتین مشاهده کردند. با توجه به شکل ۱-الف افزایش دما بیشتر از ۴۰ درجه سلسیوس، منجر به کاهش فعالیت شلاته‌کنندگی از ۶۰ به ۴۰ درصد شده‌است. دور شدن از محدوده دمایی بهینه فعالیت آنزیم پانکراتین (۴۰ درجه سلسیوس) به دلیل واسرشتی (دناتوراسیون) حرارتی ساختار پروتئاز منجر به کاهش توانایی آنزیم در تولید پپتیدهای شلاته‌کننده با کارایی بالا می‌گردد (Kurozawa et al., 2008). بهاسکار و همکاران (Bhaskar et al., 2008) و لیاست و همکاران (Liaset et al., 2002) نیز به ترتیب با هیدرولیز پروتئین حاصل از ضایعات ماهی *Catla* و ماهی *Atlantic salmon* گزارش کردند که بالاترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مربوط به پپتیدهای حاصل از هیدرولیز در دمای بهینه فعالیت آنزیم است و افزایش بیشتر دما اثر منفی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل دارد. شکل ۱-ب اثر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز را بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن نشان می‌دهد. در دمای

همان طور که در شکل ۱-الف مشخص است، در غلظت ثابت آنزیم ۱/۷۵ درصد، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۸ دقیقه و افزایش دما تا ۳۹/۴ درجه سلسیوس فعالیت شلاته‌کنندگی افزایش می‌یابد و به مقدار بیشینه ۶۵ درصد می‌رسد. کمترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی (۳۸/۸ درصد) در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه و دمای ۵۰ درجه سلسیوس حاصل شده‌است. به‌طور کلی فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله با افزایش زمان تا ۱۵۸ دقیقه افزایش و از آن پس کاهش یافته‌است. این امر احتمالاً به دلیل تولید پپتیدهای کوتاه‌زنجیر و توانایی اندک آنها در به‌دام انداختن یون آهن است (Maghsudlou et al., 2017). بنابراین، هیدرولیز محدود منجر به تولید پپتیدهایی با قدرت شلاته‌کنندگی بیشتر می‌شود. این نتایج مطابق با یافته‌های خانتافانت و همکاران (Khantaphant et al., 2011) است که اثر منفی افزایش زمان و درجه هیدرولیز را بر قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین

است (Kurozawa *et al.*, 2008). مقصودلو و همکاران (Maghsudlou *et al.*, 2017) با بهینه سازی شرایط هیدرولیز گرده گل، گزارش کردند که اثر غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته کنندگی معنی دار نیست؛ این نتیجه گیری با نتایج این پژوهش همخوانی ندارد، این امر می تواند به دلیل تفاوت در شرایط هیدرولیز، نوع پروتئاز و ماهیت ماده اولیه باشد. در شکل ۱-پ دیده می شود با افزایش دما تا ۴۰ درجه سلسیوس، فعالیت شلاته کنندگی افزایش و پس از آن کاهش یافته است. کارایی و فعالیت آنزیم در دماهای کمتر از دمای بهینه فعالیت آنزیم (۴۰ درجه سلسیوس) ناچیز است، در نتیجه پپتیدهای به دست آمده فعالیت آنتی اکسیدانی مطلوبی ندارند. در زمان ثابت ۱۵۰ دقیقه، افزایش غلظت آنزیم در دماهای کمتر از ۴۵ درجه سلسیوس به افزایش فعالیت شلاته کنندگی انجامیده که احتمالاً به دلیل افزایش جایگاه های فعال آنزیم با افزایش غلظت آن است. دماهای بیشتر از ۴۵ درجه سلسیوس، تأثیر منفی بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها دارد که می تواند به دلیل دور شدن از دمای بهینه فعالیت آنزیم و واسرشتی (دنا تورا سیون) ساختار آنزیم در دماهای بالاتر از ۴۵ درجه سلسیوس باشد.

ثابت ۴۰ درجه سلسیوس، بیشترین و کمترین فعالیت شلاته کنندگی به ترتیب در زمان هیدرولیز ۱۵۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۷۵ درصد و زمان ۹۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱ درصد حاصل شده است. با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه، فعالیت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبليله افزایش و پس از آن تأثیر منفی داشته است. این موضوع می تواند به دلیل تشکیل ترکیبات بازدارنده آنزیمی در زمان های هیدرولیز طولانی تر باشد که به عنوان سوبسترای رقابتی با پروتئین هیدرولیز نشده عمل می کنند و در نتیجه کارایی آنزیم در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان کم می شود؛ افزایش زمان هیدرولیز بیش از ۱۵۰ دقیقه نیز می تواند با هیدرولیز پپتیدهای شلاته کننده تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز، به کاهش فعالیت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده انجامد (Ovissipour *et al.*, 2009). افزایش فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با افزایش غلظت آنزیم، احتمالاً به دلیل افزایش تعداد جایگاه های فعال در دسترس برای هیدرولیز سوبسترا و در نتیجه شکسته شدن پیوندهای پپتیدی بیشتر و افزایش انحلال پذیری پروتئین هاست که در نتیجه این عوامل فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه ها افزایش یافته



شکل ۱- تأثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت شلاته کنندگی: (الف) اثر زمان (دقیقه) و دما (درجه سلسیوس)؛ (ب) زمان هیدرولیز (دقیقه) و غلظت آنزیم (درصد)؛ (پ) دما (درجه سلسیوس) و غلظت آنزیم (درصد)

دوم با ضریب همبستگی $R^2=0/8735$ است که نشان می‌دهد مدل توانسته ۸۷/۳۵ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند. رابطه ۶ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت مهار رادیکال DPPH را نشان می‌دهد.

$$(۶) \text{ فعالیت مهار رادیکال DPPH} \\ = 39.44 + 2.37B \\ - 1.56A^2 - 2.43B^2 \\ - 1.42C^2$$

تأثیر زمان، دما و غلظت آنزیم بر فعالیت مهار رادیکال DPPH

در جدول ۴ دیده می‌شود اثر متغیرهای دما، A^2 ، B^2 و C^2 بر مهار رادیکال DPPH معنی‌دار است ($P < 0/05$). در این میان، تأثیر متغیر B^2 نسبت به سایر متغیرها بیشتر است. معنی‌دار نبودن فاکتور برازش نشدن بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهار رادیکال DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال DPPH با هر یک از متغیرهای واکنش از نوع درجه

جدول ۴- تجزیه واریانس فعالیت مهار رادیکال DPPH

درجه آزادی	عدد P	ضریب رگرسیون	مدل
۹	۰/۰۱۸۷	۳۹/۴۴	مدل
۱	۰/۲۶۸۱	-۰/۶۹	A
۱	۰/۰۰۴۵	۲/۳۷	B
۱	۰/۲۱۴۳	۰/۷۹	C
۱	۰/۱۵۵۰	۱/۳۰	AB
۱	۰/۶۸۰۷	-۰/۳۵	AC
۱	۰/۱۹۷۱	-۱/۱۶	BC
۱	۰/۰۲۰۷	-۱/۵۶	A^2
۱	۰/۰۰۲۴	-۲/۴۳	B^2
۱	۰/۰۳۰۱	-۱/۴۲	C^2
		۰/۸۲۰۶	R^2 -Pred
		۰/۸۷۰۲	R^2 -Adj
۵	۰/۱۲۵		Lac of fit

*A: زمان B: دما C: غلظت آنزیم

فعالیت آن در تولید پیتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌انجامد. افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۳۵ دقیقه منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها شده اما ادامه فرایند هیدرولیز از قابلیت مهار رادیکال DPPH نمونه‌ها کاسته‌است. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پیتیدهای تولیدشده در

در شکل ۲-الف مشاهده می‌شود که در غلظت ثابت آنزیم ۱/۷۵ درصد، با افزایش دما تا ۴۰ درجه سلسیوس، فعالیت مهار رادیکال DPPH افزایش و پس از آن کاهش یافته‌است. افزایش دما منجر به واسرشتی (دناتوراسیون) و تخریب ساختار پروتئینی آنزیم پانکراتین می‌شود که به کاهش

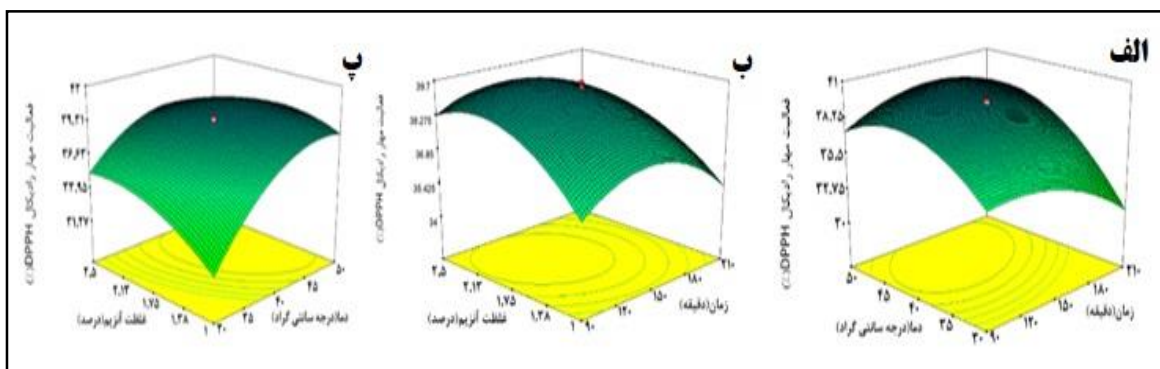
ماهی *Persian sturgeon* می‌گویند افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی رادیکال DPPH تا ۴۰ درصد می‌شود اما افزایش بیشتر تأثیر منفی دارد. نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al.*, 2017) با هیدرولیز پروتئین دانه کدو گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۵ درصد کاهش و بیشتر از آن تا ۲ درصد، افزایش می‌یابد. به‌طور کلی فعالیت ضداکسایشی پپتیدها به نوع پروتئاز، درجه هیدرولیز و ماهیت پپتیدهای آزادشده (وزن مولکولی، توالی آمینواسیدی و ساختار پپتید) طی فرآیند هیدرولیز بستگی دارد. با توجه به شکل ۲-پ، فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش دما تا ۴۰ درجه سلسیوس و افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد افزایش و پس از آن با افزایش بیشتر دما و غلظت آنزیم کاهش یافته‌است. با ترکیب مناسبی از دما و غلظت آنزیم، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH تا حدود ۴۰ درصد افزایش پیدا می‌کند. دور شدن از محدوده دمایی بهینه فعالیت آنزیم منجر به کاهش کارایی آن در تولید پپتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهینه می‌گردد. با افزایش غلظت آنزیم بیشتر از ۲ درصد، نقاط فعال آنزیم و در نتیجه میزان واکنش بین آنزیم و سوبسترا افزایش می‌یابد، در نتیجه با هیدرولیز بیش از حد پروتئین، آمینواسیدهای هیدروفیل بیشتری آزاد می‌شوند که قابلیت کمی در مهار رادیکال DPPH دارند، بنابراین قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده حاصل کاهش می‌یابد. مشابه نتایج این پژوهش، نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al.*, 2017) با هیدرولیز پروتئین دانه کدو با آنزیم پپسین گزارش کردند

مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهای با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است؛ در نتیجه، قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده در مراحل بعدی کاهش یافته است (Meshkinfar *et al.*, 2014). مشابه یافته‌های این پژوهش، شعبان‌پور و همکاران (Sha'banpour *et al.*, 2017) با بررسی تأثیر زمان هیدرولیز بر قدرت مهار رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین میگو گزارش کردند که با افزایش زمان هیدرولیز، قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل به‌میزان قابل توجهی کاسته می‌شود. این نتایج مخالف با یافته‌های باتیستا و همکاران (Batista *et al.*, 2010) در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از ماهی *Aphanopus carbo* است؛ این محققان می‌گویند افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH نمونه‌ها می‌شود که می‌تواند ناشی از تفاوت در ماده اولیه، نوع پروتئاز مورد استفاده و شرایط هیدرولیز باشد. با توجه به شکل ۲-ب در دمای ثابت ۴۰ درجه سلسیوس، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها شده اما پس از آن تأثیر منفی داشته‌است. فعالیت مهار رادیکال DPPH، با افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد، افزایش اما بیشتر از آن کاهش می‌یابد. علت این امر را می‌توان به هیدرولیز بیش از حد پروتئین نسبت داد که منجر می‌شود به رهایش کامل آمینواسیدهای هیدروفیل و در نتیجه دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال DPPH محلول در چربی (Zhu *et al.* 2008). مشابه نتایج این پژوهش، اویسی‌پور و همکاران (Ovissipour *et al.*, 2009) با بررسی اثر زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل از هیدرولیز

ویژگی‌های ضد اکسایشی پپتیدهای زیست‌فعال شنبليله...

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل می‌شود و دلیل این امر را افزایش پپتیدهای دهنده هیدروژن به دلیل افزایش درجه هیدرولیز پروتئین گزارش کرده‌اند. این اختلاف در نتایج می‌تواند به دلیل اختلاف در نوع پروتئاز، شرایط هیدرولیز و نوع پروتئین اولیه باشد.

که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش دما تا ۳۵ درجه سلسیوس افزایش و با دور شدن از دمای بهینه فعالیت آنزیم کاهش می‌یابد. باتیستا و همکاران (Batista et al., 2010) با هیدرولیز پروتئین ماهی *Aphanopus carbo* با آنزیم پروتامکس گزارش داده‌اند که افزایش غلظت آنزیم در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز منجر به افزایش



شکل ۲- تأثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت مهار رادیکال DPPH: (الف) اثر زمان (دقیقه) و دما (درجه سلسیوس)؛ (ب) زمان هیدرولیز (دقیقه) و غلظت آنزیم (درصد)؛ (پ) دما (درجه سلسیوس) و غلظت آنزیم (درصد)

قدرت احیاکنندگی آهن

آزمون قدرت احیاکنندگی آهن برای ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات بر اساس توانایی آنها در اهدای الکترون و در نتیجه احیای یون Fe^{3+} به Fe^{2+} به کار می‌رود. قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبليله است (جدول ۵). این امر نشان از موفقیت آمیز بودن فرآیند هیدرولیز با آنزیم پانکراتین برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان دارد. علت این امر را می‌توان به رها شدن آمینواسیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیزین و تریپتوفان نسبت داد (Jamdar et al., 2010). قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده رفتاری وابسته به

انتخاب تیمار بهینه و اعتبار سنجی مدل

با نرم افزار پیش بینی شد که مدت زمان ۱۴۱/۱۷ دقیقه، دمای ۴۱/۹۳ درجه سلسیوس، و غلظت آنزیم ۲/۱۴ درصد شرایط بهینه‌ای است برای دستیابی به بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH (۴۲/۷۷ درصد) و شلاته‌کنندگی یون آهن (۷۸/۵۷ درصد). برای ارزیابی اعتبار مدل، هیدرولیز تحت این شرایط دنبال شد و فعالیت مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن به ترتیب ۴۸/۷۱ درصد و ۷۹/۶۲ درصد به دست آمد. این نتایج بیانگر توانایی خوب مدل در پیش‌بینی اثر متغیرهای دما، زمان و غلظت آنزیم بر فرآیند هیدرولیز است. درجه هیدرولیز تیمار بهینه به میزان $35/1 \pm 0/43$ محاسبه شد.

نوع آنزیم به کار رفته و درجه هیدرولیز بستگی دارد (Pihlanto, 2006). بنابراین، آنزیم پانکراتین توانسته پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی مناسب و با قابلیت به دام اندازی یون آهن تولید کند. نتایج حاصل از این پژوهش مشابه با یافته‌های ژو و همکاران (Zhu *et al.*, 2006) و کلامپانگ و همکاران (Klompong *et al.*, 2007) به ترتیب در هیدرولیز پروتئین جوانه گندم و ماهی *Selaroides leptolepis* است.

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل یکی از گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن است که در بدن انسان تولید می‌شود. این رادیکال می‌تواند به آسانی با مولکول‌های زیستی مانند آمینواسیدها، پروتئین و DNA واکنش دهد و منجر به ایجاد اختلالات فیزیولوژیکی در بدن انسان شود (Cacciuttolo *et al.*, 1993). بنابراین، حذف رادیکال هیدروکسیل به حفاظت بدن از بسیاری از بیماری‌ها می‌انجامد. فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین شنبلیله قبل از هیدرولیز، ۱۳/۵ درصد بود و پس از هیدرولیز در غلظت ۱۰ (میلی گرم در لیتر) به طور معنی داری افزایش یافت و به ۳۰ درصد رسید (جدول ۵). افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده تا ۴۰ (میلی گرم در لیتر) به میزانی چشمگیر منجر شده است به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل تا ۶۶/۷ درصد، اما این میزان کمتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث در مهار رادیکال هیدروکسیل است. فعالیت ضد اکسایش پپتیدها به نوع آمینواسیدها و گروه‌های فعال بستگی دارد که طی فرایند هیدرولیز آزاد می‌شوند. ثابت شده است که آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با قابلیت پروتون دهی به رادیکال‌های آزاد دارای

غلظت از خود نشان داده‌اند به طوری که با افزایش غلظت تا ۳۰ (میلی گرم در میلی لیتر)، قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها به میزان زیادی افزایش یافته اما افزایش بیشتر غلظت تأثیر معنی داری بر قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نداشته‌است. قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها در تمامی غلظت‌ها کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث است. کامبی و همکاران (Cumby *et al.*, 2008) و ژی و همکاران (Xie *et al.*, 2008) نیز به ترتیب با هیدرولیز پروتئین کانولا و گیاه یونجه، قدرت احیاکنندگی پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کرده‌اند.

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

یون Fe^{2+} به عنوان کاتالیزور واکنش Haber-Weiss عمل می‌کند و منجر به تشکیل رادیکال‌های خطرناک هیدروکسیل می‌شود. رادیکال‌های هیدروکسیل به سرعت با مولکول‌های زیستی مجاور واکنش می‌دهند و آسیب‌هایی جبران ناپذیر ایجاد می‌کنند (Afanas'ev *et al.*, 1989). گزارش شده است که مهار رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق آنتی‌اکسیدان‌ها عمدتاً از طریق شلاته کردن یون‌های فلزی صورت می‌گیرد. فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده در تمامی غلظت‌ها از فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین شنبلیله بیشتر است، به طوری که با افزایش غلظت تا ۳۰ (میلی گرم در میلی لیتر)، فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده تا ۷۹ درصد افزایش یافته این مقدار تفاوت معنی داری با فعالیت شلاته‌کنندگی ویتامین ث در غلظت ۵۰ (میلی گرم در میلی لیتر) ندارد (جدول ۵). قابلیت پروتئین هیدرولیز شده در شلاته‌کنندگی یون آهن به ماهیت پروتئین اولیه،

ویژگی‌های ضداکسایشی پپتیدهای زیست‌فعال شنبليله...

به ۵۶ درصد رسیده‌است. چی و همکاران (Chi et al., 2015) و ژی و همکاران (Xie et al., 2008) به ترتیب با هیدرولیز آنزیمی پروتئین جاندار دریایی *Tegillarca granosa* و گیاه یونجه، فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کرده‌اند.

فعالیت ضداکسایشی در سیستم‌های غذایی هستند (Chen et al., 1998). یو و همکاران (You et al., 2009) نیز گزارش کردند که فرآیند هیدرولیز آنزیمی به‌طور معنی‌داری منجر شده است به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین ماهی *Misgurnus anguillicaudatus* و با افزایش درجه هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل

جدول ۵- مقایسه قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته‌کنندگی، یون آهن و قدرت احیاکنندگی در غلظت‌های مختلف (۱۰-۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با پروتئین اولیه ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ویتامین ث ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

ویتامین ث ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	پروتئین شنبليله (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)
۸۸/۴۰±۴/۰۲a	۶۹/۰۳±۰/۴۱b	۶۶/۶۶±۱/۶۵b	۵۱/۳۱±۱/۰۵c	۴۲/۲۱±۰/۸۸d	۳۰/۱۱±۲/۰۹e	۱۳/۵۱±۱/۰۸f
۸۰/۰۳±۰/۸۰a	۷۹/۷۲±۰/۸۰a	۷۹/۵۱±۰/۴۸a	۷۹/۰۷±۰/۴۸a	۶۱/۸۷±۱/۱۳b	۷۵/۵۶±۰/۶۴c	۲۳/۸۵±۴/۰۲d
۰/۸۷±۰/۰۲a	۰/۷۸±۰/۰۲b	۰/۸۰±۰/۰۰۵b	۰/۷۸±۰/۰۰۴b	۰/۵۹±۰/۰۰۹c	۰/۴۰±۰/۰۱d	۰/۳۱±۰/۰۰۲e

حروف متفاوت در هر ستون نشانه وجود اختلاف آماری معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد است.

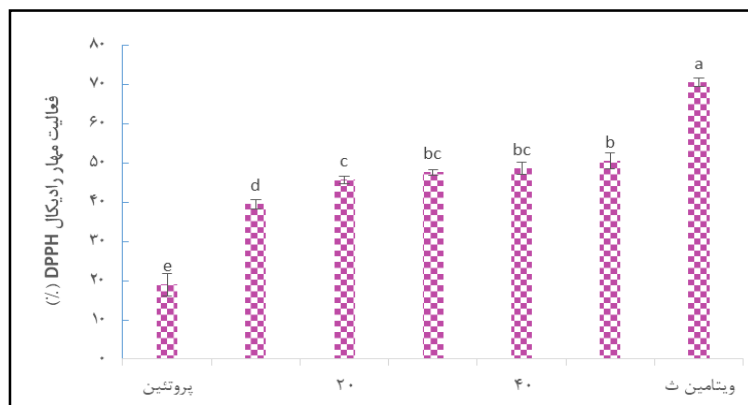
شده شنبليله ۵۰ درصد و کمتر و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث در غلظت ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است. قدرت آنتی‌اکسیدانی به نوع پروتئاز به‌کار رفته، شرایط هیدرولیز، توالی و ترکیب آمینواسیدی پپتیدهای حاصل بستگی دارد. گزارش شده است که تری پپتیدهایی که دارای لیزین یا تریپتوفان در انتهای C هستند قدرت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی از خود نشان می‌دهند. مشابه این نتایج، باتیستا و همکاران (Batista et al., 2010) و چی و همکاران (Chi et al., 2015) به ترتیب با هیدرولیز پروتئین ماهی *Aphanopus carbo* و *Tegillarca granosa* فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کرده‌اند. ژائو و همکاران (Zhao et

فعالیت مهار رادیکال DPPH

DPPH رادیکالی آنیونی است با ماکزیم جذب در ۵۱۷ نانومتر. واکنش با یک ترکیب دهنده پروتون منجر به تبدیل این رادیکال به مولکولی پایدار و کاهش میزان جذب می‌شود (Zhuang et al., 2013). هیدرولیز به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبليله شده‌است. فعالیت مهار رادیکال DPPH نمونه‌ها وابسته به غلظت است به‌طوری که با افزایش غلظت تا ۳۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH را به دنبال دارد اما با افزایش بیشتر غلظت تأثیر معنی‌داری مشاهده نمی‌شود (شکل ۷). بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز

غلظت از قدرت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث کمتر است. این محققان گزارش کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز بستگی دارد و با افزایش غلظت پپتیدها می‌توان به قدرت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی (ویتامین ث) دست پیدا کرد.

al., 2012) با هیدرولیز پروتئین برنج با آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم، پروتامکس، نوترئاز و تریپسین مشاهده کردند که بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH مربوط به پپتیدهای حاصل از آنزیم پروتامکس است و پپتیدهای حاصل از تمامی آنزیم‌ها، رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهند و قدرت آنتی‌اکسیدانی آنها در بیشترین

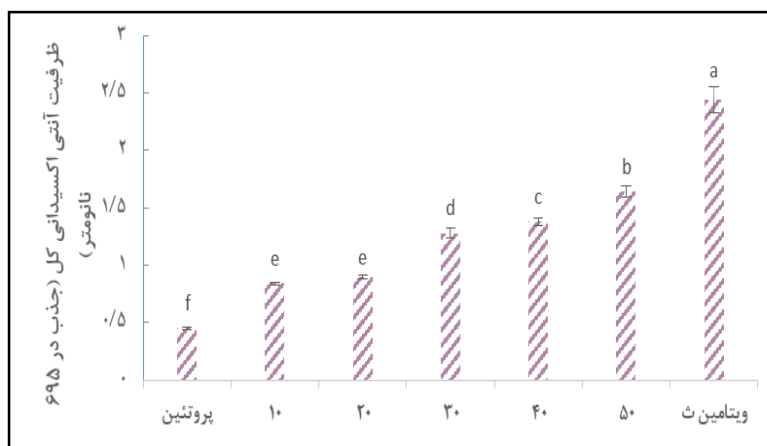


شکل ۷- مقایسه فعالیت مهار رادیکال DPPH با پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۱۰-۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر) در برابر پروتئین اولیه ۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر) و ویتامین ث ۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر)

آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث است. بیشتر بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله نسبت به پروتئین اولیه، نشان از عملکرد مناسب آنزیم پانکراتین در تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی دارد. در نتیجه، رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر تبدیل شده‌اند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است (Arabshahi-Delouee & Urooj, 2007). مشابه این نتایج، بوگاتف و همکاران (Bougatef et al., 2009) با تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی *Mustelus mustelus*، گزارش کردند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های حاصل وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت به‌میزانی چشمگیر افزایش می‌یابد، اما کمتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی BHA است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی است و روشی کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) است که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین شنبلیله به‌طور معنی‌داری کمتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده است (شکل ۸). پروتئین هیدرولیز شده حاصل، رفتار وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت از ۱۰ به ۵۰ (میلی گرم بر میلی لیتر)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌میزان قابل توجهی افزایش می‌یابد، اما در تمامی غلظت‌ها کمتر از قدرت



شکل ۸- مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۱۰-۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در برابر پروتئین اولیه ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) و ویتامین ث ۵۰ (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)

چشمگیر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبليله انجامیده است. به‌طور کلی، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به درجه هیدرولیز، شرایط فرآیند، ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها بستگی دارد. ارزیابی تأثیر غلظت پروتئین هیدرولیز شده بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاکی از وابستگی قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل به غلظت مورد استفاده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان می‌دهد پروتئین هیدرولیز شده شنبليله با دارا بودن قابلیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه، قابلیت بالایی در غنی‌سازی و فرمولاسیون مواد غذایی به‌منظور افزایش سطح سلامت جامعه دارد.

نتیجه‌گیری

نتایج به‌دست‌آمده از این پژوهش نشان می‌دهد فعالیت مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده شنبليله به‌طور معنی‌داری تحت تأثیر پارامترهای زمان هیدرولیز، دما و غلظت آنزیم قرار دارد و در این میان دمای واکنش نسبت به دو متغیر دیگر اثر بیشتری دارد. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، زمان ۱۴۱/۱۷ دقیقه، دما ۴۱/۹۳ درجه سلسیوس، غلظت آنزیم ۲/۱۴ درصد تعیین گردید. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز نشده شنبليله با پروتئین هیدرولیز شده نشان می‌دهد هیدرولیز با آنزیم پانکراتین به‌میزانی

مراجع

- Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. and Agboola, S. 2014. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*. 122(3): 15-27.
- Afanas' ev, I. B., Dcrozko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A. and Potapovitch, A. I. 1989. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical Pharmacology*. 38(11): 1763-1769.

- Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. *Food Chemistry*. 105(1): 57-64.
- 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.
- Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M. and Nunes, M. L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*. 45(1): 18-24.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. and Lalitha, R. G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of *Catla (Catla catla)* for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*. 99(2): 335-343.
- 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.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(2): 248-254.
- Cacciuttolo, M. A., Trinh, L., Lumpkin, J. A. and Rao, G. 1993. Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 14(3): 267-276.
- Chen, H.M., 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(1): 49-53.
- 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(2): 301-313.
- Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 109(1): 144-148.
- Diniz, F. M. and Martin, A. M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*. 31(5): 419-426.
- Elnasri, N. A. and El Tinay, A. H. 2007. Functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein concentrate. *Food chemistry*. 103(2): 582-589.

- Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. and Varidi, M. J. 2015. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolate. Journal of the Science of Food and Agriculture. 98(5): 1880-1888.
- FitzGerald, R.J. and Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. British journal of nutrition. 84(S1): 33-37.
- Hancock, J. T., Desikan, R. and Neill, S. J. 2001. Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. Biochemical Society Transactions. 29(2):345-9.
- Hemavathy, J. and Prabhakar, J. V. 1989. Lipid composition of fenugreek (*Trigonella foenumgraecum* L.) seeds. Food Chemistry. 31(1): 1-7.
- AOAC. 2000. Official Methods of Analysis of AOAC International, Gaithersburg MA, USA. Association of Official Analytical Chemist.
- Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., 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(1): 178-184.
- Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M. R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brown stripe red snapper (*Lutjanus vitta*). LWT-Food Science and Technology. 44(4): 1139-1148
- 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.
- Kurozawa, L. E., Park, K. J. and Hubinger, M. D. 2008. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. Journal of Food Science. 73(5): 12-27.
- Leela N. K., Shafeekh K. M. 2008. Fenugreek. In: Parthasarathy V.A., Chempakam B., Zachariah T.J. (Eds.). Chemistry of Spices. Biddles Ltd, King's Lynn, UK, CAB International. pp. 242-259.
- Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. and Espe, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) frames by Protamex™ protease. Process Biochemisrty. 37(11): 1263-1269.
- Maghsudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Mohebbodini, H. 2017. Evaluation of the antioxidant properties hydrolyzed protein of bee pollen. Journal of Food Science and Technology of Iran. 13 (73): 227-240. (in Persian).

- Meshkinfar, N., Sadeghi Mahoonak, A., Ziaifar, A. M., Ghorbani, M., Kashani Nejad, M. 2014. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Journal of Food Researches*. 24(2): 215-225. (in Persian).
- Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Alami, M., Ghorbani, M. 2017. Determination of optimum conditions for the production of antioxidant peptides from the hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *Journal of Food Science and Technology*. 13 (61):130-123. (in Persian).
- 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.
- Pihlanto, A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*. 16(11): 1306-1314.
- 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(2): 337-341.
- Sauvaire, Y. D., Baccou, J. C. F. and Kobrehel, K. 1984. Solubilization and characterization of fenugreek seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 32(1): 41-47.
- Sayed, R. A., Tolba, K. H. and Habashy, H. N. 2000. Technological, chemical and biological studies on fenugreek seeds (*Trigonella foenum graecum* L.). *Arab Universities Journal of Agricultural Sciences*. 8(1): 223-234.
- Sha'banpour, B., Kurdjazi, M., Nazari, M., Esmaili Kharaki, M. 2017. Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and ratio of enzyme to substrate on antioxidant properties of shrimp bioactive peptides. *Journal of Food Science and Technology of Iran*. 62 (14): 31-45. (in Persian).
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y. and Yamamoto, J. 2009. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis Research*. 123(5): 753-757.
- 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(9): 949-957.
- Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 111(2): 370-376.

- 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 Technology*. 10(2): 235-240.
- Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q. 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*. 134(3): 1360-1367.
- Zhu, K., Zhou, H. and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*. 41(6): 1296-1302.
- Zhu, L., Chen, J., Tang, X. and Xiong, Y. L. 2008. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56(8): 2714-2721.
- Zhuang, H., Tang, N. and Yuan, Y. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*. 5(4): 1810-1821.

Antioxidant Properties of Fenugreek Bioactive Peptides Prepared with Pancreatin Enzyme

S. Kaveh, A. Sadeghi Mahoonak*, M. Ghorbani, S. M. Jafari and K. Sarabandi

* Corresponding Author: Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com

Received: 20 December 2018, Accepted: 17 September 2019

Abstract

In this research, the optimization of protein hydrolysis process with the pancreatin enzyme was performed to evaluate the effect of time (30-270 min), temperature (20-60°C) and enzyme concentration (0.25-3.25%) on DPPH radical scavenging activity and Fe²⁺ chelating activity by using the response surface methodology. Optimum conditions to achieve the highest DPPH radical scavenging activity (42.77%) and Fe²⁺ chelating activity (78.57%), were obtained at time of 141.1 min, temperature of 41.93 °C and enzyme concentrations of 2.14%. Under these conditions, the degree of hydrolysis was 36.8 ± 0.35. Comparing the antioxidant power of the hydrolyzed protein and the intact protein showed that the hydrolysis increased the antioxidant activity of the fenugreek protein, significantly. Then, the antioxidant properties of optimum treatment were investigated at concentrations of 10-50 (mg/ml). The highest DPPH radical scavenging activity (50.65%) and total antioxidant capacity (absorbance 1.65 at wavelength of 695 nm), hydroxyl radical scavenging activity (69.03%) and Fe²⁺ chelating activity (79.72%) were achieved at concentration of 50 (mg/ml) and reducing power (absorption 0.8 at wavelength of 700 nm) were achieved at concentration of 40 (mg/ml). The results showed that the hydrolysis of fenugreek protein with the pancreatin enzyme is an effective way to produce antioxidant peptides. So, the bioactive peptides, with significant antioxidant properties, can be used as potential substitute of synthetic antioxidants and as a protein supplement in food formulation to produce functional products with health promotion properties.

Keywords: Enzymatic Hydrolysis, Protein Hydrolysis, Response Surface Method