مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهاردهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۸، صفحات ۸۸-۷۷

بهینه‌سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه شنبلیله با استفاده از روش سطح پاسخ

شیما کاوه[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، محمد قربانی[۳]، سید مهدی جعفری[۳]، خشایار سرابندی[۴]

۱- دانشجوی کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۴- دانش‌آموخته‌ی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱

چکیده

سابقه و هدف: پپتیدهای زیست فعال دارای ویژگی‌های سلامتی‌بخشی و عملکردی متفاوتی می‌باشند و به روش‌های هیدرولیز آنزیمی، تخمیر میکروبی و سنتز شیمیایی تولید می‌شوند. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه‌ی شنبلیله با آلکالاز و ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل بود.

مواد و روش‌ها: شرایط هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله (دما ۶۰-۲۰ ºC، زمان ۲۷۰–۳۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳/۲۵–۰/۲۵٪) جهت دستیابی به بیشترین میزان قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن با روش سطح پاسخ (RSM) بهینه‌سازی شد. ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی تیمار بهینه (قدرت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته‌کنندگی یون آهن و آنتی‌اکسیدانی کل) در غلظت‌های (mg/ml) ۵۰-۱۰، با قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز نشده و ویتامین ث مقایسه شد.

یافته‌ها: نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۳۲ ٪، دمای ۴۷/۰۴ °C و زمان ۱۹۸/۲۱ دقیقه به‌عنوان شرایط بهینه توسط نرم‌افزار تعیین شد. تحت این شرایط قدرت احیاء کنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن به ترتیب ۱/۲۹ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و ۷۹/۱۵ ٪ به‌دست آمد. نتایج نشان داد که، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (۱/۲۰)، مهار رادیکال هیدروکسیل (۶۹/۴۹ ٪) و قدرت احیاءکنندگی (۱/۱۲) در غلظت (mg/ml) ۴۰ و بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH (۵۰/۹۹ ٪)، در غلظت (mg/ml) ۵۰ حاصل شد. بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۷۱/۹۲ ٪) پروتئین هیدرولیز شده، ۲/۵ برابر پروتئین اولیه بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که هیدرولیز آنزیمی به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین شنبلیله شد. پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله با دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه به‌عنوان یک جزء بالقوه می‌تواند در فرمولاسیون مواد غذایی و اهداف دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: آلکالاز، آنتی‌اکسیدان، سطح پاسخ، شنبلیله، هیدرولیز آنزیمی

• مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد در بسیاری از بیماری‌ها مانند سرطان، زخم معده و آلزایمر نقش اساسی دارند. تشکیل رادیکال‌های آزاد مانند رادیکال سوپراکسید و هیدروکسیل در اندام‌های هوازی اجتناب ناپذیر می‌باشد. این رادیکال‌ها بسیار ناپایدار هستند و به‌سرعت با سایر ترکیبات موجود در بدن واکنش داده و منجر به آسیب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شوند.

پراکسیداسیون لیپیدها با تولید ترکیبات مضر و هم چنین مواد بد بو و بد طعم، از مهم‌ترین نگرانی صنعت موادغذایی است. آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند در سطوح مختلف واکنش‌های اکسیداتیو تأثیرگذار باشند (۱). استفاده از آنتی-اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT، TBHQ و PG، به‌دلیل تأثیرات مضر آنها بر سلامتی انسان، به‌شدت تحت کنترل و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

نظارت شدید می‌باشد (۲). بنابراین تحقیقات دانشمندان به‌سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی سوق پیدا کرده است.

پپتیدهای زیست فعال اجزای پروتئینی خاصی هستند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال هستند و به روش‌های هیدرولیز آنزیمی، تخمیر میکروبی و سنتز شیمیایی تولید می‌شوند (۳)، دارای ۲۰-۲ اسیدآمینه هستند و وزن مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (۲). این پپتیدها ویژگی‌های سلامتی‌بخشی متفاوتی (تقویت کنندگی سیستم ایمنی بدن، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، کاهندگی کلسترول و فعالیت ضد فشار خون) دارند که تحت تأثیر ترکیب و توالی آمینواسیدی آنهاست (۵، ۴).

تحقیقات زیادی در رابطه با خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال صورت گرفته است از جمله: شیر (۶)، زرده‌ی تخم مرغ (۷)، سویا (۸) و کانولا (۹). در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب تر و آلرژی زایی کمتر (۱۰)، بیشتر مورد توجه قرار گرفته‌اند.

در این میان دانه شنبلیله با نام علمی Fenugreek (*Trigonella foenum Graceum*)، از تیره پروانه‌داران و از خانواده حبوبات است. شنبلیله غنی از لیزین، L-تریپتوفان و آمینواسیدهای اسیدی گلوتامین و آسپارژین است اما دارای مقدار کمی از آمینواسیدهای گوگردی است (۱۱). شنبلیله اثرات مفید زیادی از جمله: کاهش قند و چربی خون، درمان دیابت، ضد نفخ و درد، ضد سرطان، افزاینده‌ی میل جنسی در مردان، شیر افزا، مقوی رحم و تسهیل زایمان دارد (۱۲).

روش سطح پاسخ، برای بررسی و بهینه‌سازی فرآیندهای پیچیده‌ی صنایع غذایی مناسب می‌باشد. این روش اثر متغیرهای مستقل را به تنهایی و یا به‌صورت ترکیبی در فرآیند نشان می‌دهد و با ایجاد یک مدل ریاضی به‌صورت دقیق فرآیند را تفسیر می‌کند.

هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله (دما ۶۰-۲۰ °C، زمان ۲۷۰–۳۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳/۲۵–۰/۲۵ ٪) جهت دستیابی به بیشترین میزان قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن با روش سطح پاسخ و سپس بررسی و مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی تیمار بهینه (قدرت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی، مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته‌کنندگی یون آهن و آنتی‌اکسیدانی کل) در غلظت‌های (mg/ml) ۵۰-۱۰، با قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز نشده و ویتامین ث بود.

• مواد و روش‌ها

مواد: آلکالاز، 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.

چربی‌گیری از دانه شنبلیله: ابتدا دانه‌های شنبلیله شسته و در دمای اتاق خشک و با آسیاب الکتریکی پودر شدند. سپس آرد حاصل به نسبت ۱:۴ (وزنی/حجمی) با هگزان مخلوط و ۳ ساعت در دمای اتاق با استفاده از شیکر با دور ۱۵۰rpm همزده شد. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا و پودر چربی‌گیری شده به‌مدت ۱ساعت در آون با دمای ۳۰ °C قرار گرفت و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد (۱۳).

تهیه کنسانتره پروتئین شنبلیله: شنبلیله به نسبت ۱:۱۰ با محلول کلرید سدیم ۰/۳مولار، مخلوط و pH آن توسط سود ۱ نرمال روی ۹/۲ تنظیم و به‌مدت ۱ ساعت همزده شد. محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس pH سوپرناتانت روی ۴/۵ (pH ایزوالکتریک شنبلیله) تنظیم شد و در ۴۵۰۰×g به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل (کنسانتره پروتئین) با آب مقطر دو بار شسته شده و در ۴۵۰۰×g به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. کنسانتره پروتئینی حاصل با فریز درایر خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۲۰ °C- نگهداری شد (۱۳).

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی: اندازه‌گیری میزان پروتئین، خاکستر و رطوبت با استفاده از روش AOAC انجام گرفت (۱۴).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده: کنسانتره‌ی پروتئین شنبلیله در غلظت (w/v) ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۲M مولار (۷/۴= pH) حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم شد. سپس آنزیم به نسبت‌های مورد نظر (جدول ۴) به محلول اضافه شد. تمامی واکنش‌ها در انکوباتور شیکر دار با دور ۲۰۰ rpm در دما و زمان مورد نظر برای هر تیمار (جدول۴) انجام شد. سپس به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. محلول تا دمای محیط خنک گردید. نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ ×g به مدت ۲۰

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت جدا، لیوفیلیزه و تا زمان استفاده در دمای ۲۰ ºC- نگهداری شد (۱۵).

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن: ابتدا، ۱ml نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت (mg/ml) ۴۰ با ۰/۰۵ ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ ml محلول فروزین (۵ mM) افزوده و مخلوط به‌شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ nm خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد (۱۶). فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد:

(۱)

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

قدرت احیاءکنندگی: ابتدا ۰/۵ ml نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۵ ml بافرفسفات ۰/۲ M (pH =۶/۶) و ۰/۵ ml پتاسیم فری‌سیانید (W/V) ۱ درصد مخلوط و در دمای ۵۰ºC برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ ml محلول تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ml ۱ سوپرناتانت با ml ۱ آب مقطر و ml ۰/۲ فریک کلراید (W/V) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰nm پس از ۱۰ دقیقه نگهداری 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 (۱۷).

درجه هیدرولیز: سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴ M) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ºC انکوبه شد. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰ rpm و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش بردفورد (۱۸) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول ۲ تعیین شد:

(۲)

$$DH\ (\%) = \text{Protein (TCA+Supernatant)/ Protein (fenugreek hydrolysate suspension)} \times 100$$

بررسی تأثیر غلظت بر خصوصیات آنتی اکسیدانی تیمار بهینه هیدرولیز شده

قدرت شلاته‌کنندگی آهن و قدرت احیاءکنندگی: برای تعیین تأثیر غلظت (غلظت ۵۰-۱۰ mg/ml) بر قدرت شلاته‌کنندگی آهن و میزان قدرت احیاءکنندگی تیمار بهینه به‌ترتیب از روش Jamdar و همکاران (۱۶) و احمدی و همکاران (۱۷) استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: ۱/۵ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰-۱۰ mg/ml) با ۱/۵ ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد (۱۹). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول ۳ محاسبه گردید:

(۳)

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

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل: ابتدا ml ۱ از ۱ و ۱۰ فنانترولین (۱/۸۶۵ mM) و ml ۲ از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰-۱۰ mg/ml) با ۱ml از محلول $FeSo_4.H_2O$ (۱/۸۶۵ mM) مخلوط شدند. سپس ml ۱ H_2O_2 (w/v ۰/۰۳٪) به مخلوط اضافه شد. بعد از انکوباسیون به‌مدت 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 به‌عنوان بلانک استفاده شد. قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از فرمول ۴ محاسبه شد (۲۰):

(۴)

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

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

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: ابتدا ml ۰/۱ از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۵۰-۱۰ mg/ml) با ۱ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به‌مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب۹۰ºC قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بیشتر است (۲۰).

تجزیه و تحلیل آماری: بهینه سازی شرایط هیدرولیز با نرم افزار Design expert نسخه ۷ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی انجام شد. متغیرهای مستقل دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا و پاسخ مورد بررسی قدرت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

احیاکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن در نظر گرفته شدند. اثر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ارزیابی گردید. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ صورت گرفت. نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

• یافته‌ها

ترکیبات شیمیایی: میزان رطوبت، خاکستر و پروتئین پودر چربی‌گیری شده و چربی‌گیری نشده و کنسانتره پروتئین حاصل در جدول ۱ ذکر شده است.

تأثیر زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن: با توجه به تجزیه‌ی واریانس ذکر شده در جدول ۲، اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیرهای B^2 و C^2 بر قدرت شلاته‌کنندگی معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$)، در این میان B^2، دارای تأثیر بیشتری می‌باشد. رابطه‌ی قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن با هر یک از متغیرهای مستقل به‌صورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2=۰/۷۹۸۸$ می‌باشد و از معادله‌ی ۵، تبعیت می‌کند؛ که حاکی از توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته می‌باشد. همچنین با توجه به جدول ۲، معنی‌دار نبودن شاخص عدم برازش، حاکی از این امر است که مدل به اندازه‌ی کافی توانسته تغییرات در مقادیر داده‌ها را توصیف کند.

معادله‌ی ۵

قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن = ۷۴/۹۰+۳/۸۳A+۵/۳۲B+۷/۳۲C+ ۱/۴۴AB + ۰/۸۲AC+۴/۱۲ BC-۴/۷۳ A^2-۷/۴۳ B^2- ۵/۱۲C^2

در زمان ثابت ۱۵۰ دقیقه، با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا تا ۲ درصد و افزایش دما تا ^oC ۴۰، قدرت شلاته‌کنندگی تا ۷۸ درصد افزایش یافت، اما با افزایش دما بیش از ^oC۴۵ و نسبت آنزیم به سوبسترا بیش از ۲ درصد، قدرت شلاته‌کنندگی کاهش یافت (شکل ۱-الف). قدرت شلاته‌کنندگی با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۷۰ دقیقه و افزایش دما تا ^oC۴۰، در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷۵ (شکل۱-ب)، به‌میزان ۷۰ درصد افزایش یافت، بنابراین با ترکیب مناسبی از دما و زمان می‌توان پپتیدهایی با قابلیت شلاته‌کنندگی آهن تا میزان ۷۰ درصد تولید نمود. در دمای ثابت ^oC۴۰، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۷۰ دقیقه و افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا تا ۲ درصد، قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده افزایش یافت اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز منجر به کاهش قدرت شلاته‌کنندگی گردید (شکل۱-پ).

جدول ۱. ترکیبات شیمیایی پودر چربی گیری شده، چربی گیری نشده و کنسانتره پروتئین شنبلیله

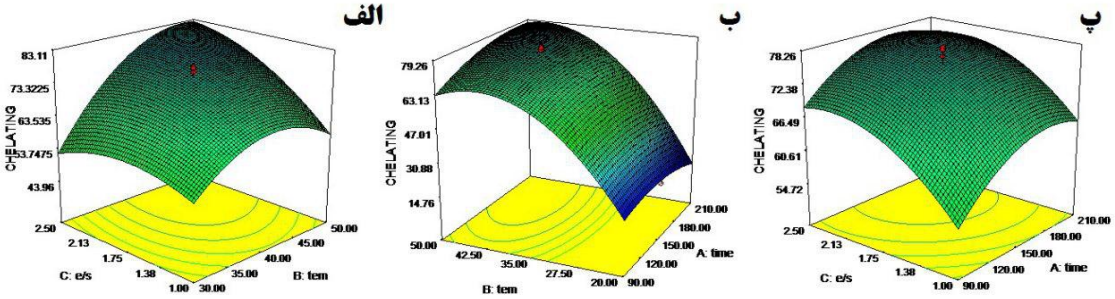
	پروتئین (درصد)	رطوبت (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر(درصد)
پودر چربی‌گیری نشده	۲۹/۷۷±۰/۳۲^c	۸/۰۳±۰/۳۵^a	۱۷/۲۵±۰/۵۳^a	۷/۶۵±۰/۱۴^a
پودر چربی‌گیری شده	۴۵/۰۳±۰/۶۱^b	۷/۲±۰/۲۶^b	۵/۰۶±۰/۲۷^b	۶/۵۳±۰/۱۱^b
کنسانتره پروتئین شنبلیله	۷۵/۲۷±۰/۵۵^a	۶/۲±۰/۲۵^c	۳/۲۰±۰/۳۰^c	۳/۱۱±۰/۱۵^c

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p<۰/۰۵$ می‌باشد.

جدول ۲. نتایج تجزیه واریانس قدرت شلاته‌کنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده.

	مجموع مربعات	درجه آزادی	عدد P	ضریب رگرسیون
Model	۳۱۶۶/۰۷	۹	۰/۰۴۴۸	۷۴/۹۰
A-time	۲۳۴/۹۳	۱	۰/۱۶۳۲	۳/۸۳
B-temperature	۴۵۲/۹۴	۱	۰/۰۶۵۶	۵/۳۲
C-E/S	۸۵۶/۵۹	۱	۰/۰۱۸۹	۷/۳۲
AB	۱۶/۶۸	۱	۰/۶۹۳۲	-۱/۴۴
AC	۵/۳۶	۱	۰/۸۲۲۴	۰/۸۲
BC	۱۳۶/۰۴	۱	۰/۲۷۶۳	۴/۱۲
A^2	۴۸۸/۹۴	۱	۰/۰۵۷۶	-۴/۷۳
B^2	۱۲۰۴/۵۲	۱	۰/۰۰۸۴	-۷/۴۳
C^2	۵۷۱/۰۷۲۴۳	۱	۰/۰۴۳۵	-۵/۱۲
Lac of fit		۵	۰/۲۳۴۷	

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]



شکل۱. الف: اثر نسبت آنزیم و دما ب: اثر زمان و دما پ: اثر زمان و نسبت آنزیم بر قدرت شلاته‌کنندگی آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده

قدرت احیاء کنندگی: با توجه به نتایج تجزیه واریانس قدرت احیاءکنندگی آهن (جدول۳)، رابطه‌ی قدرت احیاء-کنندگی و متغیرهای واکنش از نوع درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۸۸۷۴ می‌باشد. بنابراین مدل توانسته به-خوبی و به‌میزان ۸۸/۷۴ درصد از کل تغییرات در محدوده‌ی متغیرهای مورد بررسی را توضیح دهد (۲۱). شاخص عدم تطبیق مدل با داده‌های آزمایش معنی‌دار نشد ($p>$۰/۰۵)، که این امر بیانگر مناسب بودن مدل در جهت پیش‌بینی دامنه‌ی متغیرهای مورد آزمایش می‌باشد. تأثیر نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیر B^2 بر قدرت احیاءکنندگی معنی‌دار است و غلظت آنزیم اثر قابل ملاحظه‌تری نسبت به سایر متغیرها دارد؛ بنابراین معادله‌ی ۶ برای قدرت احیاءکنندگی آهن پیشنهاد شد:

معادله‌ی ۶:

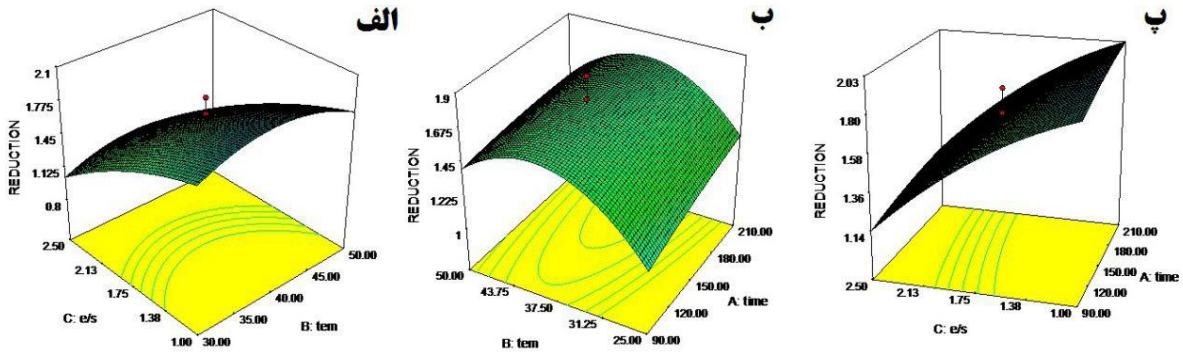
قدرت احیاءکنندگی =-۰/۰۳۱AB -۸/۷۵AC-۳/۷۵ BC-۰/۰۱۶ A^2- ۱/۶۸+۰/۰۶۴A-۵/۰۲۲B- ۰/۳۸C۰/۲۰ B^2- ۰/۰۹۳C^2

در زمان ثابت ۱۵۰ دقیقه افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا بیشتر از ۱ درصد، منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی یون آهن گردید. بیشترین و کمترین قدرت احیاءکنندگی به-ترتیب در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ و ۲/۵ درصد حاصل شد. با افزایش دما تا ۴۰°C، قدرت احیاءکنندگی افزایش یافت اما افزایش بیشتر دما، بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین-های هیدرولیز شده اثر منفی داشت (شکل ۲-الف). در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷۵ درصد، افزایش زمان منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی با شیب کم اما ثابت گردید. بیشترین قدرت احیاءکنندگی در بازه‌ی دمایی ۴۵-۳۵ درجه‌ی سانتی‌گراد حاصل شد (شکل ۲-ب). دور شدن از محدوده‌ی بهینه‌ی دمایی فعالیت آنزیم منجر به کاهش کارایی آنزیم در هیدرولیز می‌گردد، بنابراین این امر می‌تواند منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل شود. با توجه به شکل۲-پ، با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، قدرت احیاء-کنندگی کاهش یافت و افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش قدرت الکترون دهندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز گردیده است. با توجه به جدول ۳، در مقایسه با زمان هیدرولیز، اثر نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیاء-کنندگی بیشتر است، به‌طوریکه بیشترین قدرت احیاء-کنندگی در زمان‌های هیدرولیز طولانی‌تر و در نسبت آنزیم به سوبسترای کمتر حاصل شد.

جدول ۳. نتایج تجزیه واریانس قدرت احیاءکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده

	مجموع مربعات	درجه آزادی	عدد P	ضریب رگرسیون
Model	۳/۳۹	۹	۰/۰۰۵۸	۱/۶۸
A-time	۰/۰۶۶	۱	۰/۲۹۸۸	۰/۰۶۴
B-temperature	۷/۶۵۶	۱	۰/۷۱۵۶	-۰/۰۲۲
C-E/S	۲/۳۳	۱	۰/۰۰۰۲	-۰/۳۸
AB	۷/۸۱۳	۱	۰/۷۱۲۸	-۰/۰۳۱
AC	۶/۱۲۵	۱	۰/۹۱۷۶	-۸/۷۵۰
BC	۱/۱۲۵	۱	۰/۹۶۴۶	-۳/۷۵۰
A^2	۵/۵۸۵	۱	۰/۷۵۵۳	-۰/۰۱۶
B^2	۰/۸۷	۱	۰/۰۰۳۸	-۰/۲۰
C^2	۰/۱۹	۱	۰/۰۹۶۲	-۰/۰۹۳
Lac of fit		۵	۰/۱۶۲۵	

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]



شکل ۲. الف: اثر نسبت آنزیم و دما ب: اثر زمان و دما پ: اثر زمان و نسبت آنزیم بر قدرت احیاءکنندگی آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده

انتخاب تیمار بهینه و اعتبار سنجی مدل: نتایج مربوط به قدرت احیاءکنندگی و شلاته کنندگی یون آهن در جدول ۴ ذکر شده است. شرایط بهینه توسط نرم افزار، دمای ۴۷/۰۴ °C، میزان آنزیم ۲/۲۳ درصد و زمان ۱۹۸/۲۱ دقیقه، پیشنهاد شد، که منطبق با قدرت احیاءکنندگی ۱/۳۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و شلاته‌کنندگی ۷۹/۰۵ درصد بود. در شرایط ذکر شده هیدرولیز انجام شد و قدرت احیاءکنندگی و شلاته کنندگی آهن نمونه‌های حاصل به‌ترتیب به‌میزان ۱/۱۲ و ۷۱/۹۲ درصد به‌دست آمدند. این نتایج حاکی از توانایی خوب مدل پیشنهادی برای بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر قدرت احیاءکنندگی و شلاته‌کنندگی یون آهن می‌باشد. درجه‌ی هیدرولیز تیمار بهینه به‌میزان ۱/۹۷± ۴۲/۱۸ درصد تعیین شد.

جدول ۴. طرح آزمایشی مرکب مرکزی و پاسخ متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل

تیمار	A	B	C	Y_1	Y_2
۱	۳۰	۴۰	۱/۷۵	۵۲/۰۲	۱/۴۵
۲	۹۰	۵۰	۱	۳۶/۹۳	۱/۸۴
۳	۹۰	۵۰	۲/۵	۷۱/۰۷	۰/۷۹
۴	۹۰	۳۰	۱	۴۸/۸۵	۱/۷۹
۵	۹۰	۳۰	۲/۵	۴۰/۷۸	۰/۷۸
۶	۱۵۰	۴۰	۰/۲۵	۴۴/۸۹	۱/۸۴
۷	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۷۷/۷۷	۱/۸۵
۸	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۷۶/۶۵	۱/۷۰
۹	۱۵۰	۲۰	۱/۷۵	۳۵/۲۵	۰/۹۹
۱۰	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۷۸/۱	۱/۶۱
۱۱	۱۵۰	۴۰	۱/۷۵	۷۷/۲	۱/۶۷
۱۲	۱۵۰	۴۰	۳/۲۵	۷۴/۰۸	۰/۸۸
۱۳	۱۵۰	۶۰	۱/۷۵	۶۵/۲۲	۰/۸۸
۱۴	۲۱۰	۳۰	۱	۴۳/۵۷	۱/۹۲
۱۵	۲۱۰	۵۰	۲/۵	۶۳/۲۹	۰/۷۶
۱۶	۲۱۰	۳۰	۲/۵	۶۴/۴۹	۰/۸۵
۱۷	۲۱۰	۵۰	۱	۵۱/۵۹	۱/۸۲
۱۸	۲۷۰	۴۰	۱/۷۵	۷۰/۰۲	۱/۸۹

A (زمان،دقیقه)، B (دما، درجه‌سانتی‌گراد)، C(نسبت آنزیم به سوبسترا)، Y_1 (قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن بر حسب٪)، Y_2 (قدرت احیا کنندگی، جذب در ۷۰۰nm)

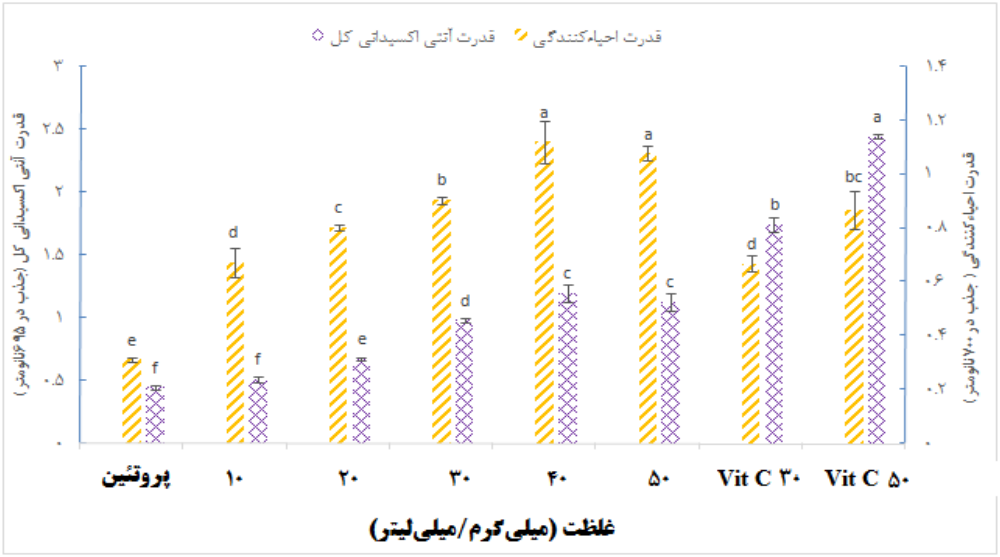
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی

قدرت احیاءکنندگی یون آهن: با توجه به شکل ۳، قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده با افزایش غلظت به‌میزان قابل توجهی افزایش یافته است ($p<0/05$). اختلاف معنی‌داری بین قدرت احیاءکنندگی پروتئین اولیه و پروتئین‌های هیدرولیز شده، حاکی از توانایی خوب آنزیم آلکالاز در رهاسازی پپتیدهایی با قدرت احیاءکنندگی می‌باشد، به‌طوریکه قدرت پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های (mg/ml) ۵۰ و ۴۰ از قدرت احیاءکنندگی ویتامین ث بیشتر بود.

قدرت شلاته کنندگی یون آهن: با توجه به جدول ۵، قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده بین ۴۵/۱۳-۵۹/۳۹ درصد متغیر بود. کمترین فعالیت شلاته‌کنندگی مربوط به پروتئین هیدرولیز نشده و بیشترین مربوط به پروتئین هیدرولیز شده در غلظت (mg/ml) ۵۰ و ۴۰ بود. بنابراین فرآیند هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین به‌میزان ۲/۵ برابر شد.

قدرت مهار رادیکال DPPH: با افزایش غلظت، قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده به‌میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و فعالیتی وابسته به غلظت را از خود نشان داد ($p<0/05$). هیدرولیز به‌طور قابل توجهی منجر به افزایش قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین شنبلیله شد به‌طوریکه قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین از حدود ۱۹ درصد به ۳۱ درصد افزایش پیدا کرد (جدول۵). قدرت مهار رادیکال DPPH، پپتیدهای حاصل نسبت به ویتامین ث کمتر بود.



شکل ۳. مقایسه قدرت احیاءکنندگی و آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده در غلظت (mg/ml) ۵۰-۱۰ در برابر پروتئین اولیه (mg/ml) ۵۰ و ویتامین ث (mg/ml) ۵۰ و ۳۰

جدول ۵. مقایسه قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل (٪)، قدرت مهار رادیکال DPPH (٪)و شلاته‌کنندگی یون آهن (٪) در غلظت‌های مختلف (۵۰-۱۰ mg/ml) با پروتئین اولیه (mg/ml) ۵۰ و ویتامین ث (mg/ml) ۵۰ و ۳۰

	پروتئین هیدرولیز نشده (۵۰mg/ml)	پروتئین هیدرولیز شده (۱۰mg/ml)	پروتئین هیدرولیز شده (۲۰mg/ml)	پروتئین هیدرولیز شده (۳۰mg/ml)	پروتئین هیدرولیز شده (۴۰mg/ml)	پروتئین هیدرولیز شده (۵۰mg/ml)	ویتامین ث (۳۰mg/ml)	ویتامین ث (۵۰mg/ml)
مهار رادیکال DPPH(٪)	۱۹/۰۶±۲/۸۵h	۳۱/۲۰±۱/۷۰f	۳۸/۷۲±۰/۷۷e	۴۰/۰۷±۰/۸۹e	۴۴/۸۷±۰/۹۱d	۵۰/۹۹±۱/۲۹c	۶۰/۴۰±۱/۰۵b	۷۰/۶۴±۱/۰۵a
مهار رادیکال هیدروکسیل (٪)	۱۳/۵۱±۱/۰۸g	۳۴/۲۰±۱/۶۰f	۵۰/۸۵±۱/۲۵e	۶۱/۵۸±۲/۴d	۶۹/۴۹±۱/۹۸c	۷۰/۳۱±۱/۶۶c	۷۳/۹±۴/۰۲b	۸۸/۴۰±۴/۰۲a
شلاته‌کنندگی یون آهن (٪)	۲۳/۸۵±۴/۰۲e	۴۵/۱۳±۲/۱۳d	۵۱/۱۶±۰/۸۰c	۵۵/۸۰±۱/۱۸b	۷۱/۹۲±۰/۸۸a	۶۹/۰۶±۱/۳۴a	۶۴/۸±۱/۹۱d	۷۹/۰۳±۱/۹۱bc

میانگین‌های با حروف مشابه در هر ستون نشان از عدم تفاوت معنی‌دار در سطح $p<0/05$ می‌باشد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل: فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین قبل از هیدرولیز ۱۳/۵۱ درصد بود و پس از آن در غلظت (mg/ml) ۱۰ به ۳۴/۲۰ درصد افزایش یافت (جدول۵). آنالیز آماری نتایج نشان داد که هیدرولیز به میزان قابل توجهی منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین شده است ($p<0/05$). فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده با افزایش غلظت به میزان قابل توجهی افزایش یافت، به‌طوریکه در غلظت (mg/ml) ۵۰، به میزان ۷۰/۳۱ درصد رسید اما این میزان کمتر از فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل توسط ویتامین ث بود.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: در بین نمونه‌ها، پروتئین هیدرولیز نشده دارای کمترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بود و فرآیند هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه در فعالیت پروتئین گشت (شکل۳). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله با افزایش غلظت تا میزان (mg/ml) ۴۰ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و پس از آن افزایش بیشتر غلظت تأثیر قابل توجهی نداشت ($p<0/05$). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده در تمامی غلظت‌ها کمتر از ویتامین ث بود.

• بحث

تأثیر زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن: آهن، با تسریع شکست هیدروپراکسیدها در مواد غذایی مستعد اکسیداسیون به‌عنوان یک پراکسیدان عمل کرده و منجر به تسریع اکسیداسیون مواد غذایی می‌گردد. در این پژوهش، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۷۰ دقیقه منجر به افزایش قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله گشت. این نتایج موافق با یافته‌های Klompong و همکاران (۲۲) و Jamdar و همکاران (۱۶) بود که به ترتیب با پیشرفت هیدرولیز پروتئین ماهی *Selaroides leptolepis* و بادام زمینی افزایش قدرت شلاته-کنندگی را گزارش کردند. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا تا ۲ درصد، قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن افزایش یافت. مقصودلو و همکاران (۲۳) با هیدرولیز پروتئین گرده گل بیان کردند که غلظت آنزیم اثر معنی‌داری بر قدرت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده نداشت و بهترین شرایط در جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با بیشترین قدرت شلاته‌کنندگی آهن، را زمان هیدرولیز کوتاه و غلظت کم آنزیم دانستند آنها علت این امر را تولید پپتیدهای کوتاه با قابلیت اندک در به‌دام اندازی یون‌های فلزی دانستند که با یافته‌های این پژوهش مطابقت نداشت. این امر می‌تواند به این دلیل باشد که قابلیت پروتئین‌های هیدرولیز شده در شلاته کنندگی یون آهن، به ماهیت پروتئین اولیه، نوع آنزیم به کار رفته و میزان درجه‌ی هیدرولیز بستگی دارد (۲۴).

تأثیر زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیاءکنندگی: آزمون قدرت احیاءکنندگی، توانایی الکترون-دهندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز را در برابر رادیکال‌های آزاد نشان می‌دهد (۲۵). در این پژوهش با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، از قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده کاسته شد. Je و همکاران (۲۶) با هیدرولیز پروتئین‌های ضایعات ماهی گزارش کردند که با افزایش میزان آنزیم قدرت احیاءکنندگی افزایش یافت که با نتایج این پژوهش مطابقت نداشت، قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به نوع پروتئین اولیه و نوع آنزیم و پپتیدهای دهنده‌ی الکترون وابسته است چرا که شکستن پیوند از نقاط مختلف پروتئین منجر به تولید پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی متفاوت می‌گردد (۲۷). بنابراین در این پژوهش افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا منجر به کاهش میزان آزادسازی پپتیدهای دهنده‌ی الکترون شده و در نتیجه از قدرت احیاءکنندگی به‌میزان قابل ملاحظه‌ای کاسته شده است. با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله افزایش یافت. افزایش زمان هیدرولیز می‌تواند منجر به افزایش رهایش پپتیدهای دهنده‌ی الکترون شود و در نتیجه قدرت احیاء-کنندگی افزایش یابد. این نتایج موافق با یافته‌های Khantaphant و همکاران (۲۵) بود که با هیدرولیز پروتئین گوشت ماهی گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز همراه با افزایش درجه‌ی هیدرولیز منجر به افزایش قدرت احیاء-کنندگی پپتیدهای حاصل گردید. با افزایش دمای هیدرولیز تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد، قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت، که مطابق با یافته‌های شعبانپور و همکاران (۲۸) بود که با هیدرولیز پروتئین میگو با آنزیم فلاورزیم، افزایش قدرت احیاءکنندگی را با افزایش دما در زمان ثابت گزارش کردند.

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی

قدرت احیاءکنندگی یون آهن: آزمون قدرت احیاءکنندگی برای ارزیابی قدرت الکترون‌دهندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدان به‌کار می‌رود (۱۷). علت افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین دانه‌ی شنبلیله را پس از فرآیند هیدرولیز با آنزیم آلکالاز، می-توان به رها شدن آمینواسیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

مانند لیزین و تریپتوفان نسبت داد (۱۶). افزایش غلظت منجر به افزایش معنی‌داری در قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده شد. تحقیقات مختلفی از جمله Zhu و همکاران (۲۹) و Bougatef و همکاران (۳۰) نیز بیان کردند که قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی جوانه‌ی گندم و ماهی با افزایش غلظت افزایش می‌یابد، علت این امر می‌تواند افزایش میزان پروتئین‌های دهنده‌ی الکترون باشد.

قدرت شلاته کنندگی یون آهن: در واکنش‌های اکسیداسیون یون Fe^{2+}، به‌عنوان یک کاتالیزور عمل کرده و منجر به تسریع تبدیل آنیون سوپراکسید به رادیکال‌های خطرناک‌تر هیدروکسیل می گردد. رادیکال‌های هیدروکسیل به سرعت با مولکول‌های زیستی واکنش داده و منجر به آسیب بافت‌ها و سلول‌ها می‌گردند (۳۱). قدرت شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز بیشتر از پروتئین هیدرولیز نشده بود، در واقع آنزیم آلکالاز توانسته به‌عنوان یک اندوپپتیداز پپتیدهایی با زنجیره‌ی جانبی متفاوت و با قابلیت به دام‌اندازی فلزات تولید کند. نتایج حاکی از تأثیر قابل توجه غلظت بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بود. Xie و همکاران (۳۲) و Zhu و همکاران (۲۹) نیز به‌ترتیب روند افزایشی فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده برگ آلفالفا و جوانه‌ی گندم را با افزایش غلظت گزارش کردند.

قدرت مهار رادیکال DPPH: رادیکال آنیونی DPPH، در ۵۱۷ نانومتر حداکثر جذب را دارد اما هنگامی که با یک ترکیب دهنده‌ی پروتون مواجه می‌شود میزان جذب آن کاهش می‌یابد. قدرت مهار رادیکال DPPH، پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله بیشتر از پروتئین هیدرولیز نشده بود. قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به ترکیب آنها وابسته است، به‌طور مثال تری‌پپتیدهایی که دارای لیزین یا تریپتوفان در انتهای C هستند قدرت مهار رادیکال DPPH آنها بسیار زیاد می‌باشد، هم‌چنین توالی‌های متفاوت از آمینواسیدها منجر به ایجاد قدرت آنتی‌اکسیدانی متفاوت می‌گردد (۳۳). نتایج این پژوهش موافق با یافته‌های Cumby و همکاران (۹) و Chi و همکاران (۱۹)، بود که به‌ترتیب قدرت مهار رادیکال DPPH، پروتئین هیدرولیز شده‌ی کانولا و پروتئین جاندار دریایی blood clam را وابسته به غلظت گزارش کردند، آنها بیان کردند که افزایش غلظت منجر به افزایش قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده گردیده است.

فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل: رادیکال‌های فعال اکسیژن ناپایدار بوده و به‌سرعت با سایر ترکیبات موجود در بدن واکنش می‌دهند و منجر به آسیب سلول‌ها و بیماری‌های گوناگون می‌گردند. در میان رادیکال‌های اکسیژن رادیکال هیدروکسیل واکنش‌پذیرتر بوده و به مولکول‌های زیستی گوناگونی مانند پروتئین‌ها، DNA و نوکلیئیک اسیدها صدمه می‌زند (۳۴). بنابراین مهار رادیکال هیدروکسیل از مهم‌ترین مکانیسم‌های دفاعی بدن در برابر بیماری‌های مختلف می‌باشد. در این پژوهش، فرآیند هیدرولیز به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل شد، که مشابه یافته‌های Chen و همکاران (۳۵) بود که بیان کردند افزایش زمان هیدرولیز پروتئین سفیده تخم مرغ منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل شد. هیدرولیز منجر به افزایش آمینواسیدها و گروه‌های فعال می‌گردد در نتیجه فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌ها افزایش می‌یابد، همچنین ثابت شده است که آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با دارا بودن خاصیت پروتون دهندگی به رادیکال‌های آزاد فعالیت ضد اکسایشی در سیستم‌های غذایی از خود نشان می‌دهند (۳۵). نتایج این پژوهش مشابه یافته‌های Xie و همکاران (۳۲) و Chi و همکاران (۱۹) بود، که به‌ترتیب فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی برگ آلفالفا و جاندار دریایی blood clam را وابسته به غلظت گزارش کردند.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ارزیابی فسفومولیبدن یک روش کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشد و بر مبنای احیاء مولیبدن۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. بیشتر بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله نسبت به پروتئین اولیه، نشان می‌دهد که آنزیم آلکالاز با شکستن زنجیره‌ی پروتئینی توانسته پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است (۳۶). در این پژوهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل وابسته به غلظت بود که در تطابق با یافته‌های Bougatef و همکاران (۳۰) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی بود.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی شنبلیله با استفاده از آنزیم آلکالاز جهت دستیابی به بیشترین قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن و احیاءکنندگی، توسط روش سطح پاسخ صورت گرفت. نتایج نشان دادند که

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر دما، زمان و غلظت آنزیم می‌باشند. به‌طورکلی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به نوع آنزیم مورد استفاده، ترکیب پروتئین اولیه و شرایط هیدرولیز وابسته است. ارزیابی تأثیر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاکی از این بود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر غلظت می‌باشد. فرآیند هیدرولیز به‌میزان قابل ملاحظه‌ای منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین اولیه شد، بنابراین پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل قابلیت رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی را دارند. در نتیجه می‌توان با بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پپتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشینه تولید کرد که قابلیت استفاده در صنعت مواد غذایی و دارویی را دارا هستند.

• References

1. Vajragupta O, Boonchoong P, Wongkrajang Y. Comparative quantitative structure–activity study of radical scavengers. Bioorganic & medicinal chemistry. 2000 Nov 1; 8(11):2617-28.
2. Park PJ, Jung WK, Nam KS, Shahidi F, Kim SK. Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. Journal of the American Oil Chemists' Society. 2001 Jun 1; 78(6):651-6.
3. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 2010 Oct 1; 31(10):1949-56.
4. Sun J, He H, Xie BJ. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom Ganoderma lucidum. Journal of agricultural and food chemistry. 2004 Oct 20;52(21):6646-52.
5. Jia J, Ma H, Zhao W, Wang Z, Tian W, Luo L, He R. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chemistry. 2010 Mar 1; 119(1):336-42.
6. Hernandez-Ledesma B, Quiros A, Amigo L, Recio I. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. International Dairy Journal. 2007 Jan 1; 17(1):42-9.
7. Sakanaka S, Tachibana Y, Ishihara N, Juneja LR. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. Food Chemistry. 2004 Jun 1; 86(1):99-103.
8. Gibbs F, Kermasha S, Inteaz A, Catherine N. Mulligan B. Encapsulation in the food industry: a review. International journal of food sciences and nutrition. 1999 Jan 1; 50(3):213-24.
9. Cumby N, Zhong Y, Naczk M, Shahidi F. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry. 2008 Jul 1; 109(1):144-8.
10. Matthäus B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2002 Jun 5; 50(12):3444-52.
11. Moore TR, Catalano P. Diabetes in pregnancy. Maternal-fetal medicine: principles and practice. 5th ed. Philadelphia: Saunders. 2004:1023-61.
12. Modarresi M, Mehdi B. Effect of Fenugreek Hydro alcoholic Extract on Balb / C Material Reproduction Physiology. *Journal of Medicinal Plant*. 2011; 4, 267-261. [in Persian].
13. Feyzi S, Varidi M, Zare F, Varidi MJ. 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. 2018 Mar; 98(5):1880-8.
14. Horwitz W. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists; 2000.
15. Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: a review of emulsifying and biological functionalities. Journal of Food Engineering. 2014 Feb 1; 122:15-27.
16. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chemistry. 2010 Jul 1; 121(1):178-84.
17. Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food chemistry. 2007 Jan 1; 105(1):57-64.
18. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976 May 7; 72(1-2):248-54.
19. Chi CF, Hu FY, Wang B, Li T, Ding GF. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (Tegillarca granosa) muscle. Journal of Functional Foods. 2015 May 1; 15:301-13.
20. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. Analytical biochemistry. 1999 May 1; 269(2):337-41.
21. Meshkinfar N, Sadeghi Mahoonak A., Ziaiifar AM, Ghorbani M, Kashani Nejad M. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. Tabriz, Journal of Food Researches. 2014; 24(2): 215-225. [in Persian].
22. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

enzyme type. Food chemistry. 2007 Jan 1; 102(4):1317-27.

23. Maghsudlou A, Sadeghi Mahoonak A, Mohebbodini H. Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen. Food Science and Technology. 2017; 13 (73), 227-240. [in Persian].

24. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. Int Dairy J 2006; 16:1306–14.

25. Khantaphant S, Benjakul S, Ghomi MR. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (Lutjanus vitta). LWT-Food Science and Technology. 2011 May 1; 44(4):1139-48.

26. Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International. 2009 Nov 1; 42(9):1266-72.

27. Bamdad F, Wu J, Chen L. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. Journal of Cereal Science. 2011 Jul 1; 54(1):20-8.

28. Sha'banpour B, Kurdjazi M, Nazari M, Esmaeili Kharaki M. 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. 2017; 62 (14): 45-31. [in Persian].

29. Zhu K, Zhou H, Qian H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry. 2006 Jun 1; 41(6):1296-302.

30. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food chemistry. 2009 Jun 15; 114(4):1198-205.

31. Afanas' ev IB, Dcrozhko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. Biochemical pharmacology. 1989 Jun 1; 38(11):1763-9.

32. Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food chemistry. 2008 Nov 15; 111(2):370-6.

33. Saito K, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2003 Jun 4; 51(12):3668-74.

34. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of the American oil chemists' society. 1998 Feb 1; 75(2):199-212.

35. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry. 1998 Jan 19; 46(1):49-53.

36. Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. Food Chemistry. 2007 Jan 1; 102(4):1233-40.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]

Optimization of Factors Affecting the Antioxidant Activity of Fenugreek Seed's Protein Hydrolysate by Response Surface Methodology

kaveh Sh[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Ghorbani M[3], Jafari M[3], Sarabandi Kh[4]*

1- M.Sc. Student, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2-Corresponding author: Associate Prof, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com

3- Associate Prof, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Ph.D., Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received 6 Jun, 2016 **Accepted 25 Sept, 2016**

Background and Objectives: Bioactive peptides have different health benefits and functional characteristics and are produced by enzymatic hydrolysis, microbial fermentation and chemical synthesis methods. The purpose of this study was to optimize the enzymatic hydrolysis conditions of fenugreek seed protein with alcalase and to evaluate the antioxidant properties of the resulting peptides.

Materials and Methods: The hydrolysis conditions of fenugreek seed protein (temperature 20-60 °C, time 30-270 minutes, and the enzyme to substrate ratio of 0.25-3.25%) were optimized using response surface methodology (RSM) to achieve the maximum Fe^{2+} chelating activity and reducing power. The antioxidant properties of optimum treatment (DPPH radical scavenging activity, reducing power, hydroxyl radical scavenging activity, Fe^{2+} chelating activity and total antioxidant activity) at concentrations of 10-50 mg/ml were compared with the antioxidant activity of non-hydrolyzed protein and vitamin C.

Results: The optimum conditions were determined by the software as enzyme to substrate ratio of 2.32%, temperature of 47.04 °C and time of 198.21 minutes. Under these conditions, the Fe^{2+} chelating activity and reducing power were predicted to be 79.15 % and 1.29, respectively. The results showed that the maximum total antioxidant activity (1.20), hydroxyl radical scavenging activity (69.49 %) and reducing power (1.12) were achieved at the concentration of 40 (mg/ml), and the maximum DPPH radical scavenging activity (50.99 %) was obtained at the concentration of 50 (mg/ml). The maximum Fe^{2+} chelating activity (71.92%) of protein hydrolysate was 2.5 times more than the unhydrolyzed protein.

Conclusion: The results showed that enzymatic hydrolysis increased the antioxidant activity of fenugreek seed protein significantly. Fenugreek seed protein hydrolysate with its significant antioxidant properties could be used as potential functional ingredient in food formulations or pharmaceutical purposes.

Keywords: Alcalase, Antioxidant, Response surface methodology, Fenugreek, Enzymatic hydrolysis

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-11]