

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

زهره کرمی¹، سید هادی پیغمبردوست²، جواد حصاری³، بهروز اکبری ادرگانی⁴

- 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: peighambaroudost@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 آنتی اکسیدانت 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 آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی 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: $86 \pm 1/1$ %، DPPH: $51 \pm 1/4$ %) عمل کرده است.

نتیجه گیری: این نتایج نشان داد که پپتید KELPPSDADW از پروتئین جوانه گندم، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی قوی است.

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

• مقدمه

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 در مقادیر 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 احتمالاً آغازگر بیماری‌های متعدد از جمله تصلب شرائین،

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 متأثر 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

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 آنتی اکسیدانی مورد استفاده قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

جوانه گندم از کارخانه آرد تابان (تهران) تهیه شد. مواد مورد استفاده در این پژوهش، شامل آنزیم پیپسین (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 سانتی گراد به مدت 20 دقیقه قرار گرفت و سپس به مدت 8 ساعت توسط pH 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 سانتی گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (7).

آماده سازی 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 سانتی گراد سانتریفیوژ شد. مایع رویی در pH 4 با استفاده از HCl (1 mol/L) جهت رسوب پروتئین‌ها تنظیم شد و دوباره در 800 rpm به مدت 20 دقیقه در دمای 4 درجه سانتی گراد 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).

هیدرولیز کنسانتره 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 پیپسین 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).

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 رادیکال‌های آزاد نیازمند افزودن ترکیبات آنتی اکسیدانی به مواد غذایی وجود دارد. آنتی اکسیدان‌های سنتزی (BHT ، BHA) و TBHQ مقرون به صرفه هستند و کارایی بالایی دارند اما گزارش‌ها حاکی از آن هستند که این آنتی اکسیدان‌های سنتزی می‌توانند سمی باشند (3، 2). در بسیاری از میوه‌ها و سبزی‌ها به میزان قابل توجهی آنتی اکسیدان‌های طبیعی همچون پلی فنول‌ها، توکوفرول‌ها، فلاونوئیدها ایزوفلون‌ها و ویتامین‌های A و C وجود دارد. اثرات آنتی اکسیدانی 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 نسبتاً پایین برخی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی همچون توکوفرول‌ها به همراه نگرانی‌های فزاینده مصرف‌کنندگان بابت ایمنی افزودنی‌های سنتزی غذایی باعث احساس نیاز به شناسایی آنتی اکسیدان‌های 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 آنتی اکسیدان‌های 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 به دست 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 آنتی اکسیدانی به عنوان نسل جدید آنتی اکسیدان‌های 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

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

$$100 \times (\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}) = \text{درصد شلاته کنندگی}$$

بهینه سازی فرآیند جهت دستیابی به تیمار با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی: به منظور بهینه سازی فرایند از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی 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 هیدرولیز در سه سطح استفاده شد. پاسخ های مورد بررسی خاصیت مهار رادیکال DPPH، ABTS، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و ظرفیت شلاته کنندگی 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 آنتی اکسیدانی هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم

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

بررسی محتوای اسید آمینه: 120 میلی گرم از نمونه های WGPH خشک شده به روش انجمادی، توسط اسید کلریدریک 6 مولار به مدت 24 ساعت در دمای 110°C 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 کروماتوگرافی با ستون تجزیه ای (C₁₈، 4 mm، 100 μm، 5)، در دمای 50 درجه سانتی گراد 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 میلی لیتر بر دقیقه بود. مشتق سازی آمینو اسیدها با استفاده

ارزیابی میزان مهار رادیکال های 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. لوله های 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 رادیکال های DPPH توسط عصاره با فرمول زیر محاسبه گردید (8):

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

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

ارزیابی میزان مهار رادیکال های آزاد ABTS: در این آزمون ابتدا یک محلول استوک ABTS (7 میلی مولار) در یک محلول 2/45 میلی مولار پرسولفات پتاسیم تهیه شد. مخلوط حاصل به مدت حداقل 16 ساعت در دمای اتاق در تاریکی قرار گرفت. سپس محلول ABTS به نسبت 1 به 89 با محلول PBS (Phosphate Buffered Saline) مخلوط شد. میزان جذب این محلول در 734 نانومتر 0/02 ± 0/70 بود. 20 میکرولیتر از نمونه ها با 980 میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط کرده و پس از 6 دقیقه جذب نمونه ها در طول موج 734 نانومتر خوانده شد. در نمونه کنترل، محلول PBS جایگزین شد. در نهایت درصد مهار رادیکال های 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 میلی لیتر 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 90°C قرار گرفت. پس از سرد کردن، جذب نمونه ها در طول موج 695 نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به جای عصاره از 0/1 میلی لیتر متانول استفاده شد. نحوه آماده سازی معرف به این صورت بود که پس از آماده سازی 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).

Thermo Fisher) LTQ-Orbitrap XL mass spectrometer Proxeon (Scientific, San Jose, CA, USA Easy LC انجام شد. نمونه روی یک ستون (100 $\mu\text{m} \times 2\text{cm}$,) NanoTrap (C18, 5 μm , 100 A 12 $\text{cm} \times 75\text{ }\mu\text{m}$, 1.9 μm) C₁₈ روی ستون RP-LC وسیله (particle size; NikkyoTechnos Co., Ltd. Japan) انجام گردید و با استفاده از حلال A (0/1) % اسید فرمیک در آب به عنوان فاز متحرک با نرخ جریان 300 nL/min پیش تغلیظ گردید. پس از 3 دقیقه، گرادیان خطی 15% حلال B (0/1) % اسید فرمیک در استونیتریل) به کار برده شد و تا 35% حلال B در طول 8 دقیقه افزایش پیدا کرد. بعد از هر تیمار، ستون برای 10 دقیقه با حلال A (10%) شسته شد. سپس به شرایط آغاز بازگشت. شرایط عمل طیف سنج جرمی (Ion trapping mass spectrometry) به صورت زیر بود: قطبیت مثبت، دمای موینه 200 درجه سانتی گراد، ولتاژ نانو اسپری 2/5 کیلو ولت. (Thermo Fischer Scientific) Ultramark 1621 برای کالبراسیون 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 عنوان فاز ثابت (Rink Amide-Chem Matrix) متصل شد و به صورت چرخه‌ای هر بار یک آمینو اسید به انتهای آمینی اضافه می‌شود. به گروه α -آمینوی آمینواسید Fmoc (Fluorenyl methoxy carbonyl) متصل است تا از واکنش‌های جانبی ممانعت کند که توسط محلول بازی حذف می‌گردد. گروه کربوکسیل آمینواسید جدید که وارد چرخه می‌شود توسط عوامل کوپل کننده HBTU فعال می‌شود پس از سنتز کامل پپتید برای جدا کردن پپتید از رزین از 90 دقیقه TFA/H₂O/triisopropylsilane (95:2.5:2.5 v/v) در دمای اتاق استفاده شد. سپس با استفاده از دی اتیل اتر خنک و سانتریفیوژ ته نشین شد و لیوفیلیز شد. پپتیدها با استفاده از RP-HPLC در ستون C₁₈ (250 $\times$ 21.2 mm, 10 μm ; Phenomenex, Jupiter, CA) خالص‌سازی شد و با کمک فریز درایر خشک گردید و خلوص پپتیدها توسط ستون آنالیتیکی (4.6 $\times$ 50mm, 3 μm) بررسی شد. با استفاده از اسپکتروفوتومتری جرمی electrospray صحت سکوانس تولیدی نیز بررسی شد.

طرح آزمایش و آنالیز آماری داده‌ها و آنالیز داده‌های طیف سنج جرمی و شناسایی توالی‌ها: به منظور تعیین سطوح بهینه زمان دما و غلظت آنزیم به سوبسترا روی فعالیت

مخلوط نینهیدرین (0/11 مولار) و هیدریندانتین (2/5 میلی مولار) در DMSO و لیتیم استات (2 مولار، pH=5/2) با میزان جریان 0/2 میلی‌لیتر بر دقیقه انجام شد. دما در 120 درجه 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 خالص سازی اجزاء پپتیدی: 4 گرم نمونه هیدرولیز شده پروتئینی (به دست آمده در شرایط اپتیمم هیدرولیز) که قبلاً لیوفیلیز شده بود در 20 میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک 0/01 نرمال حل شد و به مدت 8 دقیقه در استوماکر هموژن گردید. سپس نمونه هموژن شده سانتریفیوژ شد (12000 $\times$ g) به مدت 20 دقیقه) و به منظور پروتئین زدایی، فاز روماند با سه برابر حجم خود با اتانول مطلق مخلوط شد و به مدت 20 ساعت در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس نمونه مجدداً سانتریفیوژ شد و پس از تبخیر اتانول، لیوفیلیز شد. در نهایت عصاره پروتئین زدایی شده خشک شده در 15 میلی‌لیتر اسید عیدروکلریک 0/01 نرمال حل شد و پس از صاف شدن با فیلتر غشایی 0/45 میکرومتر در فریزر -20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (11).

خالص‌سازی و جزء به جزء سازی مخلوط پپتیدها با RP-HPLC: با استفاده از HPLC فاز معکوس (Shimadzu, Japan) اجزاء پپتیدی بر مبنای میزان آگریزی نسبی تفکیک و خالص شدند. ستون مورد استفاده C₁₈ (250 $\times$ 21.2 mm, 10 μm) Phenomenex, Jupiter, CA) بود فاز متحرک متشکل از فاز A (تری فلوئورو استیک اسید (TFA) 0/1) در آب دو بار تقطیر و فاز B که حاوی TFA (0/1) در مخلوط استونیتریل با آب دیونیزه بود. فاز متحرک به صورت گرادیانی (0 تا 60% فاز B در طول 30 دقیقه) و با سرعت 25 میلی‌لیتر در دقیقه جریان داشت. حجم تزریق 10 میلی‌لیتر بود که به صورت دستی تزریق گردید. کیفیت جداسازی با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج 220 نانومتر بررسی گردید. مقادیر حاصل از پیک‌های اصلی به صورت دستی جمع‌آوری شد و پس از لیوفیلیز شدن در شرایط انجمادی نگهداری شدند. سپس محتویات هر بخش مجدداً در آب دیونیزه حل شد و قدرت آنتی‌اکسیدانی تمام فراکسیون‌های حاصله با انجام آزمایش‌های قدرت مهار رادیکل ABTS ارزیابی شد. در نهایت فعال‌ترین فرکسیون‌ها شناسایی شد.

توالی‌یابی و شناسایی پپتیدها nESI-LC-MS/MS: آنالیز طیف سنج جرمی (nano-LC-MS/MS) در یک سیستم

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.

آنتی‌اکسیدانی 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 Mascot search engine (v2.5,) و Fisher Scientific) 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

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

تیمار	دما (°C)	زمان (ساعت)	نسبت آنزیم به سوپسترا (W/W)	مهار رادیکال DPPH (%)	مهار رادیکال ABTS (%)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (آلفا توکوفول 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

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 (%)	مدل
ضرب	ضرب	ضرب	ضرب	ضرب	
عدد P	عدد P	عدد P	عدد P	عدد P	
رگرسیون	رگرسیون	رگرسیون	رگرسیون	رگرسیون	
9	2489/5	0/000	2475/61	0/000	مدل
1	783/76	0/000	737/88	0/000	X ₁
1	188/88	0/000	167/28	0/000	X ₂
1	772/47	0/000	772/64	0/000	X ₃
1	83/27	0/000	82/91	0/000	X ₁ ²
1	37/5	0/000	43/80	0/000	X ₂ ²
1	66/1	0/000	68/50	0/000	X ₃ ²
1	9/44	0/0069	7/41	0/024	X ₁ X ₂
1	16/56	0/0012	16/53	0/002	X ₁ X ₃
1	3/21	0/076	3/51	0/097	X ₂ X ₃
5	0/402		0/379	0/078	Lack of fitness
			0/96	0/92	R ²
			0/93	0/84	Adj-R ²
			4/19	7/5	CV

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 35 تا 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 از 30 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.

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 ($R^2_{MCA}=0.93$, $R^2_{TAC}=0.96$, $R^2_{ABTS}=0.99$ $R^2_{DPPH}=0.99$) 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.

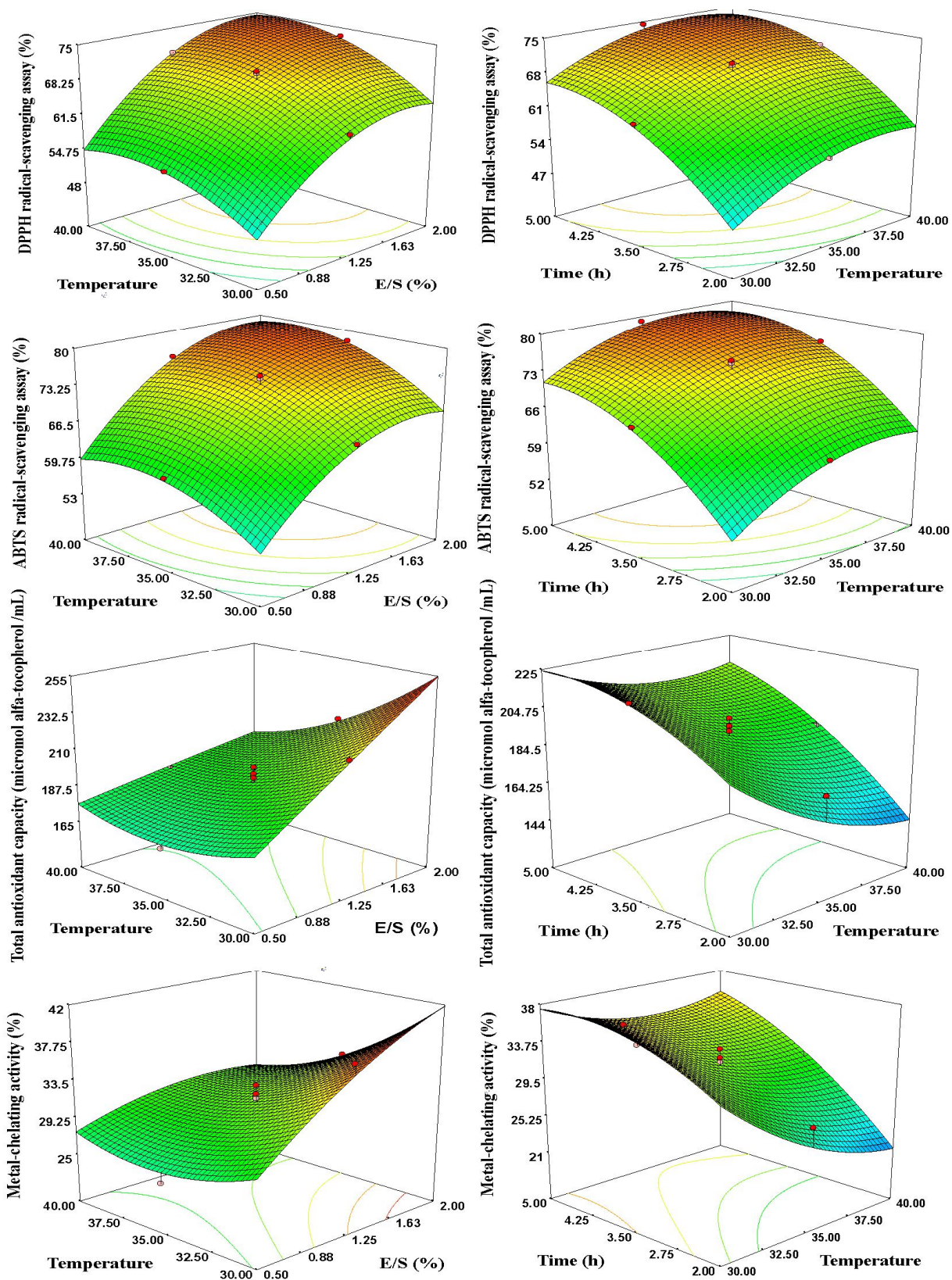
$$Y_1 = +69/57 + 8/85x_1 + 4/25x_2 + 8/79x_3 + 1/09x_1x_2 + 1/44x_1x_3 - 0/63x_2x_3 - 5/5x_1^2 - 3/69x_2^2 - 4/90x_3^2$$

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

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

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

نمودار سه بعدی تأثیر غلظت آنزیم پپسین، دما و زمان بر مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و شلاته‌کنندگی 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 غلظت 1/5 % شدت بیشتری



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

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 آنتی اکسیدانی 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 آب‌گریز بیشتری را نسبت به ایزوله پروتئین نشان می‌دهند. بنابراین هیدرولیزات پروتئین جوانه‌گندم می‌تواند منبع مناسبی جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانت باشد.

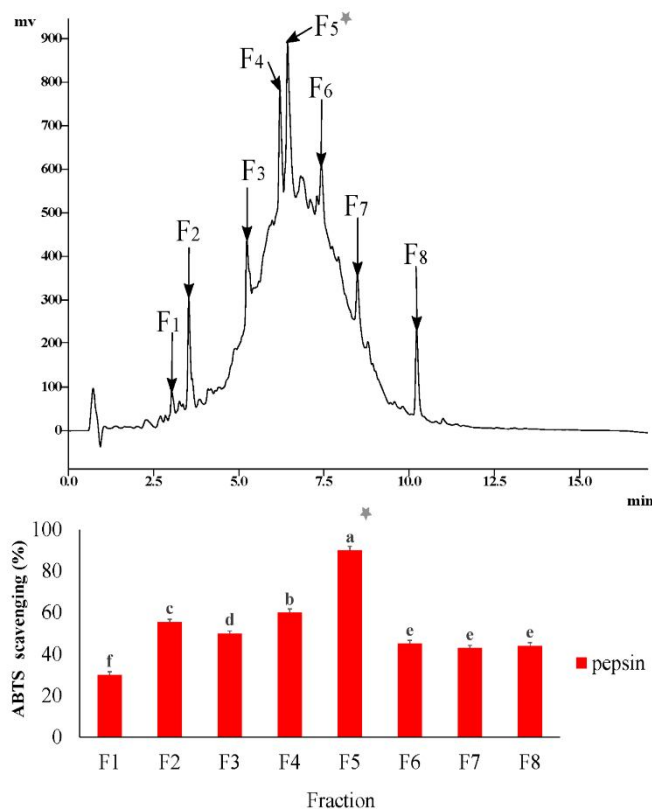
بهینه سازی فرآیند به منظور دستیابی به تیمار با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی: بهینه‌سازی متغیرهای وابسته با استفاده از جدول 1 انجام شد و نقطه بهینه به دست آمد. میزان مطلوبیت به دست آمده در مورد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و شلاته‌کنندگی 99% می‌باشد. این مقادیر بهینه در دمای 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 آنتی اکسیدانی کل 205 میکروگرم آلفا توکفرول بر میلی‌لیتر و فعالیت شلاته‌کنندگی 34% به دست آمد که داده‌های پیش‌بینی شده با داده‌های به دست آمده از آزمایشات واقعی تفاوت معنی‌داری ($P < 0/05$) نشان نداد.

جدول 4. آنالیز آمینو اسید هیدرولیزات جوانه‌گندم و ایزوله پروتئین جوانه‌گندم (گرم/100 گرم 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

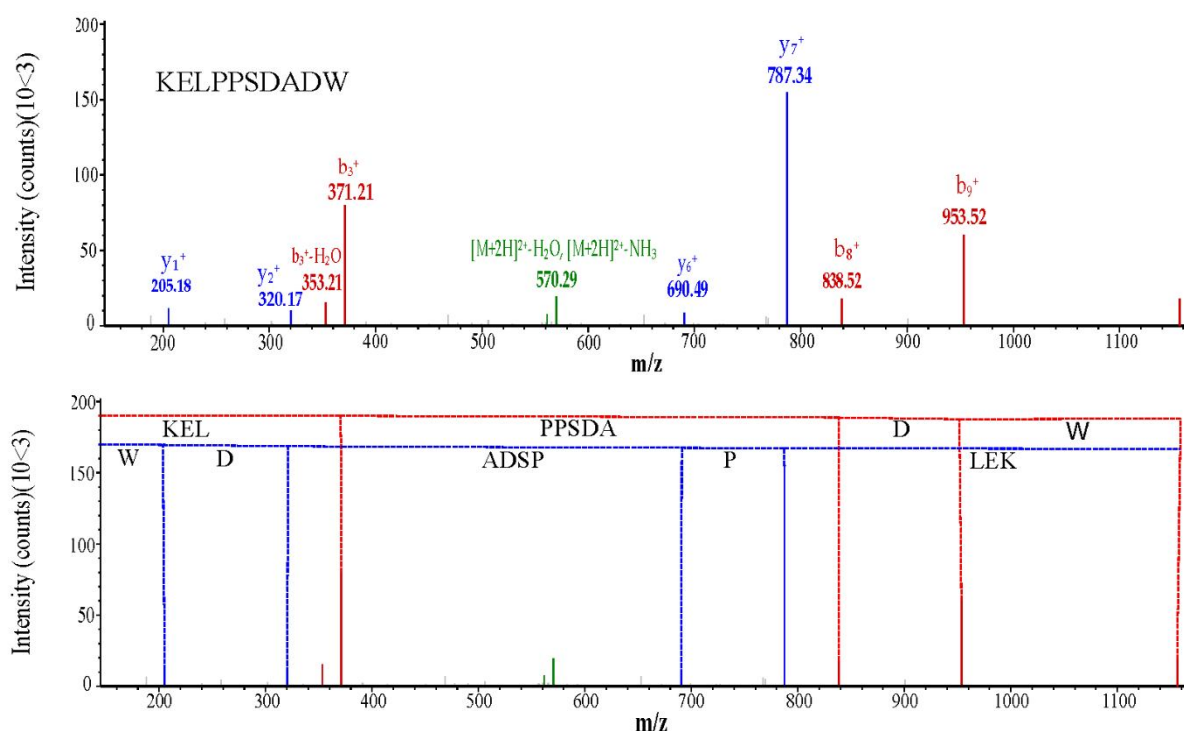
^b گلیسین، آلانین، والین، لوسین، پرولین، متیونین، فنیل آلانین، تریپتوفان، ایزولوسین



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

شناسایی پپتید با RP-HPLC و Q-TOF/MS/MS و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید سنتز شده:

هیدرولیزات به دست آمده در نقطه بهینه با استفاده از روش RP-HPLC به 8 پیک اصلی جداسازی شدند (شکل 2) فراکسیون‌ها جمع‌آوری شده با استفاده از فریز درایر خشک گردیدند و فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. فعال‌ترین فرکسیون تعیین شد و نتایج مربوط به جداسازی با RP-HPLC و فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون‌ها در شکل 2 آورده شده است. محدوده فعالیت به دست آمده از 20 تا 90% متغیر بود که بیشترین فعالیت مربوط به فراکسیون جریان یافته شماره 5 (F₅) بود. در پایان خالص سازی با HPLC، فعال‌ترین فرکسیون (F₅) به صورت جداگانه جمع‌آوری و خشک شدند و جهت انجام آنالیز بعدی (شناسایی پپتیدهای موجود در هر فرکسیون و تعیین توالی آمینواسیدی آنها) نگهداری شدند. شکل 3 طیف جرمی دو گانه به دست آمده از پپتید شناسایی شده در F₅ را نشان می‌دهد که مربوط به توالی KELPPSDADW با وزن مولکولی 1157/54 دالتون می‌باشد. بررسی مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS پپتید سنتز شده نشان داد که در غلظت 0/4 میکرومول بر میلی‌لیتر میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH 1/4 ± 51% و میزان مهار رادیکال‌های ABTS 1/1 ± 86% می‌باشد.



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

• 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 آنتی اکسیدانی هیدرولیزات پروتئین جوانه گندم تأثیر گذار می‌باشد. به منظور تولید پپتیدهای ضد اکسایش 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 آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آنها ارائه می‌دهد.

تفاوت قدرت احیا کنندگی، شلاته کنندگی و مهار کنندگی 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 آنتی اکسیدانی پپتیدها با وزن مولکولی 500 – 1500 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 احتمالاً فعالیت آنتی اکسیدانی را افزایش می‌دهد (16).

کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌های هیدرولیز شده در مراحل اولیه هیدرولیز را می‌توان به کم بودن فرصت آنزیم برای اثر گذاری بر سوبسترا و تولید پپتیدهای با قابلیت آنتی اکسیدانی نسبت داد (17). با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده شد. برطبق گزارش Lahart 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 ضد اکسایش 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 مهار کنندگی رادیکال DPPH بودند حاوی غلظت‌های بالاتری از آمینواسیدهای هیدروفوب بودند. آنها گزارش کردند که افزایش نسبت آمینواسیدهای آروماتیک در هیدرولیز شده‌های پروتئینی می‌تواند تأثیر مثبتی بر فعالیت آنتی اکسیدانی 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 دهنده‌گی آن است (21). پپتید شناسایی شده از فراکسیون 5 با بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی حضور باقیمانده آمینواسیدهای مؤثر (تریپتوفان، پرولین و لوسین) بر فعالیت آنتی اکسیدانی را آشکار ساخت و همچنین وزن مولکولی پپتید شناسایی شده با وزن مولکولی پپتیدهای مؤثر 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 آنتی اکسیدانت 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 آنتی اکسیدانت KELPPSDADW با قدرت بالای جذب رادیکال‌های آزاد می‌تواند نویددهنده‌ی آنتی اکسیدانت 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

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.

آزمایشگاههای مرجع کنترل غذا و دارو استان تهران و دانشگاه Pompeu Fabra در کشور اسپانیا اجرا شده است. بدین وسیله نویسندگان مقاله از ریاست آزمایشگاههای کنترل

• 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, 945-960 2006. 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. Memarpour-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.

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

Karami Z¹, Peighambaroust S.H^{2*}, Hesari J³, Akbari-Adergani B⁴

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: peighambaroust@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 results indicated that the peptide KELPPSDADW isolated from wheat germ protein has a strong antioxidant activity

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