

Using microwave pretreatment in the enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein (*Cucurbita maxima L.*) by alcalase and investigating its antioxidant properties

Introduction

Seeds and nuts have received increasing attention due to their nutritional value and the high therapeutic properties of their bioactive compounds. Most of the seeds are used as nuts, and some of them are considered agricultural waste. Pumpkin seeds have a high content of protein (30–40% in terms of dry matter). Proteins are among the vital health-giving components that provide nitrogen, essential amino acids and energy needed by the body. Pumpkin seeds are a good source of amino acids such as valine, histidine, isoleucine, leucine, threonine and methionine. Protein hydrolysate is a mixture of peptides and amino acids that can show antioxidant, antimicrobial, anticancer, antidiabetic and antihypertensive properties. During hydrolysis, proteins are broken into small peptides and amino acids. Since enzymatic hydrolysis is performed in relatively mild conditions and no amino acid damage occurs, this type of hydrolysis is preferred over acid and alkaline hydrolysis. Hydrolysates obtained from pumpkin seed protein have bioactive properties, especially antioxidant activity. Pretreatment of proteins before enzymatic hydrolysis works to improve the release of bioactive peptides from different proteins. Pretreatment causes the three-dimensional structure of the protein to open and helps increase the access of enzymes to peptide bonds. The main properties of microwaves usually show three characteristics: penetration, reflection and absorption. Enzymatic hydrolysis with the help of microwaves can shorten the time of enzymatic hydrolysis and improve the speed of the reaction. The purpose of this research is to investigate the antioxidant activity of pumpkin seed protein hydrolysates (*Cucurbita maxima L.*) by the alcalase enzyme in two conditions: without pretreatment and using microwave pretreatment.

Material and methods

In this study, Pumpkin fruit (*Cucurbita maxima L.*) was purchased from the local market of Astane Ashrafieh in Gilan province, and after separating the seeds manually, they were dried in an oven at 50°C for 72 hours. After the production of protein concentrate from

pumpkin seeds, the chemical properties of the concentrate, such as the amount of fat, protein, ash and moisture, were measured. The isolated pumpkin seed solution was exposed to microwave energy with a power of 450–900 watts for 30–90 seconds and was used as a substrate solution in enzymatic hydrolysis experiments. It should be noted that after measuring the total antioxidant power for different powers and times of microwave pretreatment, the power of 600 watts was selected for 30 seconds and applied before enzymatic hydrolysis. Enzymatic hydrolysis was done by the alcalase enzyme with a concentration of 0.5 to 2.5% compared to the protein substrate during a time period of 20 to 190 minutes, and the optimum temperature and pH of alcalase were determined in order to produce hydrolysates with antioxidant activity. Antioxidant power was measured by using DPPH free radical inhibition, total antioxidant activity and iron chelation activity methods.

Result and discussion

Bioactive peptides produced by the enzymatic hydrolysis of proteins have significant antioxidant properties. Pumpkin seeds can be used as a rich source of nutrients and bioactive compounds in various food industries. The results showed that the maximum amount of antioxidant activity without pre-treatment was achieved in 165 minutes with a 2.2% ratio of E/S by using DPPH free radical scavenging activity (40.5%), total antioxidant power (0.79), and iron chelation activity (96.2%) methods. By using microwave pre-treatment, the maximum amount of antioxidant activity was achieved in a shorter time and with less enzyme (105 minutes and E/S ratio 1.5%) using DPPH free radical scavenging (52%), total antioxidant power (0.711), and iron chelation activity (93%). Therefore, it can be concluded that using enzymatic hydrolysis by microwave pre-treatment, in addition to achieving hydrolysates with proper antioxidant activity, is a suitable method to save time and reduce enzyme concentrations used in enzymatic hydrolysis.

Keywords: Antioxidant activity, Microwave pretreatment, Protein hydrolysates, Pumpkin seeds.

استفاده از پیش تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita*)

(*maxima L.*) توسط آلکالاز و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن

زینب نوشی منجیلی^۱، علیرضا صادقی ماهونک*^۲، وحید عرفانی مقدم^۳، محمد قربانی^۴، هدی شهیری طبرستانی^۵

- ^۱ دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
sadeghiaz@yahoo.com
^۳ استادیار گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
^۴ استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
^۵ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

چکیده

دانه کدو دارای محتوای پروتئین بالایی (۳۰-۴۰ درصد برحسب ماده خشک) است. بخش اعظم دانه‌ها به شکل آجیل مورد استفاده قرار می‌گیرند و بخشی از آن نیز جزو ضایعات کشاورزی محسوب می‌شوند. هیدرولیز شده‌های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص زیست‌فعالی، بویژه فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. در این پژوهش محلول محتوی ایزوله پروتئین دانه کدو در معرض پیش تیمار مایکروویو با توان ۹۰۰-۴۵۰ وات به مدت ۹۰-۳۰ ثانیه قرار گرفت و به‌عنوان محلول سوبسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز، با غلظت ۲/۵-۰/۵ درصد وزنی نسبت به سوبسترای پروتئینی، در بازه زمانی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه، در دما و pH اپتیمم آلکالاز، به‌منظور تولید هیدرولیز شده‌هایی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی انجام گرفت. قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد، بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شرایط بدون پیش تیمار، طی زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد با قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (۴۰/۵ درصد)، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۷۹) و شلاته‌کنندگی آهن (۹۶/۲ درصد) بدست آمد. درحالی‌که با اعمال پیش تیمار مایکروویو، بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمانی کوتاه‌تر و غلظت آنزیم کمتر (۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد)، با قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۲ درصد)، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۷۱۱) و شلاته‌کنندگی آهن (۹۳ درصد) بدست آمد. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که استفاده از پیش تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی، علاوه بر دستیابی به هیدرولیز شده‌هایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، موجب صرفه‌جویی در زمان و غلظت آنزیم مورد استفاده در طی هیدرولیز نیز می‌شود.

کلمات کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، پیش تیمار ماکروویو، دانه کدو، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

دانه‌ها و آجیل‌ها، به دلیل ارزش تغذیه‌ای و خواص درمانی بالای اجزای زیست‌فعال آن‌ها، موردتوجه روزافزون قرار گرفته‌اند (Shandilya & Sharma, 2017; Yang et al., 2019). دانه کدو¹ منبع خوبی از پروتئین (۳۰-۴۰ درصد برحسب ماده خشک) می‌باشد. پروتئین دانه کدو سرشار از اسیدهای آمینه ضروری نظیر والین، هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، ترئونین و متیونین می‌باشد (Lu et al., 2021). طی هیدرولیز، پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدها شکسته می‌شوند. از آنجا که هیدرولیز آنزیمی در شرایط نسبتاً ملایمی انجام می‌شود و هیچ‌گونه آسیبی به ساختار آمینواسیدها وارد نمی‌شود، این نوع هیدرولیز به هیدرولیز اسیدی و قلیایی ترجیح داده می‌شود (Taha et al., 2013). مطالعات نشان می‌دهد که پروتئین‌های حاصل از دانه کدو، مشابه سویا، دارای مقادیر بالای فراهمی‌زیستی آمینواسیدها می‌باشند (Rezigi et al., 2013). یانگ و همکاران (Yang et al., 2019) بیان کردند که ساختار گلوبولین پروتئین دانه کدو مشابه دانه حبوبات است. این نکته مهم در مورد شباهت تغذیه‌ای، ممکن است اثرات مخرب مرتبط با سوء تغذیه پروتئینی را کاهش دهد. علاوه بر این، پروتئین‌های جدا شده از دانه‌های کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی مناسبی هستند (Nkosi, 2007; Sarkar et al., 2007; Yang et al., 2019). مطالعات اخیر نشان دادند که هیدرولیز شده‌های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی بوده (Mazloomi-Kiyapey et al., 2019; Sitohy et al., 2020) و همچنین زیست دسترس پذیری روی را افزایش می‌دهند (Lu et al., 2021). هیدرولیز شده‌های حاصل از منابع پروتئینی مختلف، دارای ویژگی‌های زیست‌فعالی متنوعی می‌باشند. دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی (Nourmohammadi et al., 2016)، دانه بامیه دارای پتانسیل آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کنندگی (Nnamezie et al., 2021)، دانه چیا دارای ویژگی‌های ضد فشار خون و آنتی‌اکسیدانی (Villanueva-Lazo et al., 2021) و "سایر دانه‌های روغنی" با خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد فشار خون و ضد دیابت (Han et al., 2021) می‌باشند. پپتیدهای زیست‌فعالی که از منابع مختلف طی هیدرولیز آنزیمی به دست می‌آیند دارای ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی و تشکیل کف (به‌عنوان مثال، سویا) (Horax et al., 2017)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (پپتیدهای سویا، گندم سیاه، پنبه‌دانه، تخمه آفتابگردان، بادام‌زمینی و کدو) (Samaranayaka & Li-Chan, 2011)، کاهش کلسترول (هیدرولیز شده‌های ماهی) (Drotningvik et al., 2016)، محافظت‌کننده عصبی و آنتی‌اکسیدانی (پپتیدهای گردو) (Wang et al., 2021)، فعالیت ضد سرطانی (Fan et al., 2022)، ضد التهابی (پپتیدهای خیار دریایی) (Zhang et al., 2021) می‌باشند. پیش تیمار پروتئین‌ها، قبل از هیدرولیز آنزیمی، جهت بهبود آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های مختلف عمل می‌کند. استفاده از پیش تیمار ماکروویو امکان کنترل دقیق دما، گرم شدن یکنواخت نمونه‌ها و کاهش واکنش‌های جانبی نامطلوب را فراهم

¹ *Cucurbita pepo L.*

می‌کنند. پیش‌تیمار مایکروویو سبب باز شدن ساختار سه‌بعدی پروتئین شده و به افزایش دسترسی آنزیم‌ها به پیوندهای پپتیدی کمک می‌کند (Uluko et al., 2015). اولوکو و همکاران (Uluko et al., 2015) گزارش کردند که استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو باعث افزایش درجه هیدرولیز و پایداری هیدرولیز شده‌های پروتئین آب‌پنیر می‌شود. گازی‌کالوویچ و همکاران (Gazikalović et al., 2021) بیان کردند که مایکروویو تأثیر قابل‌توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیز شده‌های پروتئینی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی مناسب تولید می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی کارایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه کدو توسط آلكالاز در شرایط بدون پیش‌تیمار و با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو می‌باشد.

مواد و روش‌ها

مواد

ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima L.*) از بازار محلی آستانه اشرفیه در استان گیلان تهیه شد و پس از جداسازی دانه‌ها به صورت دستی، در دمای ۵۰ درجه سانتیگراد به مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شدند (Sitohy et al., 2020). آنزیم آلكالاز با اکتیویته ۲/۹۷ U/ml، اسید سولفوریک، سود، اسید بوریک، اسید کلریدریک، معرف متیل‌رد، هگزان، $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ، متانول، FeCl_2 ، فروزین و آمونیوم مولیبدات مورد استفاده در آزمایشات از شرکت‌های معتبر مرک آلمان، سیگما آلدریج آمریکا و مجلی ایران خریداری شدند.

روش‌ها

تولید کنسانتره پروتئینی

دانه‌های خشک‌شده، بدون پوست‌گیری، توسط آسیاب (500 A، چین) کاملاً پودر شده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ وزنی/حجمی به پودر اضافه شد و توسط شیکر (نورصنعت فردوس، ایران) با سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت مخلوط شدند. عمل حذف روغن تا کاهش آن به حدود ۵ درصد ادامه یافت. حلال باقیمانده در کنجاله در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت توسط آون تحت خلأ (Memmert، آلمان) جدا شد. کنجاله به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی/حجمی در آب مقطر پخش شده و pH محلول به منظور باز شدن ساختمان پروتئین، توسط سود ۱ نرمال به ۱۱ رسانیده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه توسط همزن مغناطیسی (Jenway، انگلستان) مخلوط شد. پس از آن عمل سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Combi-514R، کره جنوبی) انجام شد و با جمع‌آوری محلول رویی یا سوپرناتانت، باقی‌مانده در آب مقطر حل شده و استخراج سوپرناتانت دوباره تکرار شد. سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال، pH آن روی ۴ تنظیم شد، عمل سانتریفیوژ مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴

درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل توسط خشک‌کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) خشک شده و در ظروف دربسته، محیط خشک و خنک نگهداری شد (Mazloomi-Kiyapey et al., 2019).

آزمون‌های شیمیایی

محتوای پروتئین

۲ گرم از نمونه به همراه ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کلدال (کاتالیزور) به درون لوله هضم افزوده شد و بعنوان شاهد، از یک لوله هضم بدون نمونه و فقط حاوی اسید و کاتالیزور استفاده شد. عملیات هضم با توان ۸۰ (وات) دستگاه به مدت ۱۲۰ دقیقه تا شفاف شدن محتویات دستگاه (InKjel 625 P، آلمان) انجام شد. بعد از خنک شدن و خارج شدن بخارات اسیدی با استفاده از دستگاه تقطیر، توسط سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد، تقطیر (FX118-30، آلمان) انجام شد و سپس تیتراسیون نمونه به کمک اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی شدن نمونه در حضور معرف متیل‌رد ادامه یافت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

معادله ۱

$100 \times \text{وزن نمونه} / (\text{حجم اسید مصرفی شاهد} - \text{حجم اسید مصرفی نمونه}) \times \text{نرمالیت اسید مصرفی} \times 1/4 = \text{درصد ازت نمونه}$

برای محاسبه درصد پروتئین نمونه، ازت کل را در فاکتور پروتئینی (۶/۲۵) ضرب می‌کنیم (Salo-väänänen et al., 1996).

محتوای رطوبت

مقدار ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و در داخل آون (Memmert، آلمان) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه سرد شدن در داخل دسیکاتور، توزین انجام شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا محتوای رطوبت نمونه به مقدار ثابتی رسید. سپس مقدار رطوبت طبق معادله ۲ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

معادله ۲

$100 \times \text{وزن نمونه} / (\text{وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن} - \text{وزن ظرف و نمونه قبل از خشک کردن}) = \text{درصد رطوبت}$

محتوای خاکستر

در بوته‌چینی با وزن مشخص مقدار ۲ گرم نمونه توزین شد. ابتدا روی هیتر سوزانده شد و پس از آن بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی (Nabertherm، آلمان) با دمای ۶۰۰-۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶ ساعت انتقال یافت و حرارت‌دهی تا سفید شدن رنگ خاکستر ادامه یافت. در نهایت بعد از ۱۵ دقیقه خنک شدن بوته در دسیکاتور، توزین انجام شد. میزان خاکستر از طریق معادله ۳ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

معادله ۳

$100 \times \text{وزن نمونه} / (\text{وزن بوته چینی} - \text{وزن بوته و خاکستر}) = \text{درصد خاکستر}$

محتوای چربی

۳ گرم از نمونه روی کاغذ صافی توزین و در داخل کارتوش گذاشته شد. کارتوش به قسمت استخراج دستگاه سوکسله انتقال یافت. بالن با وزن مشخص تا نیمه با حلال هگزان پر شد و سپس به دستگاه متصل شد. عملیات استخراج به مدت ۴ ساعت انجام شد. در نهایت برای خارج کردن حلال باقیمانده، بالن محتوی نمونه به آن با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت سپس بالن مجدداً توزین شد. درصد چربی با معادله ۴ محاسبه شد (Horwitz & Latimer, 2000).

معادله ۴

$100 \times \text{وزن نمونه} / (\text{وزن بالن} - \text{وزن بالن و نمونه}) = \text{درصد چربی}$

پیش تیمار مایکروویو

محلول پروتئینی از کنسانتره پروتئین دانه کدو با نسبت ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار (Na_2HPO_4 - pH=۷/۴) (100 gr L^{-1}) محلول مایکروویو تهیه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه جهت هیدراته شدن کامل، هم‌زده شد و سپس در معرض امواج مایکروویو (Daewoo، کره جنوبی) با توان ویژه ۴۵۰-۹۰۰ وات به مدت ۳۰-۹۰ ثانیه قرار گرفت. محلول پروتئینی پیش تیمار شده با مایکروویو به عنوان محلول سوپسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت (Gohi et al., 2019). لازم به ذکر است پس از اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی کل، در توان‌ها و زمان‌های مختلف پیش تیمار مایکروویو، توان ۶۰۰ وات به مدت ۳۰ ثانیه انتخاب و قبل از هیدرولیز آنزیمی اعمال شد.

هیدرولیز آنزیمی

آنزیم آلکالاز در غلظت‌های ۰/۵-۲/۵ درصد وزنی نسبت به سوپسترای پروتئینی اضافه شد و زمان هیدرولیز به عنوان یک فاکتور مستقل برای هر یک، طی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار (VS-8480، کره جنوبی) با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انجام

گرفت. دما و pH هیدرولیز، مطابق دمای اپتیمم (۵۰ درجه سانتی‌گراد) و pH اپتیمم (pH=۸) آنزیم در نظر گرفته شد. به منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم (WNB 22، آلمان) با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس هیدرولیز شده‌ها (مایع رویی) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده، خشک شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Nourmohammadi et al., 2016; Sitohy et al., 2020).

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال آزاد DPPH

هیدرولیز شده‌ها، در آب مقطر با غلظت بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل شدند. سپس به ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه، ۶۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار در متانول) اضافه و به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده شد و بعد از قرار گرفتن در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis (مدل T80، انگلستان) اندازه‌گیری شد. شاهد، حاوی ۸۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار) بود. توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (Kanbargi et al., 2017).

$$\text{معادله ۵} \quad 100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

فعالیت شلاته‌کنندگی آهن

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، با ۱۰ میکرولیتر FeCl_2 (۲ میلی‌مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، مخلوط شد و پس از افزودن ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین^۲ (۵ میلی‌مولار)، به مدت ۲ دقیقه به شدت تکان داده شد. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. کاهش رنگ، به دلیل شلاته شدن آهن، با اندازه‌گیری جذب در ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد حاوی ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر FeCl_2 و ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) بود. درصد شلاته‌کنندگی با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد (Kanbargi et al., 2017).

$$\text{معادله ۶} \quad 100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد شلاته‌کنندگی}$$

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

² Ferrozine

۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب (WNB 22، آلمان) ۹۰ درجه سانتی‌گراد 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 آنتی‌اکسیدانی کل بالاتر بود (Prieto et al., 1999).

بهینه‌سازی فرایند

شرایط هیدرولیز، با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۱ و روش سطح پاسخ، در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. فاکتورهای مستقل، نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (X_1) و زمان هیدرولیز (X_2) در پنج سطح ($+\alpha$ ، $+1$ ، 0 ، -1 ، $-\alpha$) و سه نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ‌های مورد بررسی، شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH بود. اثر متغیرهای مستقل بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ ارزیابی شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. آزمون‌ها با ۳ تکرار انجام شد و متوسط نتایج گزارش گردید. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱: سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین دانه کدو
Table 1: Levels of independent variables used to optimize the antioxidant activities of pumpkin seed protein

$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	متغیرهای مستقل independent variables
۰/۵	۰/۸	۱/۵	۲/۲	۲/۵	E/S
۲۰	۴۵	۱۰۵	۱۶۵	۱۹۰	زمان time

نتایج و بحث

میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی در جدول ۲ نشان داده شده است. با توجه به جدول ۲، میزان چربی دانه کامل نسبت به کنسانتره پروتئین دانه، کاهش قابل توجهی داشت که دلیل آن، استفاده از حلال هگزان جهت چربی‌زدایی از کنجاله و کارایی بالای حلال هگزان در چربی‌زدایی، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و ترسیب پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک می‌باشد. کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت حذف هگزان باقیمانده پس از فرایند چربی‌زدایی و استفاده از خشک‌کن انجمادی به منظور خشک کردن رسوب پروتئینی بعد از فرایند استخراج می‌باشد. مقدار پروتئین و چربی در دانه کامل مشابه گزارشات دوی و همکاران (Devi et al., 2018) و همچنین رزیگ و همکاران (Rezig et al., 2012) بود. مقدار پروتئین و چربی کنسانتره کمی متفاوت از مقدار گزارش داده شده توسط ذاکری و همکاران (Zakeri et al., 2012) بود.

(*al.*, 2019) بود. لازم به ذکر است که این اختلافات ناشی از تفاوت در گونه‌های مورد استفاده است. با توجه به جدول ۲، کمترین میزان خاکستر مربوط به کنسانتره پروتئینی می‌باشد که دلیل آن فرایند استخراج پروتئین در pH ۱۱ و حذف مقادیر زیادی ترکیبات غیرپروتئینی است.

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی موجود در دانه کامل، کنجاله چربی‌گیری شده و کنسانتره پروتئین کدو
Table 2: Chemical compounds present in whole grain, defatted flour and pumpkin protein concentrate

نمونه sample	پروتئین (درصد) protein	چربی (درصد) fat	خاکستر (درصد) ash	رطوبت (درصد) moisture
دانه کامل whole grain	۳۳/۹۲	۳۱/۵۷	۶/۹	۸/۴۶
کنجاله چربی‌گیری شده defatted flour	۵۹/۵۰	۵/۱۲	۴/۶۵	۷/۶۵
کنسانتره پروتئین کدو pumpkin protein concentrate	۶۵/۶۲	۲/۲۹	۱/۴۵	۵/۴۵

بهینه‌سازی هیدرولیز کنسانتره پروتئین کدو

تأثیر متغیرهای مستقل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا تحت پیش‌تیمار مایکروویو بر درصد شلاته‌کنندگی، آنتی‌اکسیدانی کل و مهار رادیکال آزاد DPPH با تجزیه و تحلیل ضرایب رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جداول ۳ و ۴ مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۳: تیمارهای تصادفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بدون پیش‌تیمار
Table 3: random treatments and antioxidant activity of hydrolyzed pumpkin seed protein without pretreatment

تیمار treatment	زمان Time	E/S	درصد شلاته‌کنندگی Chelation activity %	% DPPH	آنتی‌اکسیدانی کل Total anti-oxidant
۱	۲۰	۱/۵	۷۹/۶	۲۵/۲	۰/۶۵۴
۲	۴۵	۰/۸	۷۶/۵	۲۲/۳	۰/۶۲۵
۳	۴۵	۲/۲	۸۳/۶	۲۶/۵	۰/۶۸۴
۴	۱۰۵	۰/۵	۸۱/۱	۲۳/۶	۰/۶۳۷
۵	۱۰۵	۱/۵	۸۹/۲	۳۱/۲	۰/۷۱۴
۶	۱۰۵	۱/۵	۸۸/۵	۳۲/۸	۰/۷۲
۷	۱۰۵	۱/۵	۸۷/۸	۳۳/۵	۰/۷۲۵
۸	۱۰۵	۲/۵	۹۰/۵	۳۷/۵	۰/۷۶۴
۹	۱۶۵	۰/۸	۸۴/۶	۲۵/۵	۰/۶۵۸
۱۰	۱۶۵	۲/۲	۹۶/۲	۴۰/۵	۰/۷۹

۰/۷۲۵ ۳۳/۵ ۸۹/۵ ۱،۵ ۱۹۰ ۱۱

جدول ۴: تیمارهای تصادفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت پیش تیمار مایکروویو
 Table 4: random treatments and antioxidant activity of hydrolyzed pumpkin seed protein under microwave pretreatment

تیمار treatment	زمان Time	E/S	درصد شلاته کنندگی Chelation activity (درصد)	DPPH (درصد)	آنتی-اکسیدانی کل Total anti-oxidant
۱	۲۰	۱،۵	۸۴/۸	۲۵/۷	۰/۶۵۴
۲	۴۵	۰،۸	۸۰/۲	۳۳/۱	۰/۶۲۵
۳	۴۵	۲،۲	۸۶	۲۸/۳	۰/۶۶۵
۴	۱۰۵	۰،۵	۸۰	۲۲/۵	۰/۶۱۳
۵	۱۰۵	۱،۵	۹۳	۵۱	۰/۶۸۸
۶	۱۰۵	۱،۵	۹۱	۵۰/۸	۰/۷۱۱
۷	۱۰۵	۱،۵	۹۲	۵۲	۰/۷۰۱
۸	۱۰۵	۲،۵	۸۹	۳۵	۰/۶۹۱
۹	۱۶۵	۰،۸	۸۱	۲۶	۰/۶۳۲
۱۰	۱۶۵	۲،۲	۸۹/۷	۴۰/۲	۰/۶۸۸
۱۱	۱۹۰	۱،۵	۸۴/۳	۳۷	۰/۶۴۲

تاثیر زمان و E/S بر فعالیت شلاته کنندگی بدون استفاده از پیش تیمار

با توجه به عدد P بدون پیش تیمار جدول ۵، استنباط می‌شود، مقادیر A^2 ، A و B تاثیر معنی‌داری بر روی فعالیت شلاته کنندگی آهن می‌گذارند ($p < 0/05$). متغیر A^2 ، نسبت به سایر متغیرها تاثیر گذارتر می‌باشد. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برآزش ($0/05 < p$)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه شلاته کنندگی یون آهن با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0/9679$ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد که از معادله ۷ پیروی می‌کند.

$$88/50 - 1/96 A^2 + 4/00 B + 4/34 A$$

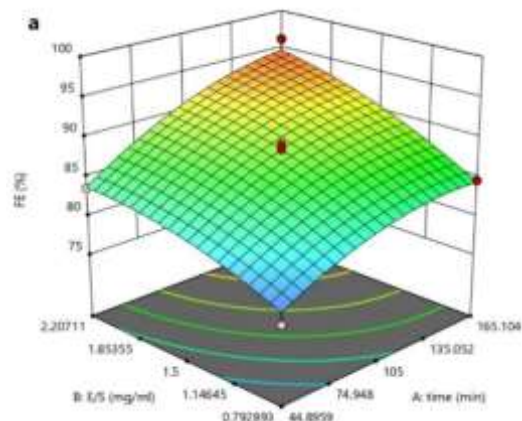
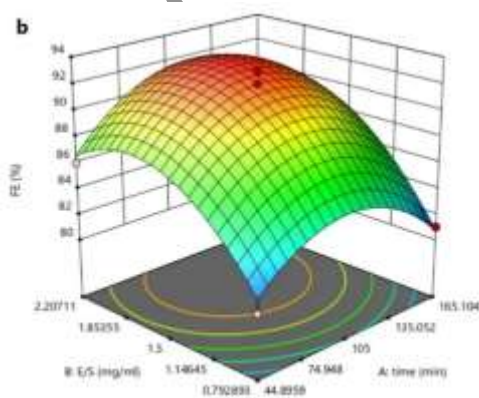
معادله ۷

جدول ۵: تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن
 Table 5: Effect of time and E/S ratio on iron ion chelation activity

df		P Value		Regression coefficient		
P	BP	P	BP	P	BP	model
5	5	0/0006	0/0010	92/00	88/50	
1	1	0/2741	0/0004	0/4741	4/34	A
1	1	0/0003	0/0005	3/40	4/00	B
1	1	0/2416	0/1769	0/7250	1/13	AB
1	1	0/0004	0/0225	-3/80	-1/96	A ²
1	1	0/0004	0/0771	-3/82	-1/34	B ²
				0/8576	0/7865	Pred-R ²
				0/9480	0/9358	adj-R ²
3	3	0/4583	0/1399			Lack of fit

A : زمان، B: E/S، BP: بدون پیش تیمار و P: با پیش تیمار مایکروویو

با توجه به شکل ۱ الف، در نسبت ۲/۲ درصد E/S و زمان ۱۶۵ دقیقه بیشترین فعالیت شلاته کنندگی (۹۶,۲٪) را خواهیم داشت و کمترین میزان فعالیت شلاته کنندگی (۷۶,۵٪) مربوط به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۰,۸ درصد E/S می باشد. بطور کلی میزان فعالیت شلاته کنندگی تا زمان ۱۶۵ دقیقه افزایش و پس از آن کاهش یافته است که احتمالاً به دلیل تولید پپتیدهای کوتاه زنجیری است که توانایی کمی در فعالیت شلاته کنندگی آهن از خود نشان می دهند (Maqsoudloua. et al., 2018). بعبارت دیگر، هیدرولیز محدود، منجر به تولید توالی‌های پپتیدی می شود که توانایی بالاتری در مهار یون آهن از خود نشان می دهند. مشابه یافته‌های کاوه و همکاران (Kaveh et al., 2019) که تاثیر منفی افزایش زمان و درجه هیدرولیز بر فعالیت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده شنبليله را مشاهده کردند. از طرف دیگر، با افزایش نسبت E/S، میزان فعالیت شلاته کنندگی نیز افزایش یافت. این افزایش، احتمالاً بدلیل ازدیاد تعداد جایگاه‌های فعال در دسترس برای هیدرولیز سوبسترا و شکسته شدن پیوندهای پپتیدی بیشتر است که در نتیجه، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می یابد.



شکل ۱- تاثیر زمان و E/S بر روی فعالیت شلاته کنندگی بدون پیش تیمار (الف) و تاثیر زمان و E/S بر روی فعالیت شلاته - کنندگی با اعمال پیش تیمار (ب)

Figure 1- Effect of time and E/S on chelation activity without pretreatment (a) and Effect of time and E/S on chelation activity with pretreatment (b)

تاثیر زمان و E/S بر فعالیت شلاته کنندگی با اعمال پیش تیمار

نتایج بدست آمده از شکل ۱ ب، حاکی از آن است که بیشترین فعالیت شلاته کنندگی مربوط به زمان ۱۰۵ دقیقه و E/S ۱٫۵ درصد می باشد. این مقدار بیشینه، نسبت به شرایط بدون پیش تیمار، در زمانی کوتاه تر و غلظت پایین تر آنزیم اتفاق افتاده است. احتمالاً، بدلیل اینکه میکروویو می تواند تغییراتی در ساختارهای دوم و سوم پروتئین ها ایجاد کند، با باز کردن ساختار پروتئین ها، دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی را افزایش می دهد (Li et al., 2013). گوهی و همکاران (Gohi et al., 2019) گزارش کردند که میکروویو همراه با پاپائین می تواند عملکرد تولید پپتیدهای زیست فعال از دانه نیلوفر را بهبود بخشد. گازیکالوویچ و همکاران (Gazikalović et al., 2021) بیان کردند، در مقایسه با عملیات حرارتی، به نظر می رسد که پیش تیمار میکروویو بر ساختار گلوتن و آلرژی زایی تأثیر می گذارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی مناسب تولید می کند. نگوین و همکاران (Nguyen et al., 2017) بیان کردند که هیدرولیز آنزیمی به همراه پیش تیمار میکروویو روشی مناسب برای تولید هیدرولیز شده های پروتئین ماهی با ویژگی های آنتی اکسیدانی مناسب می باشد.

تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بدون پیش تیمار

با توجه به مقادیر عدد P بدون پیش تیمار جدول ۶، مقادیر A^2 ، A، B و AB بر فعالیت DPPH تاثیر گذار می باشند ($p < 0/05$). A^2 نسبت به سایر متغیرها تاثیر گذارتر است. معنی دار نشدن فاکتور عدم برازش ($0/05 < p$)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده های مربوط به فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0/9728$ می باشد که نشان می دهد مدل توانسته ۹۷/۲۸ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند. معادله ۸، روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می دهد.

$$32/50 + 2/70AB - 1/89A^2 + 3/62A + 4/86B$$

معادله ۸

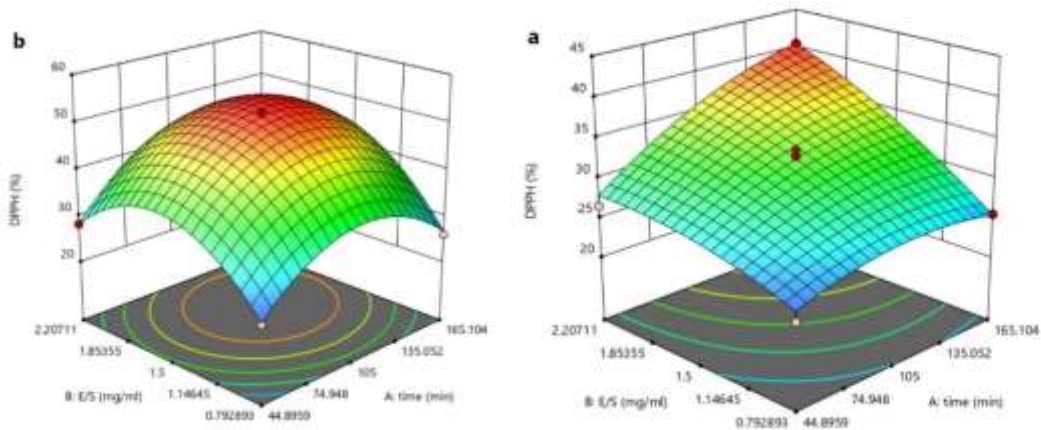
جدول ۶: تاثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH
Table 6: Effect of time and E/S ratio on DPPH free radical inhibition

df		PValue		Regression coefficient		
P	BP	P	BP	P	BP	
5	5	<0/0001	0/0006	51/27	32/50	model
1	1	<0/0001	0/0007	3/85	3/62	A
1	1	<0/0001	0/0002	4/63	4/86	B
1	1	0/0011	0/0116	2/25	2/70	AB
1	1	<0/0001	0/0233	-10/12	-1/89	A ²
1	1	<0/0001	0/0790	-11/42	-1/29	B ²
				0/9912	0/8448	Pred-R ²
				0/9967	0/9457	adj-R ²
3	3	0/5034	0/3989			Lack of fit

A: زمان، B: E/S، BP: بدون بیش تیمار و P: با بیش تیمار میکروویو

مطابق شکل ۲ الف، می توان بیان نمود که طی زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را خواهیم داشت و ادامه فرایند هیدرولیز منجر به کاهش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH خواهد شد. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تاثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا شده است (MESHGINFAR *et al.*, 2014). شعبان پور و همکاران (Shaban Pour *et al.*, 2017) گزارش کردند که قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای حاصل از پروتئین میگو، با افزایش زمان هیدرولیز، کاهش می یابد. در گزارشی دیگر باتیستا و همکاران (Batista *et al.*, 2010) گزارش کردند، افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH می شود. اویسی پور و همکاران (Ovissipour *et al.*, 2009) به بررسی تاثیر زمان بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای "گونه ای از ماهی" پرداختند و گزارش آنها حاکی از آن بود که با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه، بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را خواهیم داشت و با افزایش بیشتر زمان، این فعالیت کاهش خواهد یافت. این اختلاف در گزارشات ناشی از تفاوت در ماده اولیه، نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز می باشد. در مطالعه حاضر، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد منجر به افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH شد و در غلظت بالاتر منجر به کاهش فعالیت شد. علت این امر را می توان به هیدرولیز بیش از حد پروتئین نسبت داد که منجر به رهائش کامل آمینواسیدهای هیدروفیل شده و سبب دشوار شدن واکنش آمینواسیدهای فعال با رادیکال DPPH محلول در چربی می شود (Zhu *et al.*, 2008). نورمحمدی و همکاران (Nourmohammadi *et al.*, 2016) گزارش کردند افزایش غلظت آنزیم از ۱/۵ تا ۲ درصد، منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیز شده های پروتئین کدو شد و در غلظت های کمتر از ۱/۵ درصد، این فعالیت کاهش یافت. باتیستا و همکاران (Batista *et al.*, 2010) گزارش کردند در هیدرولیز آنزیمی پروتئین

ماهی "گونه ای از ماهی" توسط آنزیم پروتامکس، افزایش غلظت آنزیم و افزایش درجه هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت آنتی-اکسیدانی می شود که دلیل این امر، افزایش پپتیدهای دهنده هیدروژن به دلیل افزایش درجه هیدرولیز پروتئین می باشد.



شکل ۲- تاثیر زمان و E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بدون پیش تیمار (الف) و تاثیر زمان و E/S بر روی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال پیش تیمار (ب)

Figure 2- The effect of time and E/S on DPPH free radical inhibition activity without pretreatment (a) and The effect of time and E/S on DPPH free radical inhibition activity with pretreatment (b)

تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال پیش تیمار

با توجه به شکل ۲ ب، با اعمال فرایند پیش تیمار مایکروویو، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ در صد اتفاق افتاد یعنی در مقایسه با شرایط بدون پیش تیمار، در زمان کمتر و غلظت پایین تر آنزیم به بیشینه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH دست یافتیم. یانگ و همکاران (Yang et al., 2022) تاثیر پیش تیمار مایکروویو بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH "بر روی هیدرولیز شده های پروتئین شیر" را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند توان های مختلف پیش تیمار مایکروویو انجام گرفته بر روی هیدرولیز شده های پروتئین شیر، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با مایکروویو با توان ۳۰۰ وات، بالاترین مقدار می باشد. دنگ و همکاران (Dong et al., 2015) گزارش کردند پیش تیمار مایکروویو با توان ۴۰۰ وات، سبب بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در هیدرولیز شده های کنجاله آفتابگردان می شود. این تفاوت در توان های مورد استفاده در مطالعات مختلف، ممکن است به میزان حلالیت مواد پروتئینی مرتبط باشد. هیدرولیز شده های پروتئین شیر در مقایسه با پروتئین نامحلول، با قدرت مایکروویو کمتری تحت تاثیر قرار می گیرند (Yang et al., 2022).

تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل بدون پیش تیمار

با توجه به مقادیر عدد P بدون پیش تیمار جدول ۷، می توان بیان کرد که مقادیر A^2, B^2, A, B و AB بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل تاثیر گذار می باشد (p<0/05). نسبت به سایر متغیرها تاثیر گذارتر است. معنی دار نشدن فاکتور عدم برازش (p<0/05)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده های مربوط به فعالیت آنتی اکسیدانی کل مطابقت دارد. رابطه آنتی اکسیدانی کل با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2=0/9881$ می باشد که نشان می دهد مدل توانسته ۹۸,۸۱ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند. معادله ۹ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت آنتی اکسیدانی کل را نشان می دهد.

df		P Value		Regression coefficient		
P	BP	P	BP	P	BP	
5	5	0/0031	<0/0001	0/7000	0/7197	model
1	1	0/6866	0/0001	0/0016	0/0299	A
1	1	0/0011	<0/0001	0/0258	0/463	B
1	1	0/4910	0/0064	0/0040	0/0182	AB
1	1	0/0025	0/0047	-0/0254	-0/0165	A ²
1	1	0/0036	0/0233	-0/0234	-0/0110	B ²
				0/7470	0/9263	Pred-R ²
				0/8963	0/9763	adj-R ²
3	3	0/6018	0/2633			Lack of fit

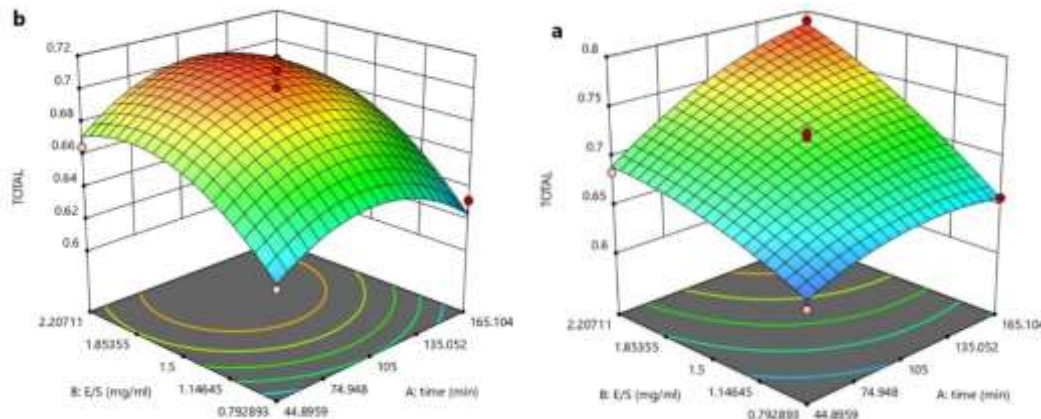
معادله ۹
 $0/7197+0/0182AB-0/0165A^2-0/0110B^2+0/0299A+0/0463B$

جدول ۷: تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل
Table 7: Effect of time and E/S ratio on total antioxidant activity

A : زمان، B: E/S، BP: بدون پیش تیمار و P: با پیش تیمار مایکروویو

طبق شکل ۳ الف، در زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S، بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل را خواهیم داشت و افزایش بیشتر زمان و غلظت آنزیم، بر قدرت آنتی اکسیدانی کل تاثیر منفی خواهد گذاشت. نتایج نشان می دهد که آنزیم آلکالاز با شکستن زنجیره پروتئینی توانسته است پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهنده تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال های آزاد به ترکیبات پایدارتر شده که در نتیجه قدرت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافته است. بنابراین زمان بالاتر و غلظت بیشتر آنزیم، سبب هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت الکترون دهنده شده و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل کاهش یافت. کاوه و همکاران ([Kaveh et al., 2019](#)) با هیدرولیز پروتئین شنبلیله بیان کردند با افزایش زمان و دما، میزان فعالیت آنتی اکسیدانی کل به طور قابل ملاحظه ای افزایش می یابد. الوند و همکاران ([Alvand et al., 2022](#)) به بررسی تاثیر زمان و نوع آنزیم بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین

هیدرولیز شده خربزه ترکمنی پرداختند و بیان کردند آنزیم پانکراتین در زمان ۱۸۰ دقیقه بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را از خود نشان می‌دهد.



شکل ۳- تاثیر زمان و E/S بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بدون پیش‌تیمار (الف) و تاثیر زمان و E/S بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با اعمال پیش‌تیمار (ب)

Figure 3- Effect of time and E/S on total antioxidant activities without pretreatment (a) and Effect of time and E/S on total antioxidant activities with pretreatment (b)

تاثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل با اعمال پیش‌تیمار

شکل ۳ ب، بیانگر بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد می‌باشد. همانطور که ملاحظه می‌شود با اعمال فرایند پیش‌تیمار میتوان در زمان کوتاه‌تر و غلظت آنزیم پایین‌تر نسبت به شرایط بدون پیش‌تیمار به بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل دست یافت. یانگ و همکاران (Yang et al., 2022) تاثیر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری محصولات آنزیمی پروتئین شیر را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که توان ۳۰۰ وات باعث بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌شود. داروزا و همکاران (da Rosa et al., 2019) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ زیتون با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت پرداختند و دریافتند که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با پیش‌تیمار مایکروویو در دمای ۸۶ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ دقیقه بدست می‌آید. تفاوت در توان و زمان مورد استفاده در مطالعات مختلف ممکن است با میزان حالیت مواد پروتئینی، مرتبط باشد (Yang et al., 2022).

نتیجه‌گیری

پپتیدهای زیست‌فعالی که از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی می‌باشند. دانه کدو می‌تواند بعنوان منبعی غنی از مواد مغذی و ترکیبات زیست‌فعال در صنایع غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد. نتایج نشان داد که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو در زمان کوتاه‌تر و غلظت آنزیم کمتر (۱۰۵ دقیقه و

E/S ۱,۵ درصد) نسبت به شرایط بدون پیش تیمار (زمان ۱۶۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد) بدست آمده است. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که استفاده از پیش تیمار مایکروویو، روشی مناسب برای صرفه جویی در زمان و غلظت آنزیم مورد استفاده در هیدرولیز آنزیمی می باشد.

منابع

1. Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H., & Kaveh, S. (2022). Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase. *Food Engineering Research*, 21(2), 75-90.
2. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., & Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18-24.
3. da Rosa, G. S., Vanga, S. K., Garipey, Y., & Raghavan, V. (2019). Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.). *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 58, 102234.
4. Devi, N. M., Prasad, R., & Palmei, G. (2018). Physico-chemical characterisation of pumpkin seeds. *International Journal of Chemical Studies*, 6(5), 828-831.
5. Dong, C., Li, F., Wang, L., Ma, X., Xu, J., & Kong, L. (2015). Microwave pretreatment of sunflower meal protein preparation of antioxidant peptides. *Sci. Technol. Food Ind.*, 36, 308-311.
6. Drotningvik, A., Mjøs, S. A., Pampanin, D. M., Slizyte, R., Carvajal, A., Remman, T., Høgøy, I., & Gudbrandsen, O. A. (2016). Dietary fish protein hydrolysates containing bioactive motifs affect serum and adipose tissue fatty acid compositions, serum lipids, postprandial glucose regulation and growth in obese Zucker fa/fa rats. *British Journal of Nutrition*, 116(8), 1336-1345.
7. Fan, X., Guo, H., Teng, C., Zhang, B., Blecker, C., & Ren, G. (2022). Anti-colon cancer activity of novel peptides isolated from in vitro digestion of quinoa protein in Caco-2 cells. *Foods*, 11(2), 194.
8. Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljica, N., Jakovetić Tanasković, S., Đukić Vuković, A., Mojović, L., & Knežević-Jugović, Z. (2021). Synergistic Effect of Enzyme Hydrolysis and Microwave Reactor Pretreatment as an Efficient Procedure for Gluten Content Reduction. *Foods*, 10(9), 2214.
9. Gohi, B. F. C. A., Du, J., Zeng, H.-Y., Cao, X.-j., & Zou, K. M. (2019). Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the Lotus seed protein. *Bioengineering*, 6(2), 28.
10. Han, R., Álvarez, A. J. H., Maycock, J., Murray, B. S., & Boesch, C. (2021). Comparison of alcalase-and pepsin-treated oilseed protein hydrolysates—Experimental validation of predicted antioxidant, antihypertensive and antidiabetic properties. *Current research in food science*, 4, 141-149.
11. Horax, R., Vallecios, M. S., Hettiarachchy, N., Osorio, L. F., & Chen, P. (2017). Solubility, functional properties, ACE- I inhibitory and DPPH scavenging

- activities of Alcalase hydrolysed soy protein hydrolysates. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), 196-204.
12. Horwitz, W., & Latimer, G. (2000). Association of official analytical chemists. *Gaithersburg, MD, USA*.
 13. Kanbargi, K. D., Sonawane, S. K., & Arya, S. S. (2017). Encapsulation characteristics of protein hydrolysate extracted from Ziziphus jujube seed. *International journal of food properties*, 20(12), 3215-3224.
 14. Kaveh, S., Sadeghi, M. A., Ghorbani, M., Jafari, M., & Sarabandi, K. (2019). Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(1).
 15. Li, D., Wang, J., Wu, X., Feng, C., & Li, X. (2013). Ultraviolet-assisted synthesis of hourglass-like ZnO microstructure through an ultrasonic and microwave combined technology. *Ultrasonics sonochemistry*, 20(1), 133-136.
 16. Lu, D., Peng, M., Yu, M., Jiang, B., Wu, H., & Chen, J. (2021). Effect of enzymatic hydrolysis on the zinc binding capacity and in vitro gastrointestinal stability of peptides derived from pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) seeds. *Frontiers in Nutrition*, 8, 647782.
 17. Maqsoudloua., Mahoonak, S., R., A., & Mohebodini. (2018). Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen. *Food Science and Technology*, 14(12), 227-240. <https://www.magiran.com/paper/1802801>
 18. Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*, 15(5), 218.
 19. MESHGINFAR, N., SADEGHI, M. A., Ziaifan, A., Ghorbani, M., & KASHANINEJAD, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology.
 20. Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries science*, 83, 317-331.
 21. Nkosi, C. Z. (2007). *Effect of pumpkin seed (cucurbita pepo) protein isolate on the antioxidant enzymes in ccl4-induced liver injury in low-protein fed rats*
 22. Nnamezie, A. A., Famuwagun, A. A., & Gbadamosi, S. O. (2021). Characterization of okra seed flours, protein concentrate, protein isolate and enzymatic hydrolysates. *Food production, processing and nutrition*, 3, 1-14.
 23. Nourmohammadi, E., SADEGHI, M. A., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2016). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin.
 24. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), 238-242.
 25. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex:

- specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
26. Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarroondo, M. I., Hessini, K., Guéguen, J., & Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(32), 7715-7721.
 27. Rezig, L., Chouaibi, M., Msaada, K., & Hamdi, S. (2012). Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed oil. *Industrial Crops and Products*, 37(1), 82-87.
 28. Samaranayaka, A. G., & Li-Chan, E. C. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of functional foods*, 3(4), 229-254.
 29. Sarkar, S. K., Hossain, M. T., Uddin, M. B., & Absar, N. (2007). Purification, Characterization and Physico- Chemical Properties of Three Galactose- Specific Lectins from Pumpkin (*Cucurbita Maxima*) Seed Kernels. *Journal of the Chinese Chemical Society*, 54(6), 1433-1442.
 30. Shaban Pour, B., Kord Jazi, M., Nazari, K., & Esmaceli Khariki, M. (2017). Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides. *Journal of food science and technology (Iran)*, 14(62), 45-31.
 31. Shandilya, U., & Sharma, A. (2017). Functional foods and their benefits: an overview. *J. Nutr. Health Food Eng*, 7(4), 353-356.
 32. Sitohy, M. Z., Desoky, E.-S. M., Osman, A., & Rady, M. M. (2020). Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. *Scientia Horticulturae*, 271, 109495.
 33. Taha, F. S., Mohamed, S. S., Wagdy, S. M., & Mohamed, G. F. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Science Journal*, 21(5), 651-658.
 34. Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of functional foods*, 18, 1138-1146.
 35. Villanueva-Lazo, A., Paz, S. M.-d. I., Rodriguez-Martin, N. M., Millan, F., Carrera, C., Pedroche, J. J., & Millan-Linares, M. d. C. (2021). Antihypertensive and Antioxidant Activity of Chia Protein Techno-Functional Extensive Hydrolysates. *Foods*, 10(10), 2297.
 36. Wang, S., Su, G., Zhang, X., Song, G., Zhang, L., Zheng, L., & Zhao, M. (2021). Characterization and exploration of potential neuroprotective peptides in walnut (*Juglans regia*) protein hydrolysate against cholinergic system damage and oxidative stress in scopolamine-induced cognitive and memory impairment mice and zebrafish. *Journal of agricultural and food chemistry*, 69(9), 2773-2783.
 37. Yang, C., Wang, B., Wang, J., Xia, S., & Wu, Y. (2019). Effect of pyrogalllic acid (1, 2, 3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (*Cucurbita* sp.) seed protein isolate. *Lwt*, 109, 443-449.
 38. Yang, X., Ren, X., & Ma, H. (2022). Effect of Microwave Pretreatment on the Antioxidant Activity and Stability of Enzymatic Products from Milk Protein.

- Foods 2022, 11, 1759. In: s Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published
39. Zakeri, K., Ghorbani, M., Mahoonak, A. S., Moayedi, A., & Maghsoudlou, Y. (2019). Determination of optimum conditions for the production of peptides with antioxidant and nitric-oxide inhibition properties from protein hydrolysis of pumpkin seed meals using pepsin enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(3).
 40. Zhang, X., Li, H., Wang, L., Zhang, S., Wang, F., Lin, H., Gao, S., Li, X., & Liu, K. (2021). Anti-inflammatory peptides and metabolomics-driven biomarkers discovery from sea cucumber protein hydrolysates. *Journal of Food Science*, 86(8), 3540-3549.
 41. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(8), 2714-2721.
 42. Salo-Viihinhen PP, Koivistoinen PE. Determination of protein in foods: comparison of net protein and crude protein (Nx 6.25) values. *Food Chembtry*. 1996; 57(1):27-31.

نسخه پلاس انتشار