مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال سیزدهم، شماره 4، زمستان 1397، صفحات 50-39

جداسازی و شناسایی پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی از پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم پپسین

زهره کرمی[1]، سید هادی پیغمبردوست[2]، جواد حصاری[3]، بهروز اکبری ادرگانی[4]

1- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
2- نویسنده مسئول: استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
پست الکترونیکی: peighambardoust@tabrizu.ac.ir
3- استاد تکنولوژی مواد غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز
4- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران

تاریخ دریافت: 97/1/17 تاریخ پذیرش: 97/4/28

چکیده

سابقه و هدف: در سال‌های اخیر، علاقه زیادی به شناسایی و تشخیص پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع گیاهی نشان داده شده است. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، رایج‌ترین روش برای تولید پپتیدهای زیست فعال است. جوانه گندم یکی از مهم‌ترین فراوردههای جانبی حاصل از آسیاب گندم غنی از نظر پروتئین با ترکیب اسید آمینه مناسب می‌باشد که در این تحقیق از آن به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی جهت تولید پپتید آنتی‌اکسیدانت مورد استفاده قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه گندم با استفاده از آنزیم پپسین انجام شد. عوامل مؤثر در هیدرولیز، جهت دستیابی به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها توسط روش سطح پاسخ (RSM) بهینه سازی شدند. سپس فراکسیون‌ها در نقطه بهینه با استفاده از RP-HPLC جدا شدند و فراکسیون با بالاترین فعالیت مهار رادیکال ABTS با استفاده از LC/MS/MS شناسایی شد.

یافته‌ها: مدل ریاضی مشخص کننده ناحیه‌ای با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی منطبق با دمای 37 درجه سانتی‌گراد، زمان 270 دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا 1/58 (w/w%) بود. نتایج تعیین توالی نشان داد که پپتید خالص شده دارای توالی KELPPSDADW و وزن مولکولی 1157/54 دالتون است. این پپتید به عنوان جذب کننده رادیکال (ABTS : 86±1/1 %، DPPH : 51±1/4 %) عمل کرده است.

نتیجه‌گیری: این نتایج نشان داد که پپتید KELPPSDADW از پروتئین جوانه گندم، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی است.

واژگان کلیدی: جوانه گندم، پپتید آنتی اکسیدانت، LC/MS/MS

• مقدمه

اکسیداسیون در مواد غذایی یکی از عوامل عمده تخریب و افت کیفیت مواد غذایی است. در غذاهای چرب اکسیداسیون موجب تغییر رنگ و بو می‌شود. اکسیداسیون مواد غذایی، لیپیدها، پروتئین‌ها و چربی‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. اکسیداسیون پروتئین‌ها در مواد غذایی متاثر از اکسیداسیون لیپیدها است و در واقع محصولات حاصل از اکسیداسیون لیپیدها با پروتئین‌ها واکنش می‌دهند و موجب اکسید شدن آنها می‌شود. کربوهیدراتها نیز تحت تأثیر محصولات ناشی از اکسیداسیون لیپیدها، اما با حساسیت کمتر اکسیده می‌شوند. بنابراین اکسیداسیون چربی‌ها یکی از مهمترین دلایل افت کیفیت مواد غذایی و عامل ایجاد بو و طعم رنسید و متعاقباً کاهش ایمنی ماده غذایی است که به دلیل تشکیل ترکیبات ثانویه و بالقوه سمی است (1). علاوه بر مواد غذایی، درون بدن انسان و سایر مهره‌داران نیز رادیکال‌های آزاد بر اثر واکنش‌های طبیعی ناشی از تنفس تشکیل می‌شوند. طی واکنش‌های طبیعی بدن، گونه‌هایی از اکسیژن فعال در بدن تولید می‌شود که در صورت تولید درمقادیر بالا و عدم مهار آنها می‌توانند باعث پدید آمدن مشکلات بزرگی در بدن انسان شوند. مقادیر زیاد رادیکال‌های فعال می‌توانند باعث تخریب سلول‌ها شده که احتمالا آغازگر بیماری‌های متعدد از جمله تصلب شرائین،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

آرتریت، دیابت و سرطان هستند (2). از این رو، جهت پیشگیری از تخریب ویتامین‌ها و حفظ رنگ و طعم مواد غذایی و همچنین کمک به سلولهای بدن در مقابله با رادیکال-های آزاد نیازمند افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به مواد غذایی وجود دارد. آنتی اکسیدان‌های سنتزی (BHA، BHT و TBHQ) مقرون به صرفه هستند و کارایی بالایی دارند اما گزارش‌ها حاکی از آن هستند که این آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌توانند سمی باشند (3، 2). در بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها به میزان قابل توجهی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی همچون پلی فنول‌ها، توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها ایزوفلون‌ها و ویتامین‌های A و C وجود دارد. اثرات آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات در آزمون‌های درون آزمایشگاهی اثبات شده است و برخی از آنها در مقیاس تجاری نیز تولید و عرضه کرده‌اند. هزینه بالای تولید و کارایی نسبتا پایین برخی از آنتی-اکسیدان‌های طبیعی همچون توکوفرول‌ها به همراه نگرانی‌های فزاینده مصرف‌کنندگان بابت ایمنی افزودنی‌های سنتزی غذایی باعث احساس نیاز به شناسایی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین و احتمالاً ایمن تر شده است (3). از این رو پژوهشگران تحقیقات خود را به بررسی امکان استفاده از سایر مولکول‌های زیستی از جمله کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و مشتقات آنها به عنوان جایگزین‌های آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و طبیعی پر هزینه سوق داده‌اند.

در حال حاضر پپتیدهای زیست فعال با اقبال روزافزونی برای استفاده در فرمولاسیون مواد غذایی فراسودمند مواجه هستند. تاکنون پروتئین‌ها و پپتیدهای به‌دست آمده از شیر بیشتر از سایر منابع برای تولید مواد غذایی فراسودمند مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (4). Calpis و Evolus دو نوع شیر تخمیری حاوی پپتیدهای ضد فشار خون والین پرولاین پرولاین و ایزولوسین پرولاین پرولاین هستند که به ترتیب در ژاپن و فنلاند تولید شده‌اند (5)

در این میان تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی به عنوان نسل جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بسیار مورد توجه واقع شده است. در سال‌های اخیر، توجه بیش‌تری به پروتئین‌های گیاهی به عنوان جایگزین‌های جدید و منابع ارزان قیمت پروتئین با کیفیت بالا شده است. اغلب پروتئین‌های گیاهی به دلیل فقدان اسیدهای آمینه ضروری، کامل نیستند، اما پروتئین جوانه گندم دارای اسیدهای آمینه ضروری بوده و از این رو هم ردیف پروتئین‌های حیوانی با ارزش مانند گوشت یا تخم مرغ طبقه بندی می‌شود (6). به منظور ارزش افزایی برای این محصول که از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوان است و به علت غنی بودن این ماده از نظر پروتئین با ترکیب اسید آمینه مناسب، در این تحقیق از آن به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

جوانه گندم از کارخانه آرد تابان (تهران) تهیه شد. مواد مورد استفاده در این پژوهش، شامل آنزیم پپسین (EC 3.4.23.1)، DPPH، ABTS، کلرید آهن ($FeCl_2$)، تری کلوراستیک اسید، اتانول، فروزین، استونیتریل از شرکت‌های سیگما و مرک آلمان خریداری شدند.

آماده سازی آرد جوانه گندم فاقد چربی: جوانه گندم پس از تمیز شدن به منظور غیر فعال سازی آنزیمهای آن تحت دمای 105 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت 8 ساعت توسط n-هگزان چربی زدایی شد و در دمای اتاق خشک شد. جوانه گندم فاقد چربی با استفاده آسیاب چکشی آزمایشگاهی آسیاب شد. آرد جوانه گندم پس از غربال شدن با مش 70، در دمای 4 درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (7).

آماده‌سازی ایزوله پروتئین از جوانه گندم: آرد جوانه گندم فاقد چربی در محلول Nacl 1 mol/L (1:8 w/v) در دمای محیط برای 30 دقیقه همزده شد و سپس pH آن روی 9/5 با استفاده NaOH 1 mol/L تنظیم شد. بعد از 30 دقیقه همزدن، سوسپانسیون در 800rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی در pH 4 با استفاده از Hcl (1mol/L) جهت رسوب پروتئین‌ها تنظیم شد و دوباره در 800 rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ شد. رسوبات چندین بار با آب مقطر شسته شدند و در آب مقطر حاوی NaOH (0/1 mol/L) تا pH 7 تنظیم شد. ذرات پراکنده با استفاده از خشک کن انجمادی خشک شد (7).

هیدرولیزکنسانتره پروتئینی حاصل از جوانه گندم: ابتدا یک محلول پروتئین (محلول 10% ایزوله پروتئین) با استفاده از هم زدن مداوم تهیه شده و پس از تنظیم pH بر روی میزان اپتیمم pH آنزیم پپسین در غلظت‌های تعیین شده افزوده شده و هیدرولیز در زمان‌ها و دماهای انتخابی در انکوباتورهای شیکردار انجام گرفت. در انتها واکنش آنزیمی در 90 درجه سانتیگراد به مدت 10 دقیقه متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن در 8000 g به مدت 30 دقیقه انجام شده و سوپرناتانت پس از جمع آوری با خشک کن انجمادی خشک شد (7)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH: روش آزمایش به این صورت بود که 500 میکرولیتر از نمونه با 125 میکرولیتر از محلول اتانولی DPPH (Free Radical scavenging activity) (با غلظت 0/02 درصد) و 500 میکرولیتر اتانول 99/5 درصد مخلوط گردیده و به شدت هم زده شد. لوله‌های آزمایش به مدت 30 دقیقه در محل تاریک قرار گرفتند. بعد از این مدت میزان جذب در طول موج 517 نانومتر قرائت شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل، آب مقطر جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید (8) :

$$\text{مهار رادیکال‌های آزاد (\%)} = \frac{AC-AS}{AC}$$

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

ارزیابی میزان مهار رادیکال‌های آزاد ABTS: در این آزمون ابتدا یک محلول استوک ABTS (7 میلی‌مولار) در یک محلول 2/45 میلی‌مولار پرسولفات پتاسیم تهیه شد. مخلوط حاصل به مدت حداقل 16 ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول ABTS به نسبت 1به 89 با محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط شد. میزان جذب این محلول در 734 نانومتر 0/02 ±0/70 بود. 20 میکرولیتر از نمونه‌ها با 980 میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط کرده و پس از 6 دقیقه جذب نمونه‌ها در طول موج 734 نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل، محلول PBS جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های ABTS توسط نمونه با معادله بخش قبلی محاسبه گردید (9).

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (Total antioxidant capacity): 0/1 میلی لیتر از نمونه با 1 میلی‌لیتر از معرف (اسید سولفوریک 0/6 مولار، فسفات سدیم 28 میلی مولار و آمونیوم مولیبدات 4 میلی مولار) در لوله آزمایش مخلوط شد و به مدت 1/5 ساعت در حمام آب با دمای $90C^o$ قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه‌ها در طول موج 695 نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به جای عصاره از 0/1 میلی‌لیتر متانول استفاده شد. نحوه آماده‌سازی معرف به این صورت بود که پس از آماده‌سازی محلول اسید سولفوریک 0/6 مولار، مقادیر محاسبه شده از فسفات سدیم و آمونیوم مولیبدات برای رسیدن به غلظت مورد نظر در یک لیتر معرف، به صورت جداگانه در اسید سولفوریک حل شدند. سپس این دو محلول با هم ادغام و مخلوط حاصله با باقی مانده اسید سولفوریک به حجم یک لیتر رسانده شد (8).

بررسی خاصیت شلاته کنندگی یون فرو: به این منظور 3 میلی‌لیتر نمونه با 0/1 میلی‌لیتر از محلول کلرید آهن II (2 میلی‌مولار) و 0/2 میلی‌لیتر فروزین (5 میلی‌مولار) مخلوط گردید و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در انتها جذب درطول موج 562 نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل به جای نمونه پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی از رابطه زیر به دست آمد (10).

درصد شلاته کنندگی =(جذب کنترل / جذب نمونه – جذب کنترل) x 100

بهینه‌سازی فرآیند جهت دستیابی به تیمار با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی: به منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ (Response surface methodology) و طرح مرکب مرکزی (Central composite designs) برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم به سوبسترا (E/S)، دما و زمان هیرولیز در سه سطح استفاده شد. پاسخ‌های مورد بررسی خاصیت مهار رادیکال DPPH، ABTS ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و ظرفیت شلاته‌کنندگی فلزات بود. به این منظور برای هر آنزیم 20 تیمار تصادفی با در نظر گرفتن شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم افزار پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول 1 نشان داده شده است.

جدول 1. سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم

متغیرهای مستقل		حدود تغییرات	
دمای هیدرولیز (پپسین) ^oC	30	35	40
E/S (%) (w/w)	0/5	1/25	2
زمان هیدرولیز (ساعت)	2	3/5	5

بررسی محتوای اسیدآمینه: 120 میلی‌گرم از نمونه‌های WGPH خشک شده به روش انجمادی، توسط اسید کلریدریک 6 مولار به مدت 24 ساعت در دمای 110℃ هیدرولیز شدند. آنالیز اسیدهای آمینه بر اساس 18 محلول استاندارد انجام گرفت. استانداردها در محلول اسید هیدروکلریک 0/1 میلی مولار آماده شدند و غلظت های 5-0/5 میلی مولار برای محاسبه مقادیر آمینو اسیدها تهیه شدند. جداسازی کروماتوگرامی با ستون تجزیه‌ای (C_{18}، 4 mm، 100 mm، 5 µm)، در دمای 50 درجه سانتی‌گراد انجام شد. فاز متحرک شامل مخلوط لیتیم سیترات (42/6 میلی مولار) و فنول (10/6 میلی مولار) در pH 2/8 با سرعت جریان 0/4 میلی‌لیتر بر دقیقه بود. مشتق سازی آمینو اسیدها با استفاده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

مخلوط نینهیدرین (0/11 مولار) و هیدرینـدانتین (2/5 میلـی مولار) در DMSO و لیتیم استات (2 مولار، pH=5/2) با میزان جریان 0/2 میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شـد. دمـا در 120 درجـه سانتی‌گراد تنظیم شد. آنالیزها در طول موج 570 نانومتر انجام شد و با استفاده از Metrohm manager software (Version 2.3 IC net) داده‌ها فرآیند شدند.

آماده‌سازی هیدرولیز شده‌های پروتئینی جهت خـالص سازی اجزاء پپتیدی: 4 گرم نمونه هیدرولیز شده پروتئینـی (به دست آمده در شرایط اپتیمم هیدرولیز) که قـبلا لیـوفیلیز شده بود در 20 میلی لیتر اسید هیدروکلریک 0/01 نرمال حل شد و به مدت 8 دقیقـه در اسـتوماکر همـوژن گردیـد. سـپس نمونه هموژن شده سانتریفیوژ شد (12000 x g) به مـدت 20 دقیقه) و به منظور پروتئین زدایی، فاز روماند با سه برابر حجم خود با اتانول مطلق مخلوط شـد و بـه مـدت 20 سـاعت در 4 درجـه سـانتی گـراد نگهـداری شـد. سـپس نمونـه مجـدداً سانتریفیوژ شد و پس از تبخیر اتانول، لیوفیلیز شـد. در نهایـت عصاره پروتئین زدایی شده خشک شده در 15 میلی لیتر اسید عیدروکلریک 0/01 نرمال حل شـد و پـس از صـاف شـدن بـا فیلتر غشایی 0/45 میکرومتر در فریزر 20- درجه سانتی‌گـراد نگهداری شدند (11).

خالص‌سازی و جزء به جزء سـازی مخلـوط پپتیـدها بـا RP-HPLC: با استفاده از HPLC فاز معکـوس (Shimadzu, Japan) اجزاء پپتیدی بر مبنای میزان آبگریزی نسبی تفکیـک و خالص شدند. سـتون مـورد اسـتفاده C_{18} (250×21.2 mm, 10µm) (Phenomenex, Jupiter, CA) بـود فـاز متحـرک متشکل از فاز A (تری فلوئورو اسـتیک اسـید (TFA) 0/1% در آب دو بار تقطیر و فاز B کـه حـاوی TFA (0/1%) در مخلـوط استونیتریل با آب دیونیزه بود. فاز متحرک به صورت گرادیـانی (0 تا 60% فاز B در طول 30 دقیقه) و با سرعت 25 میلی‌لیتـر در دقیقه جریان داشت. حجم تزریق 10 میلی‌لیتر بود کـه بـه صورت دستی تزریق گردید. کیفیت جداسازی با انـدازه‌گیـری شدت جذب در طول موج 220 نانومتر بررسی گردیـد. مقـادیر حاصل از پیک‌های اصلی به صورت دسـتی جمـع آوری شـد و پس از لیوفیلیز شـدن در شـرایط انجمـادی نگهـداری شـدند. سپس محتویات هر بخش مجـدداً در آب دیـونیزه حـل شـد و قدرت آنتی‌اکسیدانی تمـام فراکسـیون‌هـای حاصـله بـا انجـام آزمایش‌های قدرت مهار رادیکل ABTS ارزیابی شد. در نهایـت فعال‌ترین فرکسیون‌ها شناسایی شد.

توالی‌یابی و شناسایی پپتیدها nESI-LC-MS/MS: آنـالیز طیـف سـنج جرمـی (nano-LC-MS/MS) در یـک سیسـتم Thermo Fisher) LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer Scientific, San Jose, CA, USA) مجهز بـه یـک Proxeon Easy LC انجام شد. نمونه روی یک ستون (100 µm × 2cm, NanoTrap (C18, 5 µm, 100 A تزریق شد و جداسـازی بـه وسـیله RP-LC روی سـتون C_{18} (12 cm × 75 µm, 1.9 µm particle size; NikkyoTechnos Co., Ltd. Japan) انجـام گردید و با استفاده از حـلال A (0/1 % اسـید فرمیـک در آب) به عنوان فاز متحرک با نرخ جریان 300 nL/min پیش تغلیظ گردید. پس از 3 دقیقه، گرادیان خطـی 15% حـلال B (0/1 % اسید فرمیک در استونیتریل) به کار برده شد و تـا 35% حـلال B در طول 8 دقیقه افزایش پیدا کرد. بعد از هر تیمـار، سـتون برای 10 دقیقه با حلال A (10%) شسته شد. سپس به شرایط آغاز بازگشت. شرایط عمل طیف سنج جرمـی (Ion trapping mass specterometry) به صـورت زیـر بـود: قطبیـت مثبـت، دمای مویینه 200 درجه سانتی گـراد، ولتـاژ نـانو اسـپری 2/5 کیلو ولـت، Ultramark 1621 (Thermo Fischer Scientific) برای کالیبراسیون خارجی استفاده شد.

سنتز پپتید: به منظور تأیید فعالیت پپتید خالص شده، پپتید شناسایی شده توسط روش فاز جامد (Solid phase) سنتز شد. در این روش انتهای کربوکسیلی آمینو اسید به رزین به عنـوان فـاز ثابـت (Rink Amide-Chem Matrix) متصـل شـد و بـه صورت چرخه‌ای هر بار یک آمینو اسید به انتهای آمینی اضـافه می‌شود. به گـروه α-آمینـوی آمینواسـید Fmoc (Fluorenyl methoxy carbonyl) متصل اسـت تـا از واکـنش‌هـای جـانبی ممانعت کند که توسط محلول بـازی حـذف مـی‌گـردد. گـروه کربوکسیل آمینواسید جدید که وارد چرخـه مـی‌شـود توسـط عوامل کوپل کننده HBTU فعال می‌شود پس از سـنتز کامـل پپتیـد بـرای جـدا کـردن پپتیـد از رزیـن از $TFA/H_2O/triisopropylsilane$ (95:2.5:2.5 v/v) 90 دقیقـه در دمای اتاق استفاده شد. سپس بـا اسـتفاده از دی اتیـل اتـر خنک و سانتریفیوژ ته نشین شد و لیـوفیلیز شـد. پپتیـدها بـا اسـتفاده از RP-HPLC در سـتون C_{18} (250 × 21.2 mm, 10 µm; Phenomenex, Jupiter, CA) خالص‌سازی شد و با کمک فریز درایـر خشـک گردیـد و خلـوص پپتیـدها توسـط سـتون آنـالیتیکی (4.6×50mm, 3µm) بررسـی شـد. بـا اسـتفاده از اسـپکتروفوتومتری جرمـی electrospray صـحت سـکوانس تولیدی نیز بررسی شد.

طرح آزمایش و آنالیز آماری داده‌ها و آنـالیز داده‌هـای طیف سنج جرمی و شناسایی توالی‌ها: بـه منظـور تعیـین سطوح بهینه زمان دما و غلظت آنزیم به سوبسترا روی فعالیت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

آنتی اکسیدانی هیدرولیزات به دست آمده از پروتئین جوانه گندم با استفاده از پپسین از روش RSM استفاده شد. جهت دستیابی به مدل مطلوب از طرح مرکب مرکزی با 6 تکرار در نقطه مرکزی استفاده گردید. طراحی آزمون‌ها و آنالیز آماری نتایج با استفاده از نرم افزار Design Expert نسخه 7 انجام گرفت. متغیرهای پاسخ در این بخش عبارت بودند از فعالیت مهار کنندگی DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل شلاته کنندگی فلزات. آنالیز واریانس داده‌ها نیز با نرم افزار TGraphPad Instat 3 انجام شد. آنالیز داده‌های طیف سنجی جرمی و شناسایی توالی‌ها با استفاده از نرم‌افزارهای Proteome Discoverer software suite (v1.4, Thermo Fisher Scientific) و Mascot search engine (v2.5, Matrix Science) انجام شد. از نظر پارامترهای جستجو، جستجوهای Mascot با انتخاب عدم آنزیم اختصاصی و تولرانس اندازه گیری جرم 7 پی پی ام در حال MS و 0/5 دالتون برای یون های MS/MS، شناسایی پروتئین منشاء پپتیدها با استفاده از پایگاه اطلاعات پروتئین NCBI صورت پذیرفت.

• یافته‌ها

بررسی داده‌ها توسط روش سطح پاسخ

طرح‌ریزی و به دست آوردن داده‌ها در نقاط تعیین شده: با توجه به نقاط تعریف شده در طرح RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. در جدول 2 نتایج آزمون‌های تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌ها ارائه شده است. در مرحله‌ی بعدی داده‌های به دست آمده از آزمون‌های مختلف توسط روش سطح پاسخ آنالیز گردید. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده و جدول تجزیه‌ی واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها مطابق جدول 3 می‌باشد.

جدول 2. نتایج آزمون‌ها در نقاط مشخص شده با طرح کامپوزیت مرکزی

تیمار	دما (°C)	زمان (ساعت)	نسبت آنزیم به سوبسترا (W/W)	مهار رادیکال DPPH (%)	مهار رادیکال ABTS (%)	ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (آلفا توکوفرول میکرومول/میلی لیتر)	ظرفیت شلاته کنندگی (%)
1	30	2	0/5	36/1	41/1	141/37	21
2	35	3/5	1/25	67/7	72/5	185	32
3	40	5	0/5	57	62	213/1	35
4	35	3/5	1/25	69/6	74/8	199/46	35
5	30	2	2	47/5	52	235/82	39
6	35	5	1/25	74/3	79	192/37	31
7	35	3/5	1/25	69/9	75	192/55	30
8	35	2	1/25	55/5	61	172/19	27
9	40	5	2	78/5	82/5	212/73	35/6
10	40	2	2	60/8	65	158/73	22
11	35	3/5	0/5	55/3	61	165/82	25
12	40	2	0/5	42/69	47/2	124	18
13	35	3/5	1/25	69/85	74/5	194/92	33
14	30	5	0/5	50/58	55/5	200/83	33
15	30	5	2	70/1	75/2	254/1	40
16	35	3/5	1/25	69/9	75	189	31/5
17	30	3/5	1/25	62/2	67	218/55	38
18	35	3/5	1/25	69/5	74/5	195/37	32
19	40	3/5	1/25	70/02	75	183/55	28
20	35	3/5	2	73/3	78	216/28	34

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

جدول 3. جدول تجزیه واریانس مربوط به مقادیر به دست آمده برای پاسخ‌های مختلف در طرح RSM

	درجه آزادی	مهار رادیکال DPPH (%)		مهار رادیکال ABTS (%)		ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (آلفا توکوفول میکرومول/میلی لیتر)		ظرفیت شلاته کنندگی (%)	
		ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد P	ضریب رگرسیون	عدد p
مدل	9	2489/5	0/000	2475/61	0/000	16951/2	0/000	624/31	0/000
X_1	1	783/76	0/000	737/88	0/000	5407/4	0/000	149	0/000
X_2	1	188/88	0/000	167/28	0/000	2514/1	0/000	104/9	0/001
X_3	1	772/47	0/000	772/64	0/000	5809	0/000	226/5	0/000
X_1^2	1	83/27	0/000	82/91	0/000	0/32	0/945	6/15	0/311
X_2^2	1	37/5	0/000	43/80	0/000	256/4	0/074	11/05	0/183
X_3^2	1	66/1	0/000	68/50	0/000	228/4	0/09	10/95	0/185
X_1X_2	1	9/44	0/0069	7/41	0/024	1606/3	0/000	52/02	0/011
X_1X_3	1	16/56	0/0012	16/53	0/002	727/33	0/007	25/92	0/053
X_2X_3	1	3/21	0/076	3/51	0/097	533/99	0/016	38/72	0/023
Lack of fitness	5		0/402		0/379		0/078		0/133
R^2		0/99		0/99		0/96			0/92
Adj-R^2		0/99		0/99		0/93			0/84
CV		1/45		1/52		4/19			7/5

آنالیز سطح پاسخ: آنالیز سطح پاسخ داده‌ها در جدول 3 نشان می‌دهد که روابط بین مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی و پارامترهای هیدرولیز از نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون بالا ($R^2_{DPPH}=0.99$ $R^2_{ABTS}=0.99$ ،$R^2_{TAC}=0.96$ ،$R^2_{MCA}=0.93$) می‌باشد. با توجه به نتایج جدول 3، معادلات رگرسیون استخراج شده که تأثیر متغیرهای نسبت آنزیم به سوبسترا (x_1)، دما (x_2) و زمان (x_3) بر روی مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (Y_1)، ABTS (Y_2)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (Y_3) و شلاته‌کنندگی (Y_4) را نشان می‌دهد.

$$Y_1= +69/57 +8/85x_1 +4/25x_2 +8/79x_3 +1/09x_1x_2 +1/44x_1x_3 -0/63x_2x_3 -5/5x_1^2 -3/69x_2^2 -4/90x_3^2$$

$$Y_2= +74/63 +8/59x_1 +4/09x_2 +8/79x_3 +0/96x_1x_2 +1/44x_1x_3 -0/66x_2x_3 -5/49x_1^2 -3/99x_2^2 -4/99x_3^2$$

$$Y_3= +192/19 +23/25x_1 -15/86x_2 +24/10x_3 -14/17x_1x_2 -9/53x_1x_3 +8/17x_2x_3 -0/34x_1^2 +9/66x_2^2 -9/11x_3^2$$

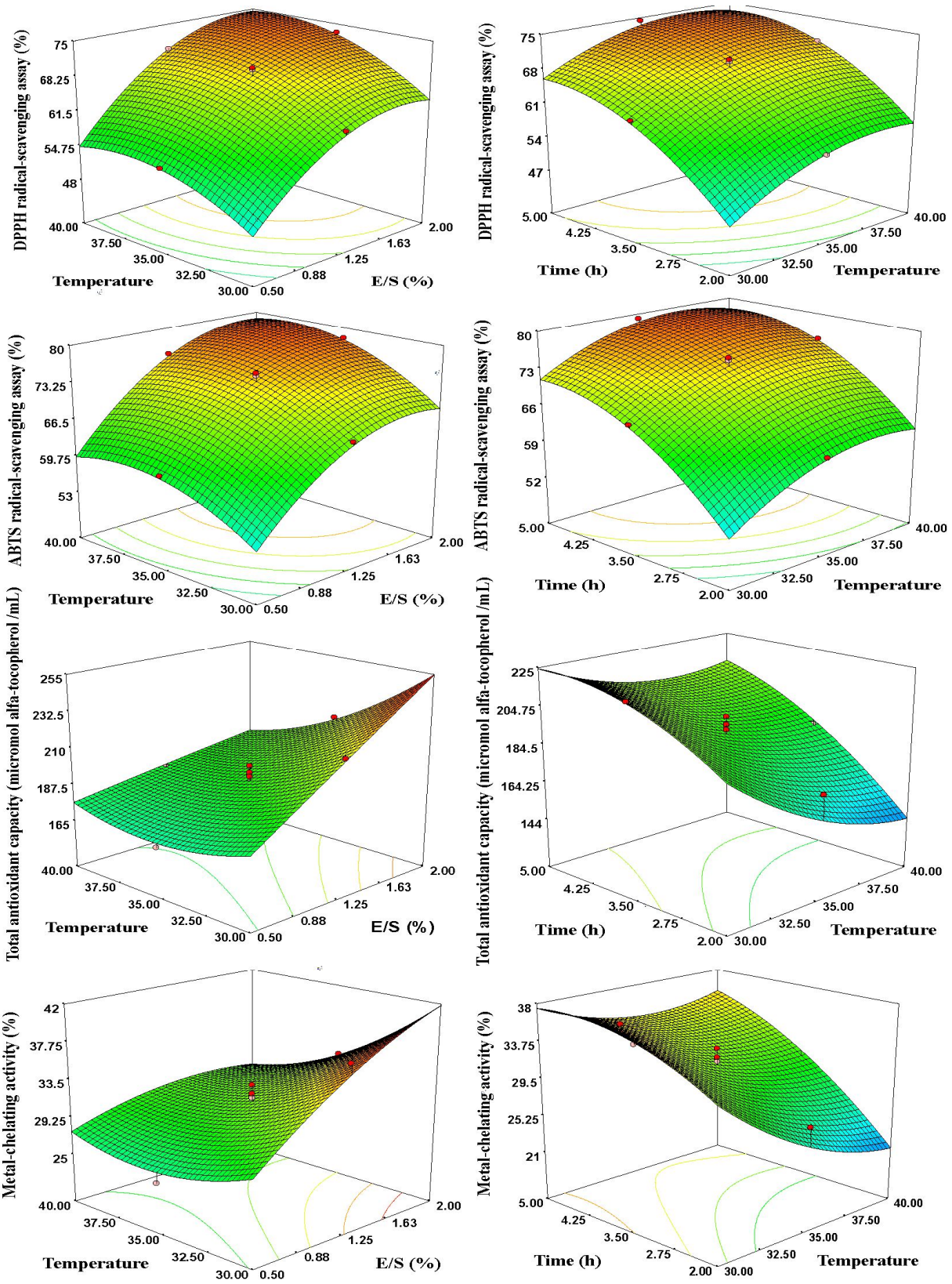
$$Y_4= +31/51 +3/86x_1 -3/245x_2 +4/76x_3 -2/55x_1x_2 -1/8x_1x_3 +2/20x_2x_3 -1/40x_1^2 +2/10x_2^2 - 1/90x_3^2$$

نمودار سه بعدی تأثیر غلظت آنزیم پپسین، دما و زمان بر مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و شلاته کنندگی در شکل 1 آورده شده است. افزایش غلظت آنزیم منجر به افزایش در قدرت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد شد به صورتی که این روند تا غلظت1/5 % شدت بیشتری داشته است. افزایش دمای هیدرولیز منجر به افزایش در این ویژگی اما با شدت اثر کمتری گردید، به طوری که بالاترین قدرت مهار کنندگی رادیکال در دمای 37 درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

نمودارهای سه بعدی مربوط به نقش غلظت آنزیم پپسین و دمای هیدرولیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان بهینه هیدرولیز در شکل 1 نشان داده شده است که با افزایش غلظت، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با شدت بیشتری افزایش پیدا می‌کند ولی با افزایش دما ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کاهش ملایمی یافته و افزایش بیشتر دما از 35تا 40 درجه سانتی‌گراد منجر به افزایش در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌شود. در مورد تأثیر زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با افزایش زمان میزان این فعالیت افزایش پیدا کرده است.

نمودار سه بعدی مربوط به تغییرات در قدرت شلاته کنندگی هیدرولیزات‌ها در اثر زمان و دمای هیدرولیز و غلظت آنزیم در شکل 1 نشان می‌دهد که با تغییر دما از30 تا 35 درجه سانتی‌گراد قابلیت شلاته کنندگی کاهش کندی یافته و با افزایش دما از 35 تا 40 درجه سانتیگراد این قابلیت دچار افزایش تدریجی شد بنابراین فعالیت شلاته کنندگی در بازه دمایی 35 تا 40 درجه سانتی‌گراد بیشترین مقدار خود را نشان داد که بیانگر این بود که در این بازه دمایی، پپتیدهای به دست آمده فعالیت شلاته کنندگی بالاتری را نشان داده‌اند و همچنین نشان داده شده است که با افزایش زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا فعالیت شلاته کنندگی افزایش پیدا کرد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]



شکل 1. نمودارهای سه بعدی تأثیر غلظت آنزیم پپسین، دمای هیدرولیز و زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌ها

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

بهینه سازی فرآیند به منظور دستیابی به تیمار با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی: بهینه‌سازی متغیرهای وابسته با استفاده از جدول 1 انجام شد و نقطه بهینه به دست آمد. میزان مطلوبیت به دست آمده در مورد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و شلاته کنندگی 99% می‌باشد. این مقادیر بهینه در دمای 37 درجه سانتی‌گراد، زمان 270 دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا 1/58 (w/w%) حاصل شده است. مقدار بهینه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS به ترتیب 76/7% و 81/6%. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل 205 میکروگرم آلفا توکفرول بر میلی‌لیتر و فعالیت شلاته کنندگی 34% به دست آمد که داده‌های پیش بینی شده با داده‌های به دست آمده از آزمایشات واقعی تفاوت معنی‌داری ($P<0/05$) نشان نداد.

بر اساس نتایج حاصل، نمونه تولید شده در دمای 37 درجه سانتیگراد، زمان هیدرولیز 270 دقیقه و غلظت آنزیم 1/58 % به عنوان نمونه بهینه تولید شده توسط پپسین از لحاظ فعالیت آنتی‌اکسیدانی جهت آزمون‌های بعدی در نظر گرفته شد.

آنالیز اسیدهای آمینه: همان‌طور که از جدول 4 مشاهده می‌شود اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک و آرژنین اسید آمینه‌های اصلی هم در هیدرولیزات و هم در ایزوله پروتئینی هستند. که در تطابق با نتایج گزارش شده از Zhu و همکاران در سال 2006 هستند (7). میزان اسیدهای آمینه آلانین، والین، پرولین و لوسین در هیدرولیزات‌ها بیشتر از ایزوله پروتئین می‌باشد و در کل هیدرولیزات اسید آمینه‌های آب گریز بیشتری را نسبت به ایزوله پروتئینی نشان می‌دهند. بنابراین هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم می‌تواند منبع مناسبی جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانت باشد.

جدول 4. آنالیز آمینو اسید هیدرولیزات جوانه گندم و ایزوله پروتئین جوانه گندم (گرم/100گرم پروتئین)

آمینو اسید	ایزوله پروتئین	هیدرولیزات
آسپارتیک اسید	9/11	8/3
گلوتامیک اسید	15/2	14/58
سرین	4/66	4/125
هیستیدین	3/05	2/756
گلیسین	6/05	5/36
ترئونین	4/12	3/84
آرژنین	9/47	6/29
آلانین	5/80	7/9
تیروزین	3/24	3/53
سیستئین	0/6	0/635
والین	6/65	6/918
متیونین	2/11	2/693
فنیل آلانین	4/89	4/841
ایزولوسین	4/20	4/546
لوسین	7/80	9/15
لیزین	7/07	5/7
پرولین	4/63	7/168
تریپتوفان	ND[a]	0/098
کل آمینواسیدهای هیدروفوبیک[b]	42/%13	48/%576

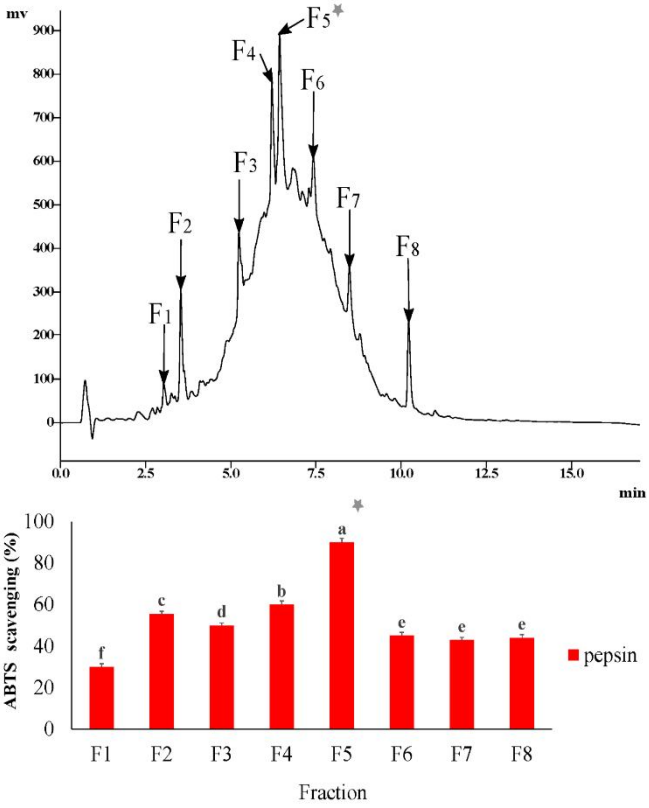
[a] not determined

[b] گلیسین، آلانین، والین، لوسین، پرولین، متیونین، فنیل‌آلانین، تریپتوفان، ایزولوسین

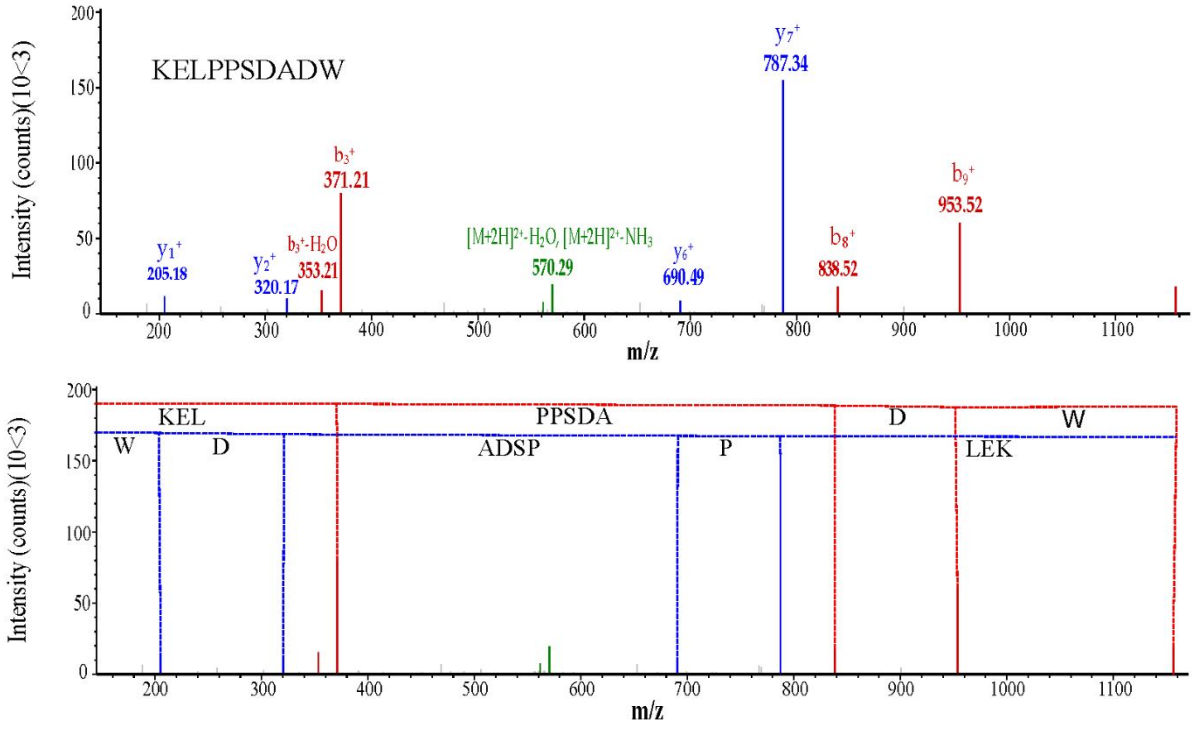
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

شناسایی پپتید بـا RP-HPLC و Q-TOFLC-MS/MS و بررسی فعالیت آنتـی اکسـیدانی پپتیـد سـنتز شـده:

هیدرولیزات به دست آمده در نقطه بهینه بـا اسـتفاده از روش RP-HPLC بـه 8 پیـک اصـلی جداسـازی شـدند (شـکل 2) فراکسیون‌ها جمع‌آوری شده با استفاده از فریـز درایـر خشـک گردیدند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون‌هـا مـورد ارزیـابی قرار گرفت. فعال‌ترین فرکسیون تعیین شد و نتایج مربـوط بـه جداسازی با RP-HPLC و فعالیت آنتی‌اکسـیدانی فراکسـیونها در شکل 2 آورده شده است. محدوده فعالیت به دست آمـده از 20 تـا 90% متغیـر بـود کـه بیشـترین فعالیـت مربـوط بـه فراکسیون جریان یافته شماره 5 (F_5) بـود. در پایـان خـالص-سازی با HPLC، فعال‌ترین فرکسیون (F_5) به صورت جداگانـه جمـع آوری و خشـک شـدند و جهـت انجـام آنـالیز بعـدی (شناسایی پپتیدهای موجود در هر فرکسـیون و تعیـین تـوالی آمینواسیدی آنها) نگهداری شـدند. شـکل 3 طیـف جرمـی دو گانه به دست آمده از پپتید شناسایی شده در F_5 را نشان می-دهد که مربوط به تـوالی KELPPSDADW بـا وزن مولکـولی 1157/54 دالتون می‌باشد. بررسی مهار رادیکال‌هـای DPPH و ABTS پپتیـد سـنتز شـده نشـان داد کـه در غلظـت 0/4 میکرومول بر میلی‌لیتر میزان مهـار رادیکـال‌هـای آزاد DPPH 1/4 ± 51 % و میزان مهار رادیکـال‌هـای ABTS 1/1 ± 86 % می‌باشد.



شکل 2. کروماتوگرام RP-HPLC هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم با آنزیم پپسین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون‌های جمع آوری شده



شکل 3. طیف اسپکتروفتومتری جرمی پپتید خالص شده و تفسیر نتایج جرمی و تعیین توالی پپتید

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

• بحث

پپتیدهای زیست فعال موجود در هیدرولیز شده‌های پروتئینی فعالیت آنتی اکسیدانی خودشان را از طریق مکانیسم‌های مختلف همچون مهار پرواکسیداسیون لیپید، مهار رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن یون‌های فلزی اعمال می‌کنند (12). اعتقاد بر این است که نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای مؤثر بر فعالیت‌های بیولوژیکی به شمار می‌روند (13) و نتایج این تحقیق نشان داد که شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم تأثیر گذار می‌باشد. به منظور تولید پپتیدهای ضداکسایش در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها، آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره پروتئینی باشد. متغیرهای مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی مؤثرند (14). بنابراین ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آنها ارائه می‌دهد .

تفاوت قدرت احیا کنندگی، شلاته کنندگی و مهارکنندگی رادیکال‌ها بین هیدرولیز شده‌ها را می‌توان به دلیل حضور پپتیدهای خاص با توالی آمینواسیدی خاص و وزن مولکولی معین دانست. برای مثال گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با وزن مولکولی 1500 – 500 دالتون قوی‌تر از پپتیدها با وزن مولکولی بالاتر از وزن مولکولی 1500 و پپتیدهای پایین تر از 500 دالتون می‌باشد (15). همچنین گزارش شده است که حضور اسیدهای آمینه هیدروفوب (آروماتیک یا شاخه‌دار) در توالی پپتید و حضور یکی یا تعداد بیشتری از باقی مانده‌های هیستیدین، پرولین، سیستئین، تیروزین، تریپتوفان، فنیل آلانین یا متیونین احتمالا فعالیت آنتی‌اکسیدانی را افزایش می‌دهد (16).

کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های هیدرولیز شده در مراحل اولیه هیدرولیز را می‌توان به کم بودن فرصت آنزیم برای اثر گذاری بر سوبسترا و تولید پپتیدهای با قابلیت آنتی‌اکسیدانی نسبت داد (17). با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد. برطبق گزارشLahart و همکاران (18) در مورد هیدرولیز کازئین، با پیشرفت هیدرولیز، وزن مولکولی هیدرولیز شده‌های حاصل کاهش یافت و هیدرولیز شده‌هایی با وزن مولکولی کمتر فعالیت ضداکسایش قویتری بروز دادند. از سوی دیگر ثابت شده است که آمینواسیدهای آزاد نسبت به پپتیدها خصوصیات عملکردی پایین‌تری دارند. بنابراین انتخاب زمان مناسب هیدرولیز باعث شده است تا نسبت پپتیدها به آمینواسیدهای آزاد بیشتر باشد (19). با توجه به نتایج گزارش شده می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً میزان تولید چنین پپتیدهایی در غلظت 1/5 %، دمای 37 درجه سانتی‌گراد و زمان 270 دقیقه در حد بهینه بوده است و همچنین در این شرایط ممکن است در دسترس بودن مکانهای فعال و آمینواسیدهای مؤثر مانند پرولین، لوسین، آلانین، تریپتوفان و فنیل آلانین، آمینواسیدهای اسیدی مانند آسپارتیک اسید و گلوتامیک اسید و آمینواسیدهای بازی مانند لایزین که قادر به واکنش دادن با رادیکال و مهار آن می‌باشند افزایش یافته است. Li و همکاران (20)، Tang و همکاران (17) مشاهده نمودند که بخشی از هیدرولیز شده‌ها و فراکسیون‌های پپتیدی نخود و گندم سیاه که دارای بالاترین خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بودند حاوی غلظت‌های بالاتری از آمینواسیدهای هیدروفوب بودند. آنها گزارش کردند که افزایش نسبت آمینواسیدهای آروماتیک در هیدرولیز شده-های پروتئینی می‌تواند تأثیر مثبتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. بویژه در مورد تریپتوفان و فنیل آلانین گفته شده است که نقش مهمی در فعالیت بلوکه کنندگی رادیکال‌ها دارد که احتمالاً به دلیل نقش الکترون دهندگی آن است (21). پپتید شناسایی شده از فراکسیون 5 با بالاترین فعالیت آنتی-اکسیدانی حضور باقیمانده آمینواسیدهای موثر (تریپتوفان، پرولین و لوسین) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را آشکار ساخت و همچنین وزن مولکولی پپتید شناسایی شده با وزن مولکولی پپتیدهای موثر بر فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده مطابقت دارد. گزارش شده است که وجود اسید آمینه تریپتوفان در بروز اثرات مهار کنندگی رادیکال DPPH در هیدرولیز شده‌های حاصل از آب پنیر، کازئین و پروتئین شیر انسان و گاو مؤثر است (22).

توسعه‌ی ترکیبات آنتی‌اکسیدانت از منابع طبیعی در علوم زیستی و غذایی مهم است. در این تحقیق، یک پپتید آنتی-اکسیدانت از پروتئین جوانه گندم با هضم آنزیم پپسین شناسایی شد. پپتید آنتی‌اکسیدانت KELPPSDADW با قدرت بالای جذب رادیکال‌های آزاد می‌تواند نویددهنده‌ی آنتی‌اکسیدانت برای مکمل‌های غذایی باشد.

سپاسگزاری

این مقاله، حاصل پایان نامه دکتری است که در سال 1394 در دانشگاه تبریز به تصویب رسیده و با حمایت مرکز

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

آزمایشگاههای مرجع کنترل غذا و داروی استان تهران و دانشگاه Pompeu Fabra در کشور اسپانیا اجرا شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از ریاست آزمایشگاه‌های کنترل و غذا و دارو و پرفسور David Andreu که در جهت فراهم آوردن امکانات این مطالعه همکاری لازم را مبذول داشتند، کمال تشکر و قدردانی را دارند.

• References

1. Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J. Funct. Foods. 2011;3(4):229-54.
2. Sarmadi BH, Ismail A. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 2010;31(10):1949-56.
3. Moure A, Cruz JM, Franco D, Domínguez JM, Sineiro J, Domínguez H, et al. Natural antioxidants from residual sources. Food Chem. 2001;72(2):145-71.
4. Sharma S, Singh R, Rana S. Review Article Bioactive Peptides: A Review 2012. 223 p.
5. Korhonen H, Pihlanto A. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: production and functionality. Int Dairy J. 16, 945-9602006. 945-60 p.
6. Jia J, Ma H, Zhao W, Wang Z, Tian W, Luo L, et al. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chem. 2010;119(1):336-42.
7. Zhu K, Zhou H, Qian H. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochem. 2006;41(6):1296-302.
8. 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 Chem. 2009;114(4):1198-205.
9. Memarpoor-Yazdi M, Asoodeh A, Chamani J. A novel antioxidant and antimicrobial peptide from hen egg white lysozyme hydrolysates. J Funct Foods. 2012;4(1):278-86.
10. Zhuang H, Tang N, Yuan Y. Purification and identification of antioxidant peptides from corn gluten meal. J Funct Foods. 2013;5(4):1810-21.
11. Escudero E, Aristoy MC, Nishimura H, Arihara K, Toldra F. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. Meat sci. 2012;91(3):306-11.
12. Correa AP, Daroit DJ, Coelho J, Meira SM, Lopes FC, Segalin J, et al. Antioxidant, antihypertensive and antimicrobial properties of ovine milk caseinate hydrolyzed with a microbial protease. J. Sci. Food Agric. 2011;91(12):2247-54.
13. Kamau S, Lu R-R. The Effect of Enzymes and Hydrolysis Conditions on Degree of Hydrolysis and DPPH Radical Scavenging Activity of Whey Protein Hydrolysates. Curr. Res. Dairy Sci. 2011. 25-35 p.
14. de Castro RJS, Sato HH. A response surface approach on optimization of hydrolysis parameters for the production of egg white protein hydrolysates with antioxidant activities. Biocatal Agric Biotechnol. 2015;4(1):55-62.
15. Xiu-xia L, Lu-jia H, Long-jian C. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. J. Sci. Food Agric. 2008;88(9):1660-6.
16. Ren J, Zhao M, Shi J, Wang J, Jiang Y, Cui C, et al. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. LWT. 2008;41(9):1624-32.
17. Tang C-H, Wang X-S, Yang X-Q. Enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa L.) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. Food Chem. 2009;114(4):1484-90.
18. Lahart N, O'Callaghan Y, Aherne SA, O'Sullivan D, FitzGerald RJ, O'Brien NM. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: Evaluation using the human Jurkat T cell line. Int Dairy J. 2011;21(10):777-82.
19. Ruiz-Ruiz J, DÁVila-OrtÍZ G, Chel-Guerrero L, Betancur-Ancona D. Angiotensin I-Converting Enzyme Inhibitory And Antioxidant Peptide Fractions From Hard-To-Cook Bean Enzymatic Hydrolysates**.** J. Food Biochem. 2013;37(1):26-35.
20. Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chem. 2008;106(2):444-50.
21. Power O, Jakeman P, FitzGerald RJ. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino acids. 2013;44(3):797-820.
22. Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Tryptophan-containing milk protein-derived dipeptides inhibit xanthine oxidase. Peptides. 2012;37(2):263-72.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]

Isolation and Identification of Antioxidant Peptides from Wheat Germ Protein by Pepsin Enzyme

Karami Z[1], Peighambardoust S.H[2], Hesari J[3], Akbari-Adergani B[4]*

1- PhD student, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran,

*2- *Corresponding author: Professor of Food Technology, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran. Email: peighambardoust@tabrizu.ac.ir*

3- Professor of Food Technology, Department of Food Science, College of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

4- Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

Received 6 Apr, 2018 **Accepted 19 Jul, 2018**

Background and Objectives: In recent years, there has been a growing interest to identify bioactive peptides from plant sources. Enzymatic hydrolysis of proteins is the most common method to produce bioactive peptides. Wheat germ is one of the most important by-products from flour processing industry that it is rich in protein and amino acids composition. In this study, it was used as a valuable protein source to produce antioxidant peptide.

Materials & Methods: Enzymatic hydrolysis of wheat germ was done by pepsin. The hydrolysis parameters were optimized in production of wheat germ protein hydrolysates with the highest antioxidant activity using response surface methodology. Then the hydrolysates obtained under optimized conditions were fractionated by RP-HPLC and fraction that exhibited the highest ABTS radical scavenging was identified by nano-LC/MS/MS proteomics.

Results: The mathematical model presented a plateau region with maximum antioxidant activity at the following critical values: temperature = 37□C, time = 270 min and E/S ratio=1.58%. The results of sequencing showed that the purified peptide had the sequence of KELPPSDADW with the molecular weight of 1157.54 Da. This peptide had scavenging activity against DPPH (51±1.4%) and ABTS (86±1.1%)

Conclusion: The **r**esults indicated that the peptide KELPPSDADW isolated from wheat germ protein has a strong antioxidant activity

Keywords: Wheat germ, Antioxidant peptide, LC/MS/MS

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-13]