(مقاله پژوهشی)

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

شیما کاوه[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲*]، محمد قربانی[۲]، خشایار سرابندی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

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

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

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۲/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۲/۰۸

چکیده

در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین شنبلیله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و فواصل زمانی ۲۰۰-۴۰ دقیقه انجام گردید. درجه‌ی هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (فعالیت مهار رادیکال DPPH، قدرت شلاته‌کنندگی 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 نمونه های حاصل از آلکالاز دارای درجه‌ی هیدرولیز بالاتری بودند. بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن و احیاءکنندگی به‌ترتیب به‌میزان ۷۲/۶۵٪ و ۰/۹۶۷، توسط پانکراتین و پس از ۲۰۰ 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 ۲۰۰ دقیقه هیدرولیز به ۵۳/۳۸٪ رسید. با انجام هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه نمونه‌های حاصل از پانکراتین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل بیشتری از خود نشان دادند اما با افزایش زمان تا ۲۰۰ دقیقه فعالیت نمونه‌ها تفاوت زیادی نداشت و به حدود ۷۰٪ رسید. کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در بین نمونه‌های هیدرولیز شده پس از ۴۰ دقیقه هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به میزان ۰/۹۷۱ و ۱/۰۰۴ حاصل شد و بیشترین میزان فعالیت پس از ۲۰۰ دقیقه هیدرولیز با آنزیم آلکالاز و به میزان ۱/۶۹حاصل شد. بنابر نتایج به‌دست آمده پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل می‌توانند به‌عنوان مکمل‌های دارویی و فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان ترکیبات سلامتی بخش مورد استفاده قرار گیرند.

واژه های کلیدی: آلکالاز، آنتی‌اکسیدان، پانکراتین، شنبلیله، هیدرولیز آنزیمی

* مسوول مکاتبات : sadeghiaz@yahoo.com

۱-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 (۱۷). اکسیداسیون لیپیدها از مهم‌ترین نگرانی های صنعت مواد غذایی نیز می‌باشد چرا که منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب، رنگ تیره و ترکیبات سمی در مواد غذایی می‌گردد (۳۰). به‌دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی بلندمدت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA و BHT وجود دارد تقاضا به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش پیدا کرده است (۵۲). 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 ۲۰-۲ آمینو اسید (۳۶) و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون هستند (۴۵). ویژگی‌های پپتیدهای زیست فعال به ترکیب و توالی آمینواسیدی آنها وابسته است (۱۳). از جمله این ویژگی‌ها می‌توان به اثرات ایمنی بخشی(۱۸)، آرام بخشی (۴۴) ، ضد میکروبی (۳۳)، آنتی اکسیدانی (۳۶)، ضد فشار خون (۲۴) و ضد سرطان (۳۵) اشاره نمود. تحقیقات زیادی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده را به اثبات رسانده است، ساکاناکا و همکاران (۴۳)، با تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از زرده‌ی تخم مرغ گزارش کردند که هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه در سیستم اکسیداسیون لینولئیک اسید شده است، جامدار و همکاران افزایش خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن را با افزایش درجه‌ی هیدرولیز پروتئین بادام‌زمینی مشاهده کردند (۲۱). اویسی‌پور و همکاران (۳۹)، بلانسا و همکاران (۸) و گومارز و همکاران (۲۰) به‌ترتیب خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ضایعات ماهی قزل‌آلا، شیر و بذر کتان را به اثبات رساندند. منابع گیاهی و حیوانی متعددی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده مناسب هستند، منابع گیاهی به‌دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند (۳۲). حبوبات منابعی عالی از نظر تغذیه‌ای هستند و قیمت پایینی نیز دارند (۲۵)، در این میان شنبلیله به خانواده‌ی فابیاسه[1] تعلق دارد و به‌طور گسترده به‌عنوان گیاهی دارویی با خواص متعدد از جمله ضد دیابت، ضد سرطان، افزاینده‌ی میل جنسی در مردان، مقوی رحم و تسهیل زایمان در کشورهای ایران و هند مصرف می‌گردد و حاوی گلوبولین-ها، پرولامین‌ها و گلوتلین‌ها و غنی از لیزین و L-تریپتوفان است (۱۷ و ۲۹). امروزه آنزیم‌های تجاری متنوعی از منابع گیاهی، حیوانی و میکروبی به دست آمده است که قابلیت پروتئولیز مناسبی دارند. نوع سوبسترا، آنزیم مورد استفاده و درجه هیدرولیز بر ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی پپتیدهای حاصل تاثیرگذار است (۳۷). آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش آلکالاز و پانکراتین بودند که آلکالاز اندوپپتیدازی قلیایی است که در جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص عملکردی و تغذیه‌ای بهتر از پروتئین اولیه مورد استفاده قرار می‌گیرد (۲۸) و پانکراتین، مخلوطی از آنزیم‌های ترپسین، کیموترپسین، الاستاز و کربوکسی پپتیداز است (۳۴). بنابراین هدف از این پژوهش مقایسه‌ی هیدرولیز پروتئین دانه‌ی شنبلیله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین و بررسی تاثیر درجه‌ی هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، شلاته‌کنندگی یون آهن، احیاکنندگی، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل و مهار رادیکال هیدروکسیل پپتیدهای حاصل در مقایسه با پروتئین اولیه و ویتامین ث بود.

1 -Fabaceae

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱-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، 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

ابتدا دانه‌های شنبلیله شسته و در دمای اتاق خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند و فرآیند چربی‌زدایی، با اختلاط با هگزان به نسبت ۱:۴ (وزنی/ حجمی) و به‌مدت ۳ ساعت همزدن در دمای اتاق با استفاده از شیکر با دور ۱۵۰rpm انجام گرفت. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا و پودر چربی‌گیری شده به‌مدت ۱ساعت در آون با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. سپس جهت استخراج پروتئین، پودر شنبلیله به نسبت ۱:۱۰ با محلول کلرید سدیم۰/۳مولار، مخلوط و pH آن با افزودن سود ۱نرمال روی۹/۲ تنظیم و پس از ۱ ساعت همزدن، محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت روی ۴/۵ (pH ایزوالکتریک پروتئین شنبلیله) تنظیم شد و در جهت رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در ۴۵۰۰×g، به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. کنسانتره پروتئینی حاصل با خشک کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۱۶).

۲-۳-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 (جدول۱). کنسانتره‌ی پروتئینی در غلظت (w/v) ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۲M مولار درون ارلن‌های ۱۰۰ 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 نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دمای انکوباتور، آنزیم به نسبت ۲٪ به محلول اضافه شد. فرآیند هیدرولیز در شرایط هم‌زدن مداوم با دور ۲۰۰rpm در فواصل زمانی ۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ دقیقه انجام شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده و سپس با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ ×g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جدا و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد (۲).

آنزیم	pH	دما (°C)	بافر (۰/۲M)
آلکالاز	۸	۵۰	K_2HPO_4-KH_2PO_4
پانکراتین	۷/٤	٤۰	K_2HPO_4-KH_2PO_4

جدول۱- شرایط انجام هیدرولیز کنسانتره‌ی پروتئین شنبلیله

۲-۵- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴M) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ °C انکوبه شد. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰min سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش بردفورد (۱۰)تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول زیر تعیین شد:

DH (%) = [Protein (TCA+Supernatant)/ Protein (fenugreek hydrolysate suspension)] × 100 (۱)

۲-۶-فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

ابتدا، ۱ml نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت (۴۰ mg/ml) با ۰/۰۵ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ml محلول فروزین (۵mM) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده - شد. جذب پس از ۱۰min نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲nm خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (۲۱):

Chelating activity (%) = $[(A_{control} - A_{sample}/A_{control})] \times 100$

۲-۷-تعیین قدرت احیاءکنندگی

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰mg/ml) با ۰/۵ml بافرفسفات ۰/۲M (pH 6.6) و ۰/۵ml پتاسیم فری‌سیانید (W/V) ۱ درصد مخلوط و در دمای ۵۰ °C برای ۲۰min دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ml محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰min در ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ml سوپرناتانت با ۱ml آب مقطر و ۰/۲ml فریک کلراید (W/V) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰nm پس از ۱۰min 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 (۳).

۲-۸- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰mg/ml) حل شدند. سپس، ۱/۵ml از هر نمونه با ۱/۵ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵mM) مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل به‌مدت ۳۰min در تاریکی نگهداری شد و سپس در ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۰min سانتریفوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید (۴۸):

$$I(\%) = [\frac{Ablank - Asample}{Ablank}] \times 100 \quad (۳)$$

۲-۹-فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

ابتدا ml ۱ از ۱و ۱۰ فنانترولین (۱/۸۶۵ mM) و ml ۲ از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت mg/ml ۴۰) با ۱ml از محلول $FeSo_4.H_2O$ (۱/۸۶۵ mM) مخلوط شدند سپس ۱ml H_2O_2 (۰/۰۳٪ w/v) به مخلوط اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، جذب مخلوط در ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط بدون هیچ آنتی‌اکسیدان به‌عنوان کنترل منفی و مخلوط بدون H_2O_2 بعنوان بلانک استفاده شد. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۱۴):

HRSA (%) = $[(A_s-A_n) / (A_b-A_n)] \times 100$ (۴)

A_s جذب نمونه، A_b جذب بلانک، A_n جذب کنترل منفی می‌باشد.

۲-۱۰-ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر مبنای احیاء مولیبدن۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. در این روش ۰/۱ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰mg/ml -۱۰) با ۱ml 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 سانتی‌گراد 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 (۴۱).

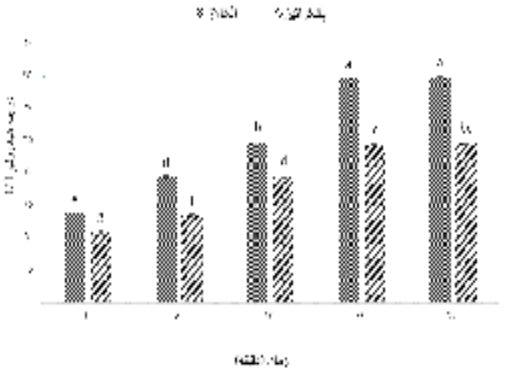
۲-۱۱-تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۴۰، ۸۰، ۱۲۰، ۱۶۰ و ۲۰۰ دقیقه) و نوع آنزیم (آلکالاز و پانکراتین) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی شنبلیله با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرارگرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در $P<۰/۰۵$ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز معیاری از میزان هیدرولیز ساختار پروتئین می‌باشد. شکل ۱، اثر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم را بر میزان درجه هیدرولیز پروتئین شنبلیله نشان می‌دهد. آنالیز آماری نشان‌دهنده‌ی اثر قابل ملاحظه‌ی زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر درجه هیدرولیز می‌باشد ($p<۰/۰۵$)، به‌طوری‌که پس از گذشت ۲۰۰ دقیقه از فرآیند هیدرولیز با پانکراتین درجه - هیدرولیز ٪۲۴/۶۳ به‌دست آمد در حالی‌که درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آلکالاز ٪ ۳۵/۱۷ بود. نتایج کانگ و همکاران نیز در هیدرولیز گلوتن گندم حاکی از فعالیت بیشتر آنزیم آلکالاز در مقایسه با پانکراتین بود (۲۷). درجه هیدرولیز با فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در ۱۲۰ 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 (۴۲). همچنین کاهش سرعت هیدرولیز می تواند به‌دلیل کاهش میزان باندهای پپتیدی موجود برای هیدرولیز و غیر فعال شدن آنزیم باشد (۱۹). این نتایج مشابه یافته‌های موتیلانگی و همکاران (۳۸)، جامدار و همکاران (۲۱)، کریتینسون و راسکو (۲۸) و یو و همکاران (۵۱) می‌باشد که به‌ترتیب اثر آنزیم‌های مختلف را بر درجه هیدرولیز پروتئین‌های آب‌پنیر (تریپسین، کیموتریپسین، آلکالاز و نوترئاز)، بادام زمینی (آلکالاز)، ماهی سالمون (آلکالاز، فلاورزیم و کرولاز) و ماهی تیان (پاپائین و پروتامکس) بررسی کردند.

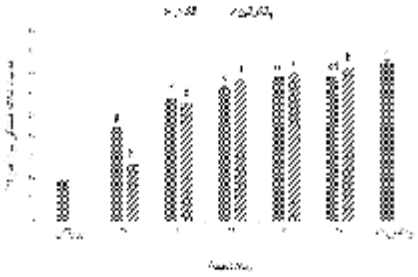


شکل ۱- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر درجه هیدرولیز پروتئین شنبلیله

۳-۲- 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 (۴۹). با توجه به شکل۲، فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از فعالیت آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به میزان قابل توجهی از پروتئین اولیه بیشتر بود ($p<۰/۰۵$)؛ این امر نشان‌دهنده‌ی عملکرد مناسب آنزیم‌های انتخابی در تولید پپتیدهایی با قابلیت شلاته‌کنندگی می‌باشد. درصد شلاته کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب بین ۶۸/۵۸-۴۴/۶۱ و ۷۲/۶۵-۲۶/۷۴ درصد متغیر و کمتر از فعالیت شلاته‌کنندگی

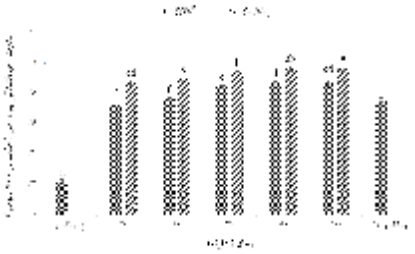
نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) بود. نتایج ارزیابی درصد شلاته‌کنندگی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی تاثیر قابل توجه زمان و درجه هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. به‌طور کلی قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تاثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد (۴۰). علاوه بر این موارد، پروتئین شنبلیله غنی از لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد (۷ و ۱۶)، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به دلیل دارا بودن حلقه‌ی ایمیدازول، توانایی شلاته‌کنندگی و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد را دارند بنابراین احتمالا افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است (۲۳ و ۴۶). جامدار و همکاران (۲۱) و کلامپانگ و همکاران(۲۶) نیز به ترتیب افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی بادام زمینی و نوعی ماهی[1] را با افزایش درجه‌هیدرولیز گزارش کردند.



شکل۲- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته-کنندگی یون Fe^{2+} پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

۳-۳- تعیین قدرت احیاءکنندگی

ارزیابی قدرت احیاءکنندگی در جهت سنجش قابلیت الکترون‌دهندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌کار می‌رود. مطالعات مختلفی نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال وجود دارد (۵۰). همانطور که در شکل ۳، مشاهده می‌گردد، کمترین میزان قدرت احیاءکنندگی مربوط به پروتئین اولیه و به میزان ۰/۲۱۶ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) بود، تمامی نمونه‌های حاصل از فعالیت پانکراتین و نیز نمونه‌های حاصل از آلکالاز پس از ۱۲۰ دقیقه هیدرولیز، دارای قدرت احیاءکنندگی بیشتر از نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) بودند ($p<۰/۰۵$)، این یافته‌ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین بر افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی 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 (۵۳)، 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 احیاءکنندگی افزایش می‌یابد (۲۱). نتایج نشان دادند که قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پانکراتین بیشتر از آلکالاز بوده است که حاکی از عملکرد بهتر پانکراتین نسبت به آلکالاز در افزایش قدرت احیاءکنندگی می‌باشد. آمبیگاپیلان و همکاران نیز با هیدرولیز پروتئین هسته‌ی خرما، با آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم و ترمولیزین گزارش کردند که پپتیدهای حاصل از آنزیم آلکالاز دارای قدرت احیاءکنندگی کمتری بودند(۴). یو و همکاران (۵۱)، زو و همکاران (۵۳)، وو و همکاران (۴۸)، به‌ترتیب افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ماهی تیان، زئین و ماهی ماکرل را گزارش کردند.

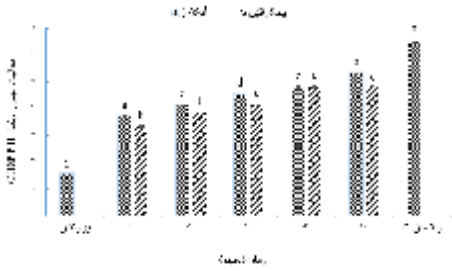


شکل۳- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

1- Selaroides leptolepis

۳-٤- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH، رادیکال آزاد محلول در چربی است که دارای ماکزیمم جذب در ۵۱۷ نانومتر است و پس از دریافت هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان به ترکیبی پایدار تبدیل می‌شود و جذب آن کاهش می‌یابد (۵۱ و ۵۳). 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 ($p<۰/۰۵$)، به‌طوریکه در مورد نمونه‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب در محدوده‌ی ۵۳/۳۸-۳۷/۱۶ درصد و۴۷/۸۶-۳۳/۲۵ درصد بود. مقدار این شاخص برای ویتامین ث ۶۵/۵۴ 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 شکل۴، 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 پس۲۰۰ دقیقه هیدرولیز با آنزیم آلکالاز قدرت مهار رادیکال DPPH، ۵۳/۳۸ 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 (۱۲). باتیستا و همکاران با هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی[1]، گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد (۶). آنها علت این امر را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که قابلیت واکنش با رادیکال‌های ازاد را دارند، بیان کردند. جامدار و همکاران (۲۱)، یو و همکاران (۵۱) و چن و همکاران (۳۱)، نیز به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های سویا، اهی تیان و کلاژن خوکی، رابطه‌ی مستقیمی را بین قدرت مهار رادیکال DPPH و درجه هیدرولیز گزارش کردند.



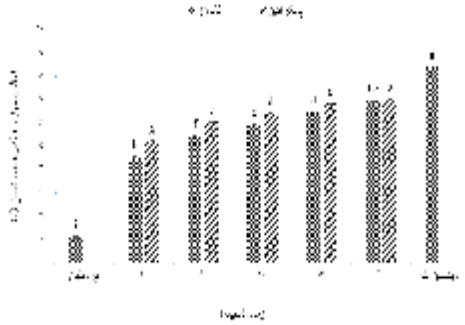
شکل٤- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

۳-۵- 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 (۲۳ و ۱۱). آنالیز آماری نتایج نشان داد که به طور 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 (۱۵). آن‌ها علت این امر را درجه‌ی هیدرولیز بیشتر نمونه‌های حاصل از آلکالاز گزارش کردند، بنابراین توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در جلوگیری از اکسیداسیون به ماهیت ماده‌ی اولیه و نوع پروتئاز مورد استفاده بستگی دارد (۴۰). با توجه به نتایج نشان داده شده در شکل ۵، دراین پژوهش کمترین میزان فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل مربوط به پروتئین شنبلیله و به میزان ۱۰/۹۳ درصد بود، مقدار این شاخص برای ویتامین ث ۸۴/۰۲ درصد محاسبه شد. افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل به میزان قابل ملاحظه‌ای گردید ($p<۰/۰۵$). به‌طوریکه پس از انجام هیدرولیز به مدت ۲۰۰ دقیقه با آنزیم‌های آلکالاز و

1 -Apanopus carbo

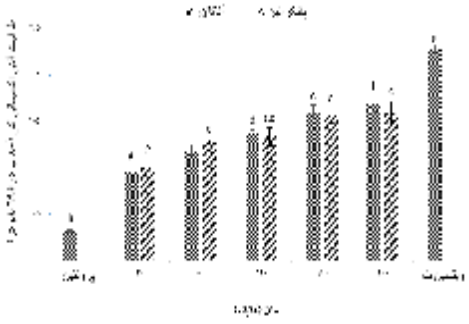
پانکراتین فعالیت مهارکنندگی به ترتیب به میزان ۶۹/۴۲ و ۷۰/۱۷ درصد افزایش یافت. افزایش زمان هیدرولیز با افزایش درجه هیدرولیز منجر به تغییر در اندازه و ترکیب آمینواسیدی پپتیدها شده است و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها افزایش یافته است. مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پپتیدهای حاوی هیستیدین دارای خاصیت 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 (۱۳)، بنابراین احتمالا افزایش درجه‌هیدرولیز 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 (۲۲) و یو و همکاران (۵۱) است که به‌ترتیب هیدرولیز پروتئین‌های جگر ماهی تن (آلکالاز، نوترئاز، پروتامکس و فلاورزیم) و ماهی تیان (پاپائین و پروتامکس) را مورد بررسی قرار دادند.



شکل۵- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

۳-٦- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ارزیابی فسفومولیبدن یک روش کمی برای ارزیابی قدرت آنتی‌اکسیدانی کل ترکیبات زیست فعال می‌باشد، همانطور که در شکل ۶ نشان داده شده است، در این پژوهش هیدرولیز به میزان قابل توجهی منجر به افزایش ظرفیت 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 به‌طوری‌که بعد از انجام هیدرولیز به مدت ۴۰ دقیقه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب ۰/۹۷۱ و ۱/۰۰۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود و با ادامه‌ی فرآیند هیدرولیز تا ۲۰۰ دقیقه قدرت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$) و به میزان ۱/۶۹ و ۱/۶ رسید اما از فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل ویتامین ث (۲/۲۷) کمتر بود. درواقع 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 (۵). آمایاپاروواتی و همکاران (۴۷)، فعالیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی صدف خوراکی را وابسته به غلظت گزارش کردند و بیان کردند که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در غلظت (mg/ml) ۱ 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(۹).



شکل ٦- تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله

٤- 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 شنبلیله با آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین انجام شد. نتایج نشان داد که، خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی شنبلیله، 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 آنتی‌اکسیدانی کل) به میزان قابل توجهی افزایش یافت. پس از ۲۰۰ دقیقه هیدرولیز، بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH و آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به نمونه‌های حاصل از آلکالاز، با درجه‌ی هیدرولیز ۳۴/۹۱ درصد و بیشترین قدرت شلاته‌کنندگی و احیاءکنندگی مربوط به نمونه‌های حاصل از پانکراتین و با درجه‌ی هیدرولیز ۲۴/۶۳ درصد بود. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل نمونه‌های حاصل از هر دو آنزیم پس از ۲۰۰ دقیقه هیدرولیز با یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند. بنابراین، هیدرولیز آنزیمی پروتئین شنبلیله 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.

٥-منابع

١. مدرسی، م.، و مهدیان، ب. ۱۳۹۰. اثر عصاره‌ی هیدروالکلی دانه شنبلیله بر فیزیولوژی تولید مثل جنس ماده Balb/c. *فصلنامه‌ی داروهای گیاهی*. شماره٤، ص ٢٦٧-٢٦١.

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 Food27s*, 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.

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 endoproteo-lytic preparations and influence on some whey protein characteris-tics. *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
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. Megías, 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*

fermented mushroom Ganoderma 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 fromGarcinia indicafruit 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 trilobaL.) 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 zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8): 2714-2721.

(Original Research Paper)

Comparison of Antioxidant Properties of Fenugreek Seed Protein Hydrolyzed with Alcalase and Pancreatin

Shima kaveh[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2*], Mohammad Ghorbani[2], Khashayar Sarabandi[3]

1- M.Sc. Student, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran
3- Ph.D Graduated of Food Science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received:09/03/2018 Accepted:28/04/2018

Abstract

In this study, the enzymatic hydrolysis of fenugreek protein with alcalase and pancreatin enzymes in 2% enzyme to substrate ratio and hydrolysis time of 40-200 min was performed. The degree of hydrolysis and antioxidant properties of the samples (DPPH radical scavenging activity, Fe chelating activity, reducing power, total antioxidant activity, hydroxyl radical activity) were evaluated. The results showed that, the degree of hydrolysis of samples increased by increasing the hydrolysis time and the alcalase hydrolyzed samples had higher degree of hydrolysis. The maximum Fe chelating activity and reducing power were 72.65% and 0.967 respectively, which obtained by Pancreatin, after 200 min of hydrolysis. The alcalase samples showed higher DPPH radical scavenging capacity than the Pancreatin hydrolyzed samples, and their activity increased by increasing hydrolysis time, and after 200 minutes, reached to 53.38%. By hydrolysis until 160 minutes, Pancreatin hydrolyzed samples exhibited higher hydroxyl radical scavenging activity compared to alcalase hydrolyzed samples, but they did not show any significance differences after 200 minutes, and reached to 70%. The minimum total antioxidant activity was obtained after hydrolysis by alcalase and pancreatin enzymes for 40 minutes and were 0.971 and 1.004, respectively; and the maximum activity was obtained after 200 min of hydrolysis by alcalase enzyme which was 1.69. According to the obtained results, fenugreek hydrolyzed proteins can be used as pharmaceutical supplements and in food formulations as functional components.

Keywords: Alcalase, Antioxidant, Pancreatin, Fenugreek, Enzymatic Hydrolysis

*Corresponding Author: sadeghiaz@ yahoo.com