

بهینه سازی تولید پتیدهای آنتی‌اکسیدان توسط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبليله

شیرا کاوه^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۲، سید مهدی جعفری^۲،
خشیار سرابندی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳- دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۳/۰۷)

چکیده

پروتئین دانه شنبليله غنی از لیزین و تریپتوفان است. در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبليله با آنزیم پانکراتین با استفاده از روش سطح پاسخ با سطوح متغیرهای مستقل: دما ۶۰ - ۲۰ درجه سانتی گراد، زمان ۲۷۰ - ۳۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳/۲۵ - ۰/۲۵ درصد، انجام شد. شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد ۱۰۱ دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) و احیاءکنندگی آهن، دمای ۴۶/۱۲ °C و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۸۴ درصد و زمان ۱۷۵/۹۶ دقیقه به دست آمد. سپس ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تیمار بهینه در غلظت‌های (mg/ml) ۵۰ - ۱۰ با قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز نشده و ویتامین ث مقایسه شد. بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۲/۹۸ درصد) و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب ۱/۲۶ در طول موج ۶۹۵ نانومتر) در غلظت (mg/ml) ۴۰ حاصل شد و بیشترین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل (۷۰/۹۹ درصد) و شلاته‌کنندگی آهن (۷۲/۶۳ درصد) و احیاءکنندگی آهن (۰/۸۰ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در غلظت (mg/ml) ۵۰، به دست آمد. با توجه به نتایج به دست آمده، فرآیند هیدرولیز پروتئین شنبليله با آنزیم پانکراتین منجر به تولید پتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجه گشته است که قابلیت رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را دارند. همچنین، از این پتیدها می‌توان در صنایع دارویی و تولید غذاهای فراسودمند استفاده نمود.

کلید واژگان: هیدرولیز آنزیمی، پانکراتین، پتید زیست فعال، بهینه سازی، شنبليله

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@yahoo.com

۱- مقدمه

گرفته‌اند. در این میان دانه شنبلیله با نام علمی Fenugreek (*Trigonella foenum Graceum*)، از تیره پروانه‌داران و از خانواده حبوبات [۱۷]، غنی از لیزین و L-تریپتوفان می‌باشد؛ که دارای اثرات مفید زیادی از جمله: پایین آورنده‌ی قند خون، درمان کننده‌ی دیابت، کاهنده‌ی چربی خون، ضد درد، ضد نفخ، ضد سرطان، افزایشدهنده‌ی میل جنسی در مردان، شیر افزا، ضد کرم، مقوی رحم و تسهیل زایمان می‌باشد [۱۸]. روش سطح پاسخ، راهکاری مناسب برای بررسی و بهینه‌سازی فرآیندهای پیچیده می‌باشد که به صورت موفقیت‌آمیزی برای بهینه‌سازی فرآیندهای صنایع غذایی استفاده می‌گردد. RSM شامل فرآیندهای آماری و ریاضی می‌باشد که می‌توان از آن برای بررسی یک یا چند متغیر وابسته و مستقل استفاده نمود، این روش اثر متغیرهای مستقل را به تنهایی و یا به صورت ترکیبی در فرآیند نشان می‌دهد و با ایجاد یک مدل ریاضی به صورت دقیق فرآیند را تفسیر می‌کند [۱۹]. بنابراین هدف از این پژوهش بهینه سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه شنبلیله با استفاده از آنزیم پانکراتین به روش سطح پاسخ با بررسی اثر سه فاکتور دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا جهت دستیابی به بیشترین قدرت احیا کنندگی آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH و سپس بررسی تاثیر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه تولیدی (۵۰ - ۱۰ mg/ml) بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، شلاته‌کنندگی یون آهن، احیا کنندگی آهن، قدرت آنتی اکسیدانی کل و مهار رادیکال هیدروکسیل بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پانکراتین، DPPH، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، سولفات آهن، پراکسید هیدروژن، دی کلرید آهن، فروزین، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما و اتانول، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و دانه شنبلیله از مرکز تحقیقات علوم کشاورزی گرگان خریداری شدند.

۲-۲- تهیه کنسانتره پروتئین شنبلیله

جهت استخراج پروتئین شنبلیله ابتدا دانه‌های شنبلیله شسته و در دمای اتاق خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند؛ سپس به منظور چربی زدایی، پودر حاصل به نسبت ۱:۴ (وزنی/

اکسیداسیون لیپیدها منجر به تجزیه اسیدهای چرب و تغییر در بافت، طعم و ظاهر مواد غذایی و در نتیجه کاهش کیفیت آن‌ها می‌گردد. همچنین مشخص شده است که تنش‌های اکسیداتیو نقش مهمی در بروز برخی از بیماری‌های وابسته به سن ایفا می‌کنند. عواملی که در این بیماری‌ها نقش دارند پراکسیدهای لیپیدی و ترکیباتی با وزن مولکولی کم می‌باشند که در مرحله نهایی واکنش‌های اکسیداسیون تولید می‌گردند؛ بنابراین برای جلوگیری از این اثرات در مواد غذایی و حفاظت از بدن در برابر این بیماری‌ها، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های آزاد فرآیندی حائز اهمیت می‌باشد [۱]. در صنعت غذا از آنتی اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA و BHT جهت جلوگیری از اکسیداسیون استفاده می‌شود اگرچه این آنتی اکسیدان‌ها در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قدرت بیشتری دارند اما از نظر ایمنی و سلامتی آنها نگرانی‌هایی وجود دارد، این امر منجر به افزایش توجه محققین به شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی برای استفاده در مواد غذایی و دارویی گشته است [۲]. پپتیدهای زیست فعال بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که جرم مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و دارای ۲۰-۲ آمینو اسید می‌باشند این پپتیدها در ساختار پروتئینی اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینو اسیدی خود، تاثیر مثبتی بر عملکرد و شرایط بدن و در نتیجه سلامت فرد دارند، از جمله این تاثیرات می‌توان به اثرات ایمنی بخشی [۴]، ضد میکروبی [۵]، آنتی اکسیدانی [۶]، ضد فشار خون [۷] و ضد سرطان [۸] اشاره نمود. این پپتیدها به سه روش سنتز شیمیایی، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی تولید می‌شوند، در این میان هیدرولیز آنزیمی از روش‌های جدید در بیوتکنولوژی غذایی می‌باشد که فرآیندی قابل کنترل و ملایم است و منجر به نابودی آمینو اسیدهای آزاد نمی‌شود [۳]. در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری مانند شیر [۹]، لوبیای سویا [۱۰]، کانولا [۱۱]، پروتئین زرده‌ی تخم مرغ [۱۲]، جاندار دریایی blood clam [۱۳]، صدف خوراکی [۱۴] و ضایعات میگو [۱۵] تولید شده‌اند. در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و آرزوی زایی کمتر [۱۶]، بیشتر مورد توجه قرار

سرد شدند. سپس نمونه‌ها با دور $8000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و با استفاده از سمپلر مایع رویی آنها جدا شد و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای $-20^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۲].

۲-۵- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش وو و همکاران [۲۳] با کمی اصلاحات تعیین گردید. ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (40 mg/ml) حل شدند. سپس، $1/5 \text{ ml}$ از هر نمونه با $1/5 \text{ ml}$ از محلول اتانولی DPPH (0.15 mM) مخلوط و بمدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در 2500 rpm به مدت 10 min سانتریفوژ و به مدت 30 min در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج 517 nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$I(\%) = \frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \times 100 \quad (1)$$

۲-۶- تعیین قدرت احیاءکنندگی یون آهن

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی یون آهن نمونه‌های هیدرولیز شده، 0.5 ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت 40 mg/ml) با 0.5 ml بافر فسفات 0.2 M ($\text{pH}=7.6$) و 0.5 ml پتاسیم فری سیانید (W/V) ۱ درصد مخلوط و در دمای $50^\circ C$ برای 20 min دقیقه انکوبه شد. سپس، 0.5 ml محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به مدت 10 min در 2500 rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، 1 ml سوپرناتانت با 1 ml آب مقطر و 0.2 ml فریک کلراید 700 nm (W/V) ۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در 700 nm پس از 10 min 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 احیاءکنندگی است [۲۴].

۳- بررسی تاثیر غلظت بر خصوصیات

آنتی اکسیدانی تیمار بهینه هیدرولیز شده

۳-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و

تعیین قدرت احیاءکنندگی یون آهن

(حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر با دور 1500 rpm همزده شد. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا و پودر چربی‌گیری شده به مدت ۱ ساعت در آن با دمای $30^\circ C$ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و از الک با مش 40 عبور داده شدند. در مرحله بعد برای استخراج پروتئین، پودر شنبلیله به نسبت ۱:۱۰ با محلول کلرید سدیم 0.3 M مولار، مخلوط و pH آن با افزودن سود انرمال به $\text{pH}=9.2$ تنظیم و به مدت ۱ ساعت همزده شد، سپس محلول حاصل در $4500 \times g$ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت به $\text{pH}=4.5$ (ایزوالکتریک شنبلیله) تنظیم شد و در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در $4500 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در $4500 \times g$ ، به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس کنسانتره پروتئینی حاصل با فریز درایر خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای $-20^\circ C$ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۰].

۲-۳- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC 2008 انجام شد. برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابرترم، FX118-30) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آن $105^\circ C$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد [۲۱].

۲-۴- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، کنسانتره پروتئین شنبلیله در غلظت 5 (w/v) درصد در بافر فسفات 0.2 M مولار ($\text{pH}=7.6$) درون ارلن‌های 100 میلی لیتری حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم شد. پس از رسیدن دمای انکوباتور به دمای مورد نظر (جدول ۳) نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دمای انکوباتور، آنزیم به نسبت‌های مورد نظر (جدول ۳) به محلول اضافه شد. واکنش در محدوده‌ی زمانی ذکر شده در جدول ۳ انجام شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب $90^\circ C$ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده و سپس با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط

در محیط اسیدی همراه است. در این روش ۰/۱ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰ mg/ml - ۱۰) با ۱ ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بیشتر است [۲۶].

۴- تجزیه و تحلیل آماری

بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده در قالب طرح مرکب مرکزی و با استفاده از نرم افزار Design expert نسخه ۷، و روش سطح پاسخ انجام گرفت. متغیرهای دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا به‌عنوان متغیرهای مستقل در ۵ سطح و ۴ تکرار در نقطه مرکزی (جدول ۲) و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و احیاکنندگی به‌عنوان متغیرهای وابسته در نظر گرفته شدند و اثر هر یک از این متغیرهای مستقل روی متغیرهای وابسته جهت تعیین شرایط جهت دستیابی به بیشینه فعالیت آنتی اکسیدانی، بررسی شد (جدول ۳). در این پژوهش اثر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه (دارای بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و احیاءکنندگی آهن) بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی آن با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در $P < 0.05$ و رسم نمودارها با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

۵- نتایج و بحث

در ابتدا میزان رطوبت، خاکستر و پروتئین پودر چربی‌گیری شده و چربی‌گیری نشده و کنسانتره پروتئین حاصل اندازه گیری شد (جدول ۱).

برای تعیین تاثیر غلظت (۵۰ mg/ml - ۱۰) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن تیمار بهینه به ترتیب از روش وو و همکاران [۲۳] و احمدی و همکاران [۲۴] استفاده شد.

۳-۲- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر طبق روش جامدار و همکاران [۲۵] اندازه‌گیری شد. ابتدا، ۱ ml نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰ mg/ml - ۱۰) با ۰/۰۵ ml محلول دی کلرید آهن (۲Mm) و ۱/۸۰ ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ ml محلول فروزین (۵Mm) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ min نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ nm خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{Chelating effect (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100 \quad (2)$$

۳-۳- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

ابتدا ۱ ml از ۱ و ۱۰ فنانترولین (۱/۸۶۵ mM) و ۲ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰ mg/ml - ۱۰) با ۱ ml از محلول $\text{FeSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (۱/۸۶۵ mM) مخلوط شدند سپس ۱ ml، H_2O_2 (۰/۰۳٪ w/v) به مخلوط اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب مخلوط در ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط بدون هیچ ترکیب آنتی اکسیدان به‌عنوان کنترل منفی و مخلوط بدون H_2O_2 به‌عنوان بلانک استفاده شد. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۳]:

$$\text{HRSA(\%)} = [(A_s - A_n) / (A_b - A_n)] \times 100 \quad (3)$$

۳-۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر مبنای احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن

Table 1 chemical composition of undefatted, defatted and protein concentrate of fenugreek

	Ash (%)	Fat (%)	Moisture (%)	Protein (%)
Undefatted fenugreek powder	7/65±0/14a	17/25±0/53a	8/03±0/35a	29/77±0/32c
defatted fenugreek powder	6/53±0/11b	5/06±0/27b	7/2±0/26b	45/03±0/61b
protein concentrate	3/11±0/15c	3/20±0/30c	6/2±0/25c	75/27±0/55a

Table 2 Independent variables and levels used for optimization

Independent variables	Variable levels				
	-α	-1	0	+1	+α
temperature	20	30	40	50	60
Time(min)	30	90	150	210	270
(%) Enzyme to Substrate Ratio	0/25	1	1/75	2/5	3/25

طرح مرکب مرکزی و پاسخ متغیرهای وابسته در جدول ۳ نشان داده شده است. اثر عوامل مختلف دما، زمان و نسبت آنزیم به سویسترا بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی یون آهن با تجزیه و تحلیل ضرایب رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جدول های ۴ و ۵ بررسی شد.

۵-۱- بهینه سازی هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله

به منظور دستیابی به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی از روش سطح پاسخ استفاده شد. هیدرولیز در نقاط تعریف شده توسط نرم افزار انجام شد. آزمون های آنتی اکسیدانی برای هر یک از تیمارها تست گردید.

Table 3 central composite design and response of variables dependent on independent variables

treatment	A	B	C	Y ₁	Y ₂
1	150	40	0/25	32/1	0/5
2	210	30	1	27	0/55
3	90	50	1	33/3	0/5
4	150	40	1/75	39/4	0/77
5	150	40	1/75	39/2	0/74
6	30	40	1/75	34/75	0/56
7	210	50	2/5	34/35	0/62
8	90	50	2/5	37/35	0/66
9	90	30	1	33/8	0/52
10	210	30	2/5	34/3	0/6
11	150	20	1/75	32/7	0/35
12	210	50	1	39/55	0/68
13	150	40	1/75	39/6	0/78
14	150	40	3/25	34/9	0/66
15	270	40	1/75	31/15	0/60
16	150	60	1/75	35/25	0/45
17	90	30	2/5	34/65	0/6
18	150	40	1/75	39/1	0/75

A (time, min), B (temperature c), C (Enzyme to Substrate Ratio %), Y₁ (DPPH radical scavenging activity %), Y₂ (Reducing power, Absorbance in 700nm)

۲-۵- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

با توجه به جدول ۴، آنالیز سطح پاسخ نشان داد که رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با پارامترهای واکنش به صورت معادله (۴) و از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون $R^2=0/8766$ می باشد. که نشان می دهد مدل توانسته ۸۷/۶۶ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند [۲۷] و مدلی مناسب برای پیش بینی اثر متغیرهای فرآیند می باشد. اثر متغیرهای A^2 ، B^2 ، C^2 ، بر روی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH معنی دار و متغیر B^2 ، اثر معنی دارتری نسبت به سایر متغیرها نشان داد.

معادله ۴

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = -27/17 + 0/048 A + 2/15B + 17/47 C + 2/17 AB - 7/78AC - 0/15BC + 4/42A^2 + 0/024B^2 + 2/59C^2$$

شکل ۱ نمودار سه بعدی اثر همزمان دما و زمان را بر قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در مقدار ثابت آنزیم به سوبسترا، ۱/۷۵ درصد نشان می دهد. با افزایش زمان هیدرولیز تا حدود ۱۵۰ دقیقه، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می یابد و با افزایش بیشتر زمان هیدرولیز، کاهش می یابد. افزایش دما نیز تا حدود 45°C (دمای بهینه آنزیم پانکراتین)، منجر به افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH می گردد، به طوریکه با ترکیب مناسب از دما و زمان قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH تا حدود ۴۰ درصد افزایش پیدا می کند. اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹)، نیز با هیدرولیز ضایعات ماهی قزل آلا به مدت ۱۸۰ دقیقه به پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال آزاد

DPPH به میزان ۴۰ درصد دست یافتند و گزارش کردند که با افزایش زمان هیدرولیز این قابلیت کاهش یافت [۲۸]. شکل ۲ اثر متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا، را بر قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نشان می دهد. افزایش میزان آنزیم تا حدود ۱/۷۵ و افزایش زمان هیدرولیز تا حدود ۱۵۰ دقیقه، منجر به افزایش قدرت آنتی اکسیدانی و سپس با افزایش بیشتر میزان آنزیم و زمان هیدرولیز، از میزان آن کاسته می شود. پیشرفت فرآیند هیدرولیز باعث رهاسدن پپتیدهای آنتی اکسیدان می شود اما افزایش زمان هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم، منجر به شکستن تعدادی از پپتیدهای آنتی اکسیدان می گردد و در نتیجه از قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می شود [۲۹]. شکل ۳ نشان می دهد که در زمان ثابت ۱۵۰ دقیقه، با افزایش دما تا حدود 45°C و افزایش میزان آنزیم تا ۱/۷۵ درصد، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، تا حدود ۳۸ درصد افزایش یافته و با افزایش بیشتر دما کاهش یافت. نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۷)، با هیدرولیز پروتئین دانه کدو توسط آنزیم پپسین، گزارش دادند که قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش دما تا 35°C (دمای بهینه آنزیم پپسین)، افزایش می یابد و با افزایش بیشتر دما از قدرت آنتی اکسیدانی کاسته می شود [۳۰]. طاهری و همکاران (۲۰۱۱)، با هیدرولیز پروتئین ماهی ساردین توسط آنزیم آلکالاز گزارش کردند که با افزایش دما تا حدود 50°C (دمای بهینه آنزیم آلکالاز)، قدرت آنتی اکسیدانی افزایش یافته و با افزایش بیشتر دما از میزان آن کاسته می شود [۲۷].

Table 4 Analysis of variance for DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed fenugreek protein

	Sum of squares	DF	P value	Regression coefficient
Model	261/27	9	0/0173	39/56
A-time	7/70	1	0/2654	-0/69
B-temperature	89/78	1	0/0044	2/37
C-E/S	9/92	1	0/2118	0/79
AB	13/52	1	0/1528	1/30
AC	0/98	1	0/6789	-0/35
BC	10/81	1	0/1946	-1/16
A ²	49/13	1	0/0184	-1/59
B ²	117/34	1	0/0021	-2/46
C ²	41/01	1	0/0268	-1/46

دامنه مقادیر مورد مطالعه را شرح دهد [۲۹] و مدلی مناسب برای پیش بینی اثر متغیرهای فرآیند می‌باشد ($p < 0.05$). معادله ۵ رابطه متغیرهای واکنش با قدرت احیاءکنندگی را نشان می‌دهد:

دهد:
معادله ۵

$$\text{Reducing power} = -1/28 + 2/95A + 0/06B + 0/48C + 6/25AB + 7/2 AC + 6/66 BC - 1/31A^2 - 9/2 B^2 - 0/1 C^2$$

در نمودار سه بعدی (شکل ۴)، اثر متغیرهای دما و زمان بر قدرت احیاءکنندگی یون آهن، در مقدار ثابت آنزیم به سوبسترا، ۱/۷۵ درصد، مشاهده می‌گردد، اثر دو متغیر دما و زمان بر قدرت احیاءکنندگی معنی دار بود ($p < 0.05$) و با افزایش زمان تا حدود ۱۵۰ دقیقه و افزایش دما تا حدود 40°C ، قدرت احیاءکنندگی افزایش یافت. به طور کلی آزمون قدرت احیاءکنندگی، توانایی احیاءکنندگی را در برابر Fe^{3+} می‌باشد. به عبارت دیگر قدرت الکترون دهنده پروتئین‌های هیدرولیز شده را به رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهد [۳۱].

بنابراین با افزایش زمان و هیدرولیز بیش از حد پروتئین، از میزان پپتیدهای دهنده الکترون کاسته شده و این امر منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی می‌گردد. مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶)، با هیدرولیز پروتئین گرده گل گزارش کردند که با افزایش هیدرولیز تا حدود ۳/۵ ساعت، قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد و پیشرفت هیدرولیز منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی می‌گردد [۳۲]. خانتافان و همکاران (۲۰۱۱)، نیز افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی را با افزایش زمان هیدرولیز گزارش کردند [۳۱]. شکل ۵ اثر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را بر قدرت احیاءکنندگی در دمای 40°C نشان می‌دهد. همانطور که از نمودار مشخص است، قدرت احیاءکنندگی با افزایش زمان تا حدود نقطه مرکزی و افزایش میزان آنزیم تا حدود ۱/۸۰ درصد، افزایش یافته سپس با افزایش بیشتر کاهش یافته است. بنابراین در مدت زمان ۱۸۰-۱۲۰ دقیقه و محدوده ۲-۱/۵ درصد آنزیم، میزان پپتیدهای دهنده الکترون افزایش یافته و منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن گردیده است. مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶)، و جی و همکاران (۲۰۰۹)، به ترتیب با هیدرولیز پروتئین گرده گل و ضایعات ماهی گزارش کردند که با افزایش میزان آنزیم، قدرت احیاءکنندگی افزایش یافت [۳۲ و ۳۳].

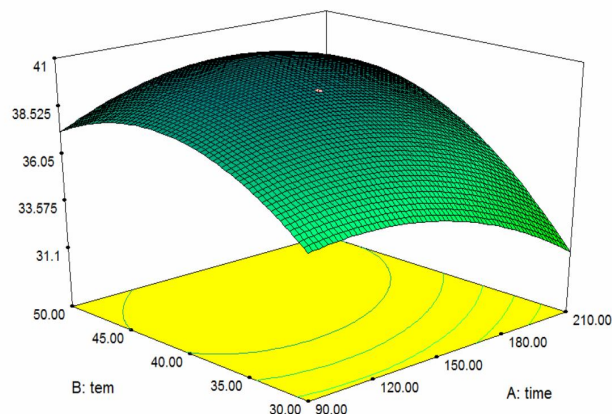


Fig 1 Surface plot for DPPH radical scavenging activity against time (min) and Temperature ($^\circ\text{C}$)

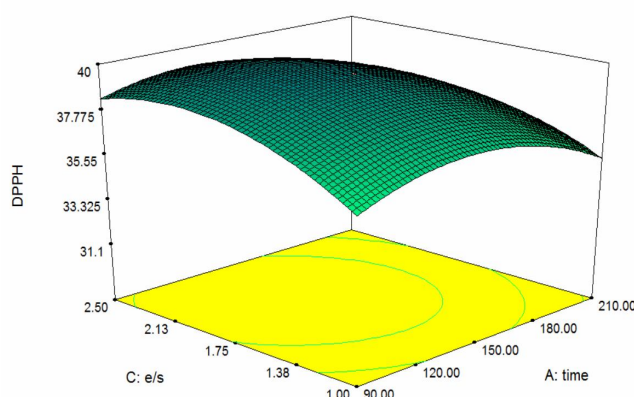


Fig 2 Surface plot for DPPH radical scavenging activity against time (min) and Enzyme to Substrate Ratio (%)

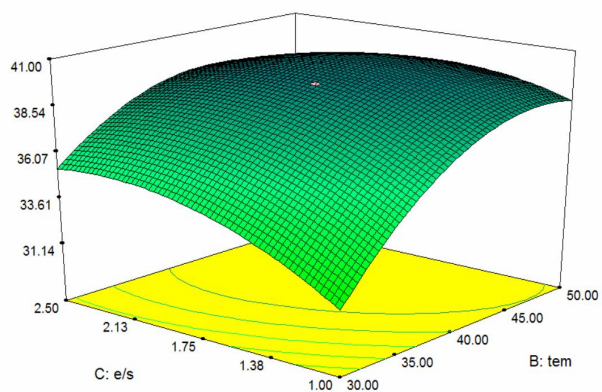


Fig 3 Surface plot for DPPH radical scavenging activity against Temperature ($^\circ\text{C}$) and Enzyme to Substrate Ratio (%)

۵-۳- قدرت احیاءکنندگی یون آهن

با توجه به جدول ۵، آنالیز واریانس داده‌ها نشان داد که ارتباط بین قدرت احیاءکنندگی یون آهن با متغیرهای واکنش از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9964$ می‌باشد، که نشان می‌دهد مدل توانسته ۹۹/۶۴ درصد از کل تغییرات در

حدود 43°C و میزان آنزیم ۲ درصد بوده و افزایش بیشتر دما و میزان آنزیم منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی شده است.

توجه به شکل ۶ (اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیاءکنندگی)، بیشترین قدرت احیاءکنندگی در دمای

Table 5 Analysis of variance for reducing power of hydrolyzed fenugreek protein

	Sum of squares	DF	P Value	Regression coefficient
Model	0/22	9	<0/0001	0/77
A-time	3/6	1	0/0008	0/015
B-temperature	0/013	1	<0/0001	0/029
C-E/S	2/5	1	<0/0022	0/013
AB	0/011	1	<0/0001	0/037
AC	8/45	1	<0/0001	-0/033
BC	2/0	1	0/2243	5/0
A ²	0/043	1	<0/0001	-0/047
B ²	0/16	1	<0/0001	-0/092
C ²	0/072	1	<0/0001	-0/061

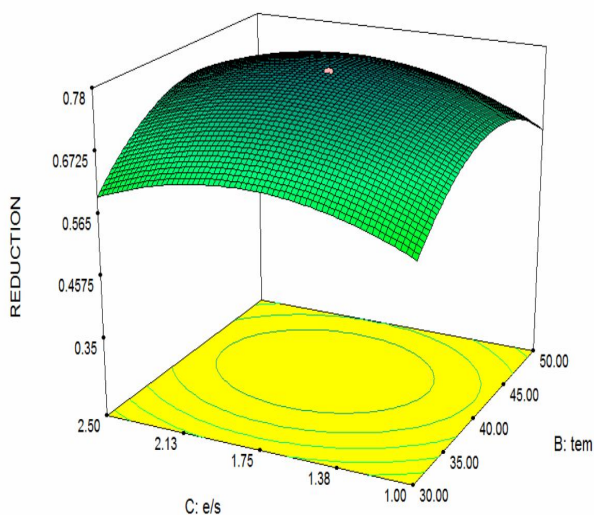


Fig 6 Surface plot for reducing power against temperature ($^{\circ}\text{C}$) and Enzyme to Substrate Ratio (%)

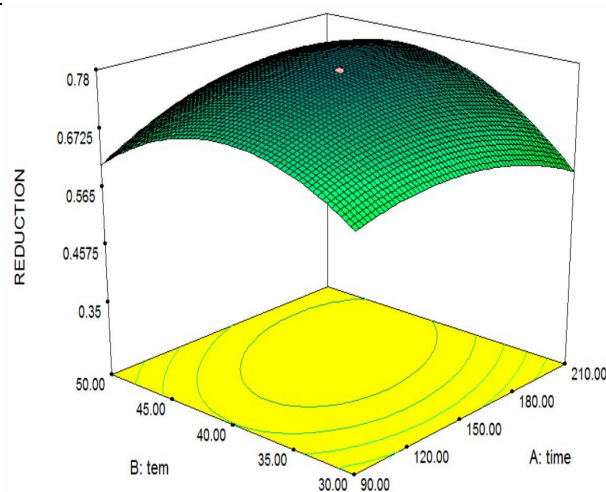


Fig 4 Surface plot for reducing power against time (min) and Temperature ($^{\circ}\text{C}$)

۶- انتخاب تیمار بهینه

پس از آنالیز داده‌ها، نرم افزار شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین قدرت احیاءکنندگی و مهار رادیکال DPPH را دمای $46/12^{\circ}\text{C}$ ، و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۸۴ درصد و زمان ۱۷۵/۹۶ دقیقه مشخص کرد؛ در شرایط ذکر شده هیدرولیز انجام شد و سپس فعالیت آنتی اکسیدانی تیمار بهینه از نظر قدرت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته کنندگی آهن و آنتی اکسیدانی کل، در غلظت های ۵۰-۱۰۰ (mg/ml) سنجیده شد.

۶-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

رادیکال DPPH، ماکزیمم جذب را در ۵۱۷ نانومتر داراست و رو به رو شدن با یک ترکیب دهنده پروتون منجر به کاهش

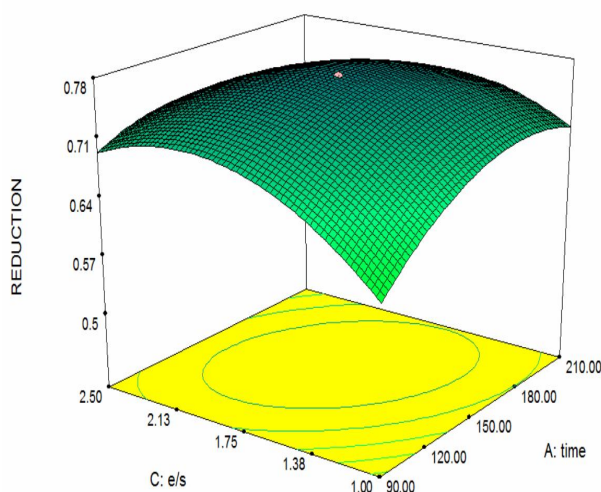


Fig 5 Surface plot for reducing power against time (min) and Enzyme to Substrate Ratio (%)

برنج و صدف خوراکی گزارش کردند که با افزایش غلظت پپتیدهای حاصل قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد [۳۵ و ۱۴]. مطالعات نشان داده است که قدرت آنتی اکسیدانی پپتیدها به ترکیب و توالی آمینواسیدی آنها وابسته است؛ احتمالاً قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، به دلیل فعالیت پروتون دهنده‌ی گروه‌های هیدروکسیل آمینواسیدهای آروماتیک است، حضور یا عدم حضور آنها قدرت آنتی اکسیدانی پپتیدها را تحت تاثیر قرار می‌دهد و افزایش بیش از حد غلظت منجر به اشباع شدن نقاط فعال می‌گردد [۳۶].

میزان جذب می‌شود [۳۴]. قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار بهینه در غلظت‌های متفاوت در شکل ۷، نشان داده شده است؛ با توجه به این شکل، هیدرولیز به طور شگرفی منجر به افزایش قدرت آنتی اکسیدانی پروتئین شده است و با افزایش غلظت، تا حدود ۳۰ (mg/ml)، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد و پس از آن افزایش بیشتر تاثیر قابل توجهی بر قدرت آن ندارد ($p < 0.05$). اما قدرت مهار رادیکال پروتئین‌های هیدرولیز شده در غلظت‌های متفاوت از نمونه شاهد (ویتامین ث) کمتر است. زائو و همکاران (۲۰۱۲)، و آمایاپارواتی و همکاران (۲۰۱۴)، به ترتیب با هیدرولیز پروتئین

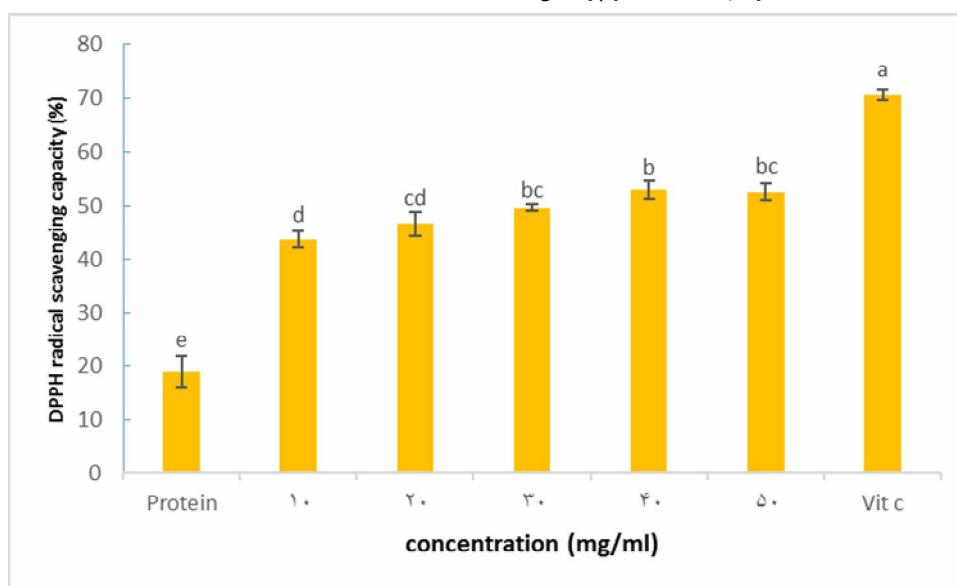


Fig 7 Comparison of DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed protein in concentrations of (10-50 mg/ml) with primary protein 50 (mg / ml) and vitamin C 50 (mg / ml).

اومایاپارواتی و همکاران (۲۰۱۴)، زائو و همکاران (۲۰۱۲) که به ترتیب تاثیر غلظت های متفاوت را بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده صدف خوراکی و برنج بررسی کردند می‌باشد [۱۴ و ۳۵].

۶-۳-فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

آهن باعث شکست هیدروپراکسیدها در محصولات غذایی شده و به‌عنوان یک پراکسیدان اکسیداسیون رو تشدید می‌بخشد. با توجه به جدول ۶، قدرت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده در محدوده‌ی غلظتی مورد نظر، بین ۷۲/۶۳ - ۵۱/۰۱ درصد متغیر است. نتایج نشان دادند که افزایش غلظت تا ۴۰ (mg/ml) قدرت شلاته کنندگی را افزایش داده و پس از آن تاثیر قابل ملاحظه‌ای نداشته است ($p < 0.05$). با توجه به اینکه قدرت شلاته کنندگی پروتئین شنبلیله قبل از هیدرولیز

۶-۲-قدرت احیاء کنندگی یون آهن

قدرت احیاءکنندگی فعالیت آنتی اکسیدانی یک ترکیب را بر حسب توانایی آن در تبدیل یون Fe^{3+} به Fe^{2+} از طریق اهدای الکترون، ارزیابی می‌کند. جدول ۶، قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده را در غلظت‌های متفاوت نشان می‌دهد، آنالیز نتایج نشان می‌دهد که هیدرولیز به طور قابل توجهی باعث افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین شده است. با افزایش غلظت تا ۳۰ (mg/ml)، قدرت احیاءکنندگی افزایش یافته و افزایش بیشتر تاثیر قابل توجهی بر قدرت احیاءکنندگی نداشت ($p < 0.05$). علت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده را می‌توان به رها شدن آمینواسیدهایی با قدرت آنتی-اکسیدانی مانند لیزین و متیونین و تریپتوفان در اثر هیدرولیز نسبت داد [۲۵]. این نتایج در تطابق با نتایج تحقیقات

مناسب و دارای پتانسیل به دام اندازی فلزات تولید کند. این نتایج در تطابق با یافته‌های جامدار و همکاران (۲۰۱۰) و مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶) است [۲۵ و ۳۲].

۲۳/۸۵ درصد بوده است و با انجام هیدرولیز افزایش قابل توجهی داشته است، این نتایج نشان می‌دهد که آنزیم پانکراتین توانسته پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی و زنجیره جانبی

Table 6 HO• scavenging activity (%), Reducing power (absorbance in 700nm), Fe chelating activity (%) in concentrations of (10-50 mg/ml)

	Fenugreek protein 50(mg/ml)	hydrolyzed protein 10(mg/ml)	hydrolyzed protein 20(mg/ml)	hydrolyzed protein 30(mg/ml)	hydrolyzed protein 40(mg/ml)	hydrolyzed protein 50(mg/ml)	Vitamin c 50(mg/ml)
HO• scavenging activity (%)	13/51±1/08f	37/73±2/19e	50/17±3/35d	62/70±91/62c	69/01±1/87c	70/99±2/42b	88/44±4/02a
Reducing power (absorbance in 700nm)	0/31±0/02e	0/42±0/02d	0/63±0/03c	0/76±0/03b	0/77±0/01b	0/81±0/02b	0/87±0/02a
Fe chelating activity (%)	23/85±4/02e	51/01±2/01d	59/26±3/04c	63/35±1/38c	70/93±0/95b	72/63±1/12b	83/70±1/91a

Different letters in the same column indicate significant difference among samples P< 0.05

با افزایش غلظت تا حد خاصی افزایش یافته و پس از آن افزایش بیشتر بی تاثیر است [۱۳].

۶-۵- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ارزیابی فسفومولیدن یک روش کمی برای سنجش قدرت آنتی اکسیدانی کل می‌باشد [۴۰]. با توجه به شکل ۸، بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی در غلظت (mg/ml) ۳۰، حاصل شد و افزایش بیشتر غلظت تفاوت قابل توجهی در قدرت آنتی اکسیدانی کل ایجاد نکرد ($p < 0.05$). فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بیشتر از پروتئین اولیه بود که نشان دهنده‌ی تاثیر مثبت فرآیند هیدرولیز در افزایش قدرت آنتی اکسیدانی می‌باشد؛ اما نسبت به نمونه کنترل مثبت (ویتامین ث) قدرت آنتی اکسیدانی کمتری از خود نشان دادند. تیمار بهینه‌ی تولیدی دارای خاصیت الکترون دهنده‌ی بوده و منجر به توقف واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد می‌شود و گونه‌های فعال رادیکالی را به محصولات پایدارتر و با واکنش پذیری کمتر تبدیل می‌نماید [۴۰]. بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹)، نیز با هیدرولیز پروتئین ماهیچه صاف ماهی گزارش کردند که قدرت آنتی اکسیدانی کل با افزایش غلظت افزایش یافته اما نسبت به نمونه کنترل قدرت آنتی اکسیدانی کمتری داشت [۴۱].

۶-۴- قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل مضرترین گونه بین رادیکال‌های آزاد می‌باشد که قادر به نابود کردن تقریباً تمام مولکول‌های زیستی (اسید آمینه، پروتئین، چربی و DNA) در سلول‌های زنده می‌باشد، بنابراین حذف رادیکال هیدروکسیل می‌تواند از موثرترین روش‌ها برای جلوگیری از بیماری‌ها باشد. اندازه گیری میزان توان مهار رادیکال هیدروکسیل شاخصی از قدرت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده است [۳۷]. با توجه به جدول ۶، تفاوت معنی‌داری بین قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین و نمونه هیدرولیز شده وجود دارد و افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده منجر به افزایش این توانایی گشته است. افزایش آمینواسیدها و گروه‌های فعال پس از انجام فرآیند هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه در توانایی آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌گردد [۳۸]. تیمار بهینه‌ی تولیدی در غلظت (mg/ml) ۵۰، بیشترین قدرت مهار رادیکالی را داراست که نشان دهنده‌ی پتانسیل آن برای کاربرد در سیستم‌های زیستی و مواد غذایی با هدف کاهش آثار مخرب رادیکال‌های آزاد است [۳۹]. چی و همکاران (۲۰۱۵)، با هیدرولیز پروتئین جاندار دریایی blood clam، گزارش کردند که قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل پپتیدهای حاصل

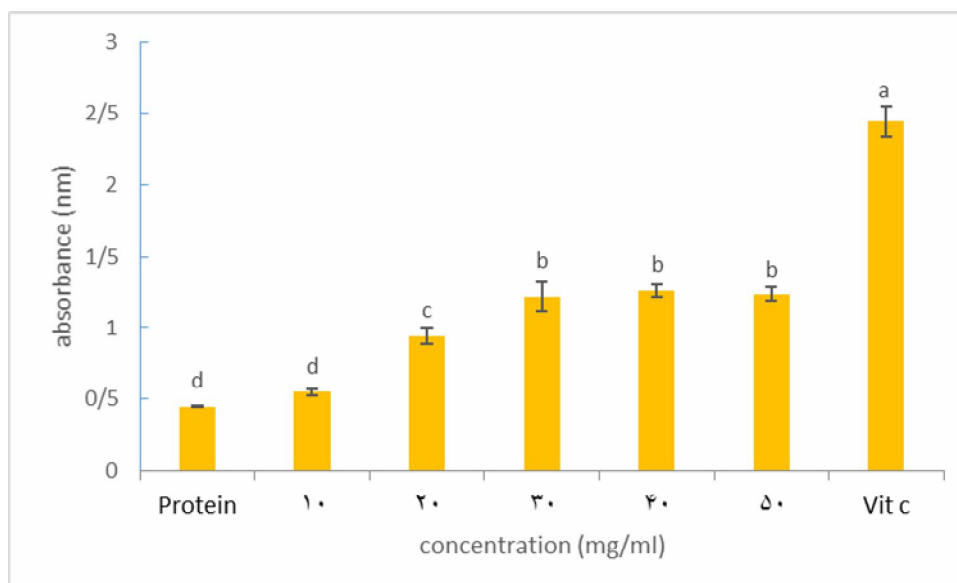


Fig 8 Total antioxidant capacity of hydrolyzed protein in concentrations of (10-50 mg/ml) with primary protein 50 (mg/ml) and vitamin C 50 (mg/ml).

chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106: 444-450.

[3] Sun, J., He, H., Xie, BJ. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Food Chemistry*, 52, 6646-52.

[4] Gauthier, SF., Pouliot, Y., Saint-Sauveur D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 11, 1315-23

[5] Mccann, KB., Shiell, BJ., Michalski, WP., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. (2006). Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine As1-casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-23.

[6] Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, SK. (2005). Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 53, 581-7.

[7] 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, 336-42.

[8] Meisel, H., FitzGerald, RJ. (2003). Biofunctional peptides from milk proteins, mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical design*, 9, 1289-95.

[9] Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A., 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.

۷- نتیجه گیری

در این پژوهش بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله با استفاده از آنزیم پانکراتین و روش سطح پاسخ انجام گرفت. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی آهن، دمای ۳۰°C، نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۸۴ درصد و زمان ۱۷۵/۹۶ دقیقه به دست آمد. نتایج حاصل از بررسی قدرت آنتی-اکسیدانی (قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، احیاءکنندگی آهن، شلاته کنندگی آهن، مهار رادیکال هیدروکسیل و قدرت آنتی-اکسیدانی کل) تیمار بهینه در غلظت‌های ۵۰ (mg/ml) - ۱۰ با پروتئین هیدرولیز نشده نشان داد که هیدرولیز به‌طور چشمگیری منجر به افزایش قدرت آنتی-اکسیدانی پروتئین گشته است. بنابراین پپتیدهای حاصل دارای پتانسیل کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی جهت جلوگیری از اکسیداسیون و به-عنوان ترکیب دارویی می‌باشند.

۸- منابع

[1] Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H. G., Kim, S. K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutrition Biochemistry*, 16, 562-569.

[2] Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of

- [21] AOAC. Official methods of analysis (18th ed), (2008). Association of Official Analytical Chemists Washagton, DC 47.
- [22] Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., 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.
- [23] Wu H-C, Chen H-M, Shiau C-Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int.* 36:949-57.
- [24] Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. (2007) Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. In model and food systems. *Food Chemistry*; 105:57–64
- [25] Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A.(2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*; 121:178–84.
- [26] Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M. (1999) Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem* ;269:337–41.
- [27] Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Habibi-Rezaei, M. (2011). Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4 L. *International journal of food engineering*, 7(5).
- [28] Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., 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.
- [29] Meshkinfar N, Sadeghi Mahoonak, AR., Ziaiifar AM, Ghorbani M, Kashani Nejad M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Tabriz, Journal of Food Researches* 24(2): 215-225.
- [30] Nourmohammadi, E, Sadeghi Mahoonak, A, Alami, M, Ghorbani, M. (2017). Determination of optimum conditions for the production of antioxidant peptides from the
- [10] Gibbs, B. F., Kermasha, S., Alli, I., Mulligan, C. N. (1999). Encapsulation in the food industry. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 50, 213–224.
- [11] Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., Shahidi, F. (2007). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 109, 144–148.
- [12] Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. R. (2004). Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. *Food Chemistry*, 86(1), 99-103.
- [13] 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.
- [14] 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), pp.343-353.
- [15] Dey, S. S., Dora, K. C. (2014). Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of food science and technology*, 51(3), 449-457.
- [16] Matthäus, B. (2002). Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3444–3452.
- [17] Moore, T. (2004). Diabetes in pregnancy. *Maternal-fetal medicine: principles and practice*. 20, 1023-61.
- [18] Modarresi, M., Mehdi, B. (1390). Effect of Fenugreek Hydro alcoholic Extract on Balb / C Material Reproduction Physiology. *Journal of Medicinal Plants*, 4, 267-261.
- [19] Garrote, R.L., Coutaz, V. R., Luna, J. A., Silva, E. R., Bertone, R. A. (1993). Optimizing processing conditions for chemical peeling of potatoes using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 58 (4), 821-826.
- [20] Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F., Varidi, M.J. (2015). Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, *science of food and agriculture*, 15, 3165–3176.

- [36] Saito, K., Jin, D.-H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhaya, T., Nokihara, K. (2003). Antioxidant properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3668–3674.
- [37] Je, J. Y., Qian, Z. J., Byun, H. G., Kim, S. K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42, 840–846.
- [38] Pihlanto A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*; 16:1306–14
- [39] 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.
- [40] Arabshahi-Delouee, S., Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), pp.1233-1240.
- [41] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), pp.1198-1205.
- hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *Journal of food Science and Technology*, 13 (61), 130-123.
- [31] Khantaphant, S., Benjakul, S., Ghomi, M. R. (2011). The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper. *LWT- Food Science and Technology*. 44: 1139-1148.
- [32] Maghsudlou, A, Sadeghi Mahoonak, A, Mohebbodini, H (1396). Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen. *Food Science and Technology*. 13 (73), 227-240.
- [33] Je, J. Y., Lee, M. H., Lee, K. h. Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42: 1266-1272.
- [34] Zhuang, H., Tang, N., & Yuan, Y. (2013). Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1810–1821.
- [35] 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), pp.1360-1367.

Optimization of Production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed

Kaveh, Sh.¹, Sadeghi Mahoonak, A.^{2*}, Ghorbani, M.², Jafari, S. M.², Sarabandi, Kh.³

1. M.Sc. Student of food chemistry, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Ph.D. of food chemistry, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

(Received: 2018/02/03 Accepted:2018/08/25)

Fenugreek seed protein (*Trigonella foenum-graecum*) is a rich source of lysine and tryptophan. In this study, the enzymatic hydrolysis of fenugreek seed protein with the pancreatin enzyme was performed using the response surface methodology with independent variable including: temperature 20 - 60 °C, time 30-270 min, and enzyme to substrate ratio of 0.25-3/25%. Optimum conditions to achieve the highest 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and reducing power were obtained at 46/12 °C, and enzyme to substrate ratio of 1.84% and time of 175.96 min. Then, the antioxidant properties of the optimum treatment were measured at different concentrations (10-50 mg/ml) and compared with antioxidant properties of non-hydrolyzed protein and vitamin C. The highest DPPH radical scavenging activity (52.98%), and total antioxidant activity (absorbance 1.28 at wavelength of 695 nm) were achieved at concentration (40 mg/ml), and the highest hydroxyl radical scavenging activity (70.99%) and Fe²⁺ chelating activity (72.63%) and Fe reducing power (0.80 at wavelength of 700 nm) were achieved at concentration (50 mg/ml). According to the results, the hydrolysis of fenugreek protein by the pancreatin enzyme had led to the production of peptides with significant antioxidant activity that can compete with synthetic antioxidants. Also, these peptides can be used in the pharmaceutical industry and the production of functional foods.

Keywords: Enzymatic Hydrolysis, Pancreatin, Bioactive peptides, Optimization, Fenugreek

* Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@yahoo.com