نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۲۶-۱۴

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 14- 26

بهینه‌سازی شرایط تولید پپتیدهای ضداکسایش از هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو توسط تریپسین به روش سطح پاسخ

الهام نورمحمدی[۱]، علیرضا صادقی ماهونک*[۲]، محمد قربانی[۲]، مهران اعلمی[۲]، معصومه صادقی[۳]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۸/۰۹

چکیده

در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین دانه کدو*(Cucurbita pepo)* به‌منظور دستیابی به حداکثر خصوصیات مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو با استفاده از روش سطح پاسخ و با استفاده از طرح مرکب مرکزی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور غلظت آنزیم تریپسین ۲-۱ درصد، دمای ۴۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵-۲ ساعت به‌عنوان سطوح متغیرهای مستقل انتخاب شدند. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای دست یافتن به حداکثر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن به ترتیب دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵ ساعت و غلظت آنزیم ۱/۱۰٪ و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲/۰۵ ساعت و غلظت آنزیم ۲٪ و با قابلیت ضداکسایشی و شلاته‌کنندگی برابر با ۷۶/۲۸٪ و ۴۹/۶۱٪ بود که مشابهت زیادی با نتایج پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار (۷۵/۸۹٪ و ۵۰/۸۴٪) داشت. مقدار R^2، ۰/۹۱۸۴ و ۰/۹۷۶۱ و R^2 تعدیل شده ۰/۱۳۳۳ و ۰/۱۸۲۷ به ترتیب برای خاصیت مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن توسط نرم‌افزار تخمین زده شد. بر طبق نتایج بدست آمده پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو از قابلیت ضداکسایشی و شلاته‌کنندگی مناسبی برخوردار بود.

واژه‌های کلیدی: دانه کدو، هیدرولیز آنزیمی، تریپسین، روش سطح پاسخ

مقدمه

پروتئین‌ها یک منبع غذایی مهم برای تغذیه انسان به‌شمار می‌روند. این ترکیبات تأمین‌کننده نیتروژن، اسیدهای آمینه و انرژی لازم برای عملکرد طبیعی ارگان‌های بدن می‌باشند. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها یکی از راه‌های مؤثر برای بهبود ویژگی‌های شیمیائی، فیزیکی و کاربردی این ترکیبات است. از هیدرولیز آنزیمی به‌منظور تولید بخش‌های پروتئینی و پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌شود. این ترکیبات زنجیره‌های پپتیدی با اندازه ۱۵-۲ اسیدآمینه هستند که قابل استحصال از هیدرولیز منابع حیوانی مختلف مانند کازئین، آب پنیر، گوشت و... و منابع گیاهی مانند گلوتن گندم، سویا، اسفناج، لوبیا و... می‌باشند. پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئینی دارای ویژگی‌های بیولوژیک متنوعی مانند خواص ضدفشار خون، ضداکسایش، ضدکلسترول، ضدباکتری، ضدسرطان، ضدترومبوز و... می‌باشند که این ویژگی‌ها منجر به مورد توجه واقع شدن پروتئین‌ها به‌ویژه انواع گیاهی در بخش غذا و دارو به‌منظور تولید و تخلیص پپتیدهای زیست فعال شده است. یکی از خواص منحصر به فرد پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها خواص ضداکسایش این ترکیبات است (Torruco-Uco*et al.*,2009). پراکسیداسیون چربی‌ها یکی از دلایل اصلی فساد مواد غذایی در طول فرایند و نگهداری است. در این مورد افزودن ضداکسایندهها یک روش مؤثر برای افزایش طول عمر موادغذایی حاوی چربی به‌شمار می‌رود. در حال حاضر رغبت مصرف‌کنندگان به ضداکسایندههای مصنوعی به دلیل تصوری که در مورد اثر سرطان‌زائی این ترکیبات وجود دارد کاهش یافته است (Jayaprakasha *et al.*,2001). بنابراین در سال‌های اخیر تلاش‌های گسترده‌ای برای یافتن ضداکسایندههای طبیعی به ویژه ضداکسایندههایی با منشأ گیاهی به دلیل وزن ملکولی پائین، جذب سریع و فعالیت بالای این ترکیبات انجام شده است. پپتیدهای زیست فعال دارای ساختار ساده‌تر بوده، پایداری بیشتری را در شرایط مختلف نشان داده و منجر به واکنش‌های خطرناک مربوط به سیستم ایمنی بدن نمی‌گردند. پپتیدهای زیست فعال با ۱۰۰-۲ اسید آمینه از

۱و ۲- به ترتیب دانش‌آموخته دکترا و دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.
۳- استادیار، مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان.
(*- نویسنده مسئول: (Email: sadeghiaz@yahoo.com
DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.45423

هیدرولیز آنزیمی منابع غذایی مختلف توسط انواع پروتئاز تولید شده‌اند. این پپتیدها دارای ویژگی‌هایی مانند ممانعت از پراکسیداسیون و حذف رادیکال‌های آزاد می‌باشند.

کدو *(Cucurbita pepo)* یکی از گیاهانی است که به شکل گسترده‌ای در سرتاسر جهان کشت شده و به‌عنوان غذا و دارو مورد استفاده قرار می‌گیرد. آرد چربی‌گیری شده دانه کدو حاوی ۵۵/۴٪ پروتئین، ۲۸/۱٪ فیبر و ۷/۲۳٪ خاکستر بوده، اسیدهای چرب اصلی آن لینولئیک (۴۳/۱٪) و اولئیک اسید (۳۷/۸٪) می‌باشند و هر ۱۰۰ گرم از این ماده ۲/۸۳ مگاژول انرژی تولید می‌کند (Lazos, 1986).

دانه کدو منبعی مغذی از پروتئین و فیتوسترول به‌شمار می‌رود و حاوی میزان قابل توجهی از مواد معدنی مانند روی، پتاسیم، کلسیم، منیزیوم، آهن، مس، فسفر و بتاکاروتن است. ایزوله پروتئین کدو غنی از ضداکسایندهها بوده و در کاهش اثرات مخرب مربوط به سوء تغذیه مؤثر است (Mohamed *et al.,* 2009). مهرگان و همکاران (۱۳۹۲) با بررسی تأثیر آنزیم آلکالاز بر خواص ضداکسایش پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس *(Carassiuscarassius)*، گزارش دادند که بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH در شرایطی منطبق با دمای ۴۸/۱۱ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه و فعالیت آنزیمی ۶۴/۴۳ واحد آنسون مشاهده شد. هیدرولیز پروتئین ماهی گیش خط زرد *(Selaroidesleptolepis)* توسط آلکالاز و فلیورزایم نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت شلاته‌کنندگی در نمونه‌های تولید شده توسط هر دو آنزیم افزایش یافت، در حالی‌که در درجه هیدرولیز یکسان، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط فلیورزایم قدرت شلاته کنندگی بیشتری نسبت به نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آلکالاز داشتند (Klompong *et al.,* 2007).وجود قدرت احیاکنندگی، مهار رادیکال سوپراکسید، مهار رادیکال DPPH و قدرت شلاته‌کنندگی برابر با ۰/۶۹، ۶۷٪، ۷۹/۷۱٪ و ۶۵/۱۵٪ به ترتیب در غلظت‌های ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۰/۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در پروتئین هیدرولیز شده یونجه توسط آلکالاز گزارش شد (Xie *et al.,* 2008).

یکی از موارد کاربرد دانه کدو تولید روغن از این منبع می‌باشد. کنجاله حاصل از روغن‌کشی دانه کدو حاوی درصد بالائی پروتئین است که در حال حاضر فرایند خاصی بر روی آن انجام نشده و با قیمت بسیار ارزان به مصرف خوراک دام می‌رسد. با توجه به پتانسیل بالای این ماده در تولید پپتیدهای زیست فعال، در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی کنجاله دانه کدو به‌منظور تولید پپتیدهای زیست فعال با بیشترین اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن توسط آنزیم تریپسین مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

مواد

کنجاله دانه کدو *Cucurbitapepo con. Pepo var. (Styriaca)* از شرکت سویا بین گرگان خریداری شد. آنزیم تریپسین و رادیکال DPPH[1] از شرکت سیگما و فروزین، کلرید آهن، سود، اسید کلریدریک و اتانول از شرکت مرک تهیه شدند و تمام مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

آماده‌سازی کنجاله کدو

پس از حذف مواد خارجی، کنجاله توسط دستگاه آسیاب (Perten,3100 ساخت آلمان) به آرد تبدیل شد. آرد حاصل به مدت ۱۶ساعت با حلال هگزان به نسبت ۱:۳ چربی‌گیری و در دمای اتاق خشک، و تا مرحله استخراج پروتئین در یخچال نگهداری شد.

تهیه کنسانتره پروتئین دانه کدو

کنجاله دانه کدو چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول توسط محلول سود ۱ نرمال به ۱۰ رسانده شده و به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دورg ۵۰۰۰ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال‌دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) قرار گرفت. به‌منظور رسوب پروتئین‌های دانه کدو سوپرناتانت حاصل توسط اسیدکلریدریک ۱ نرمال به pH ۵ رسانده شد و تحت شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت (Zivanovic *et al.,* 2011).

هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو

به‌منظور هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو، کنسانتره به نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر فسفات (pH=۸) پراکنده شد. سپس آنزیم در غلظت ۱٪ تا ۲٪ افزوده شد و هیدرولیز در محدوده دمائی و زمانی به‌ترتیب ۴۵-۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۵-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کره جنوبی) با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد و برای حذف ترکیبات اضافه سانتریفوژ کردن در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (Villanueva *et al.,* 1999).

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای این منظور۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه‌ی پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶٪ مخلوطشد، مخلوط به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و

1 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazy

در تاریکی نگهداشته شد. درنهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (Bougatef *et al.*, 2009).

در نمونه کنترل به جای محلول پروتئین هیدرولیز شده از ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی فعالیت رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید:

(۱) ۱۰۰× (جذب شاهد/ (جذب نمونه- جذب شاهد)) =درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال

بررسی خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو

به این منظور ۴/۷ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۰/۱ میلی لیتر از محلول کلرید آهن II (۲ میلی‌مولار) و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین[1] (۵ میلی‌مولار) مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در انتها جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت شد. در نمونه‌ی کنترل بجای نمونه‌ی پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی از رابطه‌ی زیر بدست آمد (Almeida *et al.*, 1994).

(۲) ۱۰۰× (جذب کنترل/ (جذب نمونه- جذب کنترل)) =درصد شلاته‌کنندگی

بهینه‌سازی فرایند

به‌منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر خواص ضداکسایش از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ(RSM)[2] با طرح مرکب مرکزی(CCD)[3]برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم (x_1)، دما (x_2) و زمان هیدرولیز (x_3) در سه سطح (۱+، ۰، ۱-) استفاده شد. حدود هر کدام از متغیرهای مستقل با توجه به نتایج آزمون‌های آزمایشی بدست آمد. پاسخ‌های مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو بودند. ۲۰ تیمار به‌صورت تصادفی با شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم‌افزار انتخاب شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ و تیمارهای مربوطه در جدول ۲ ارائه شده است. مدل رگرسیونی۱ و ۲ به‌منظور پیش‌بینی پاسخ‌های اول و دوم (مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو) بصورت معادلات ذیل پیشنهاد شد:

$$Y= b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 \quad (۳)$$

$$Y= b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 + b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + b_{23}x_2x_3 \quad (۴)$$

در معادله فوق، y پاسخ یا متغیر وابسته (فعالیت مهارکنندگی رادیکال یا شلاته‌کنندگی یون فرو در مقدار واقعی)، b_0مقدار ثابت وb_1، b_2 وb_3 اثرات خطی[4]، b_{11}، b_{22} و b_{33} اثرات درجه دوم[5] و b_{12}، b_{13} وb_{23} اثرات متقابل[6] می‌باشند. جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، ضرایب رگرسیونی، رسم نمودارها و بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار Design Expert انجام گرفت و معنی‌داری آزمون‌ها از طریق محاسبه F-Value در سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه سازی فعالیت ضداکسایش پروتئین دانه کدو

متغیرهای مستقل	حدود تغییرات		
	+۱	۰	-۱
غلظت آنزیم (٪)	٪۲	٪۱/۵	٪۱
دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	۴۵	۴۰	۳۵
زمان هیدرولیز (ساعت)	۵	۳/۵	۲

نتایج و بحث

ویژگی‌های کنجاله کدو در جدول ۳ آمده است. اثر سه فاکتور غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو در جدول ۴ ارائه شده است.

معادله‌های خطی ۵ و ۶ با در نظر گرفتن ضرایب رگرسیونی به ترتیب برای خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو و با توجه به معنی‌داری ضرایب پیشنهاد شد:

(۵) (آنزیم × ۲۰/۸۶) – ۱۰۹/۳۶۲۵= فعالیت مهار رادیکال DPPH (دما× ۱/۱۹) – (زمان × ۶/۲۴) +

(۶) (آنزیم × ۳۹/۰۵) – ۵۴۴/۴۷= فعالیت شلاته‌کننده یون فرو + (دما× دما ×۰/۳۱) + (زمان × زمان × ۱/۷۹) + (آنزیم× آنزیم × ۱۰/۹۲) + (دما× ۲۴/۲۵) – (زمان × ۱۳/۹۴) –

مقدارR^2 برای معادله اول ۰/۹۱۸۴ و برای معادله دوم ۰/۹۷۶۱ و میزان R^2 تعدیل شده معادله اول و دوم به‌ترتیب ۰/۹۰۳۱ و ۰/۹۵۴۷ بود که نشان‌دهنده مناسب بودن توزیع داده‌ها است. به‌علاوه فاکتور عدم برازش که معیاری برای بررسی مناسب بودن مدل ارائه شده می‌باشد، به ترتیب میزان ۰/۱۳۳۳ و ۰/۱۸۲۷ را در معادله اول و دوم به خود اختصاص داد. بالاتر بودن میزان عدم برازش از سطح احتمال معنی‌داری (۰/۰۵) یا به عبارت دیگر بی‌معنی بودن این فاکتور نشان‌دهنده مناسب بودن مدل پیشنهاد شده و برازش مدل بر اساس پاسخ‌های در نظر گرفته شده می‌باشد. برازش مناسب نشان‌دهنده این

1Ferrozine
2Response Surface Methodology
3 Central Composite Designs

4 Linear Effects
5 Quadratic Effects
6 Interaction Effects

است که مدل ارائه شده توانائی توضیح در تغییرات داده‌ها را دارد (مهرگان و همکاران، ۱۳۹۲).

جدول ۲- تیمارهای تصادفی و فعالیت ضداکسایش پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو

تیمار	غلظت آنزیم (٪)	دمای هیدرولیز (C)	زمان هیدرولیز (h)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)	فعالیت شلاته‌کنندگی یون فرو (٪)/
۱	۱	۳۵	۵	۷۸	۳۱/۴۴
۲	۲	۳۵	۲	۳۸/۰۳	۳۸/۶۳
۳	۲	۳۵	۵	۶۱/۲۴	۴۰/۶۷
٤	۱/۵	۳۵	۳/۵	۶۲/۴۷	۳۱/۶۹
٥	۱	۳۵	۲	۵۶/۷۷	۳۷/۸۸
٦	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۸/۹۱	۲۷/۶۷
۷	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۰/۱۱	۲۸/۰۰
۸	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۴/۸۳	۲۶/۹۴
۹	۱/۵	۴۰	۳/۵	۵۰	۲۵/۶۹
۱۰	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۷/۹۳	۲۵
۱۱	۱/۵	۴۰	۳/۵	۴۹/۴۷	۲۸/۱۲
۱۲	۱	۴۰	۳/۵	۶۵/۲۹	۲۸/۸۹
۱۳	۱/۵	۴۰	۵	۵۶/۳۳	۳۱/۲۳
۱٤	۱/۵	۴۰	۲	۴۴/۹۳	۳۳/۸۹
۱۵	۲	۴۰	۳/۵	۴۴/۳۷	۳۴/۶۲
۱٦	۱	۴۵	۲	۴۸/۳۴	۴۴/۵۶
۱۷	۲	۴۵	۲	۲۹/۶۴	۵۱/۹۸
۱۸	۱	۴۵	۵	۷۲/۵۱	۴۱/۷۳
۱۹	۲	۴۵	۵	۴۳/۲۹	۴۸/۲۸
۲۰	۱/۵	۴۵	۳/۵	۴۳/۱۹	۴۱/۰۰

جدول ۳- ویژگی‌های کنجاله کدو

ویژگی*	درصد
پروتئین	۴۸/۵۷ ± ۳/۵۱
چربی	۸/۹۳ ± ۰/۵۸
رطوبت	۶/۲۴ ± ۰/۵۲
خاکستر	۷/۱۱ ± ۰/۱۷

* نتایج میانگین سه تکرار هستند

تأثیر متغیرهای مستقل بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

اثر متقابل غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر مهار رادیکال DPPH در شکل ۱ آورده شده است. افزایش غلظت آنزیم منجر به کاهش در قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد شد. افزایش دمای هیدرولیز نیز منجر به کاهش در این ویژگی اما با شدت اثر کمتری گردید، در حالی‌که بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد.

از خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH برای بررسی قابلیت هیدروژن دهندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده می‌شود. حذف رادیکال آزاد مکانیزمی است که توسط آن ترکیبات ضداکسایش قادر هستند از واکنش‌های اکسایشی جلوگیری نمایند. رادیکال DPPH یکی از معدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانی‌که این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن‌دهنده مانند یک ضداکسایندە قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به یک ترکیب پایدار تبدیل شده و در نتیجه‌ی مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و کاهش میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد

(طاهری و همکاران، ۱۳۹۱).

جدول ٤- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مربوط به آزمون شلاته‌کنندگی یون فرو و مهار رادیکال DPPH

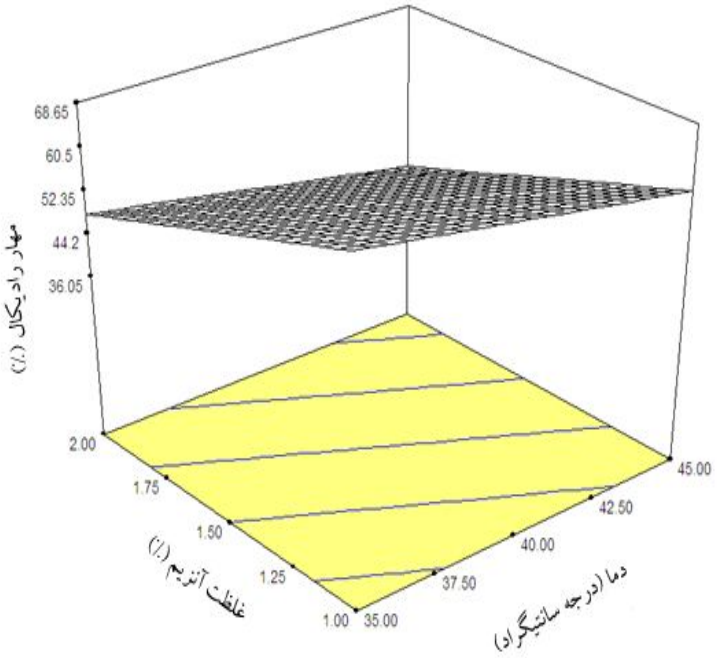
فاکتور	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F-Value	P
شلاته‌کنندگی یون فرو					
مدل	۹	۱۱۵۳/۷۸	۱۲۸/۲۰	۴۵/۴۶	< ۰/۰۰۰۱
غلظت آنزیم	۱	۹۴/۱۳	۹۴/۱۳	۳۳/۳۸	۰/۰۰۰۲
زمان	۱	۱۸/۴۷	۱۸/۴۷	۶/۵۵	۰/۰۲۸۴
دما	۱	۲۲۳/۱۶	۲۲۳/۱۶	۷۹/۱۴	< ۰/۰۰۰۱
آنزیم × آنزیم	۱	۲۰/۵۱	۲۰/۵۱	۷/۲۷	۰/۰۲۲۴
زمان × زمان	۱	۴۴/۷۹	۴۴/۷۹	۱۵/۸۹	۰/۰۰۲۶
دما × دما	۱	۱۶۸/۲۱	۱۶۸/۲۱	۵۹/۶۵	< ۰/۰۰۰۱
آنزیم × زمان	۱	۷/۲۴	۷/۲۴	۲/۵۷	۰/۱۴۰۲
آنزیم × دما	۱	۱/۹۹	۱/۹۹	۰/۷۱	۰/۴۲۰۵
زمان × دما	۱	۰/۵۷	۰/۵۷	۰/۲۰	۰/۶۶۳۴
باقیمانده	۱۰	۲۸/۲	۲/۸۲		
عدم برازش	۵	۱۹/۸۳	۳/۹۷	۲/۳۷	۰/۱۸۲۷
خطای خالص	۵	۸/۳۷	۱/۶۷		
کل	۱۹	۱۱۸۱/۹۸			
مهار رادیکال DPPH					
مدل	۳	۲۳۲۰/۴۰	۷۷۳/۴۷	۶۰/۰۵	< ۰/۰۰۰۱
غلظت آنزیم	۱	۱۰۸۸/۶۸	۱۰۸۸/۶۸	۸۴/۵۲	< ۰/۰۰۰۱
دما	۱	۳۵۴/۵۰	۳۵۴/۵۰	۲۷/۵۲	< ۰/۰۰۰۱
زمان	۱	۸۷۷/۲۲	۸۷۷/۲۲	۶۸/۱	< ۰/۰۰۰۱
باقیمانده	۱۶	۲۰۶/۰۹	۱۲/۸۸		
عدم برازش	۱۱	۱۷۷/۲۵	۱۶/۱۱	۲/۷۹	۰/۱۳۳۳
خطای خالص	۵	۲۸/۸۳	۵/۷۷		
کل	۱۹	۲۵۲۶/۴۹			

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 فعالیت ضداکسایش به شمار می‌روند (مهرگان و همکاران، ۱۳۹۲).کاهش قابلیت مهارکنندگی رادیکال با افزایش غلظت آنزیم می‌تواند به علت اثر هضم‌کنندگی آنزیم بر پپتیدهای تولیدی باشد. با افزایش غلظت آنزیم، امکان اثر بیشتر بر ماده پروتئینی افزایش یافته و این امر منجر به شکسته شدن تعدادی از پپتیدهای ضداکسایش تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد (مشکین‌فر و همکاران، ۱۳۹۳). در تحقیق انجام شده توسط Kamau و Lu (۲۰۱۱) بر هیدرولیز کنسانتره پروتئین آب پنیر توسط تریپسین، افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا از ۱ تا ۳٪ تأثیر معناداری بر افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نداشت. به‌علاوه رابطه مستقیمی میان درجه هیدرولیز و قدرت مهار رادیکال DPPH در این نمونه‌ها مشاهده نشد. بر طبق گزارش این محققین دما، pH و غلظت سوبسترا از عوامل تأثیرگذار بر درجه هیدرولیز و قدرت مهار رادیکال DPPH هستند. در تحقیق انجام شده توسط Wiriyaphan و همکاران (۲۰۱۲) بر هیدرولیز سوریمی توسط آلکالاز، پپسین، تریپسین و پروتئیناز حاصل از *Virgibacillus* نیز وجود رابطه مستقیم میان درجه هیدرولیز و خاصیت ضداکسایش پپتیدهای تولیدی تأیید نشد و ساختار اسید آمینه‌های موجود در پپتیدها تأثیر بیشتری در ایجاد خاصیت ضداکسایش داشت.

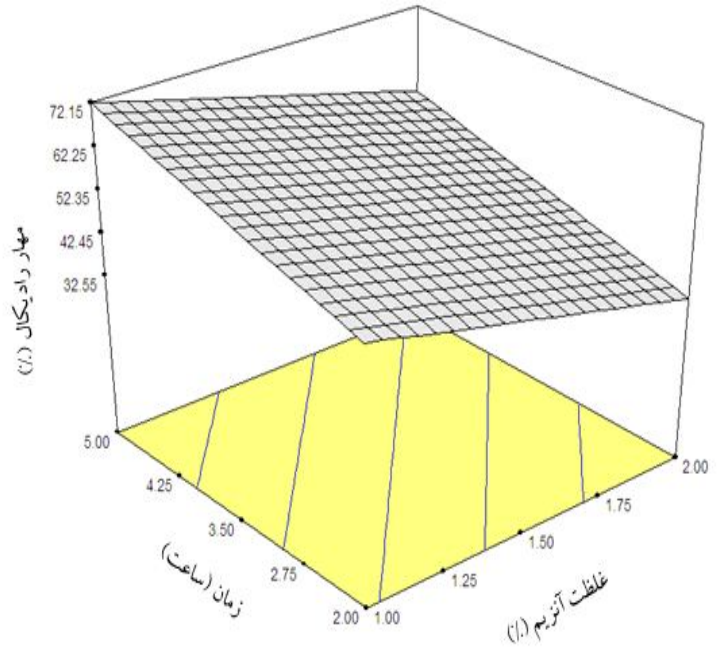
تأثیر تغییرات غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH

با افزایش غلظت آنزیم میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH کاهش یافت، در حالی‌که افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال گردید (شکل ۲). کم بودن خاصیت ضداکسایش نمونه‌های هیدرولیزشده در مراحل اولیه هیدرولیز را می-

توان به کم بودن فرصت آنزیم برای اثرگذاری بـر سوبسـترا و تولیـد پپتیدهای با قابلیت ضداکسایش نسبت داد. با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیـت حـذف رادیکـال‌هـای آزاد توسط پپتیدها افزوده می‌شود.



شکل ۱- نمودار سه‌بعدی و کانتور تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH



شکل ۲: تأثیر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

به عقیده محققین پپتیدهای با وزن ملکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و تعداد ۲۰-۲ اسیدآمینه در زنجیره پپتیدی خاصیت ضداکسایش بیشتری از خود بروز می‌دهند (Amza *et al.*,2013; Ren *et al.*, 2010). در تحقیقی که توسط Amza و همکاران (۲۰۱۳) بر پروتئین هیدرولیز شده حاصل از نان زنجبیلی انجام گرفت، هیدرولیز دو مرحله‌ای توسط آنزیم پپسین و تریپسین منجر به افزایش فعالیت ضداکسایشی در طول ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز گردید. در تحقیق انجام شده توسط Tang و همکاران (۲۰۰۹) بر هیدرولیز پروتئین گیاه شاهدانه توسط شش پروتئاز آلکالاز، فلیورزایم، نوتراز، پروتامکس، پپسین و تریپسن نتایج مشابه در مورد تأثیر زمان هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد بدست آمد. بنابر گزارش این محققین فرایند هیدرولیز آنزیمی می‌تواند به‌عنوان یک تکنیک مؤثر در تولید محصولات ارزش افزائی شده مورد استفاده قرار گیرد.در اثر تخریب ساختمان طبیعی پروتئین‌ها با پیشرفت هیدرولیز، احتمال باز شدن ساختار پروتئین و قرار گرفتن اسیدهای آمینه فعال در سطح وجود دارد، و این اسیدهای آمینه می‌توانند با گونه‌های فعال رادیکال وارد واکنش شده و آنها را غیرفعال نمایند (sun *et al.*,2011). این موضوع نشان داده شده است که با افزایش زمان هیدرولیز از ۲ به ۴ ساعت شاخصIC50 کاهش و بنابراین میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH افزایش می‌یابد که با نتایج بدست آمده در این تحقیق مطابقت دارد (Tang *et al.*, 2009).

تأثیر متغیرهای مستقل بر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو

نقش زمان - غلظت آنزیم بر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو

نقش زمان و غلظت آنزیم بر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو در شکل ۳ نشان داده شده است. بیشترین اثر شلاته‌کنندگی یون فرو در غلظت ۲٪ آنزیم و زمان ۲ ساعت هیدرولیز مشاهده شد و کمترین میزان این ویژگی مربوط به غلظت آنزیم ۱٪ و زمان ۳/۵ ساعت هیدرولیز بود.

فروزین قادر به ایجاد یک کمپلکس بنفش رنگ با یون آهن است. زمانی‌که ترکیب شلاته کننده‌ای در محیط وجود داشته باشد، میزان یا غلظت یون آهن کاهش یافته و از شدت رنگ این کمپلکس کاسته خواهد شد. بنابراین با افزایش قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن شدت رنگ کمپلکس ایجاد شده و در نتیجه میزان جذب در ۵۶۲ نانومتر کاهش خواهد یافت

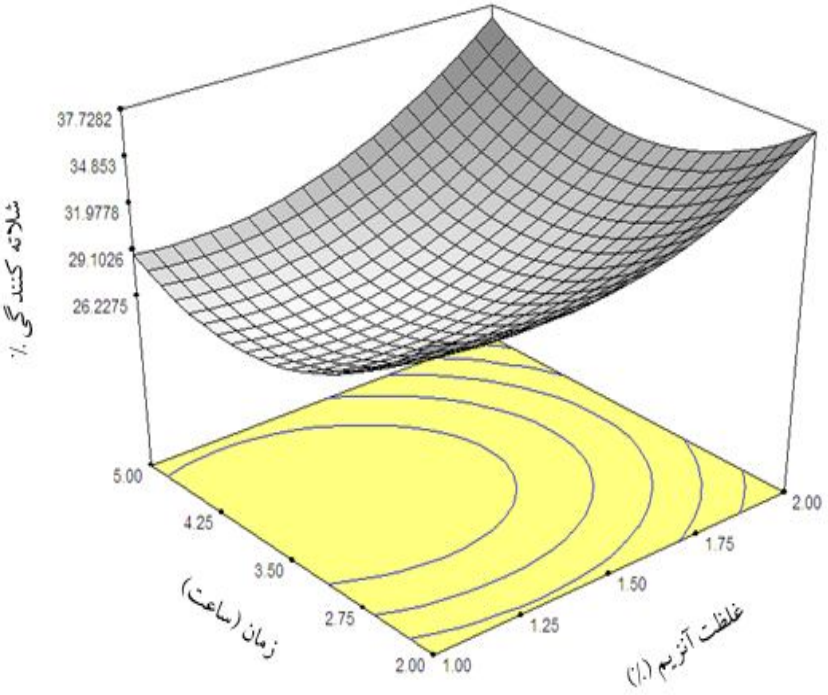
بطور کلی زمانی‌که یک ترکیب خاص تحت تأثیر تیمارهای متفاوتی قرار گیرد، پپتیدهایی با خواص متفاوت ایجاد خواهند شد، بنابراین با اعمال شرایط مختلف می‌توان پپتیدهای متفاوتی را از یک نمونه خاص تولید کرد. این تیمار ممکن است بر روی ساختار پروتئین و در نقاط مختلفی از زنجیره پپتیدی اثر بگذارد. درجه هیدرولیز نیز به شکل عمیقی بر طول زنجیره پپتیدی و معرض‌گیری گروه‌های اسیدهای آمینه انتهایی در زنجیره تأثیر خواهد داشت (Khantaphant *et al.*,2011).گزارش شده است که برخی از اسیدهای آمینه و مشتقات آنها مانند سیستئین، هیستیدین، تریپتوفان، لایزین، آرژنین، لوسین، تیروزین و والین دارای فعالیت ضداکسایشی هستند (Xie *et al.*, 2008). به علاوه تری‌پپتیدهایی که حاوی اسیدهای آمینه تریپتوفان یا تیروزین در انتهای C خود هستند قدرت ضداکسایش قابل ملاحظه‌ای از خود بروز می‌دهند(Cumby *et al.*, 2008).

تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر مهار یون آهن

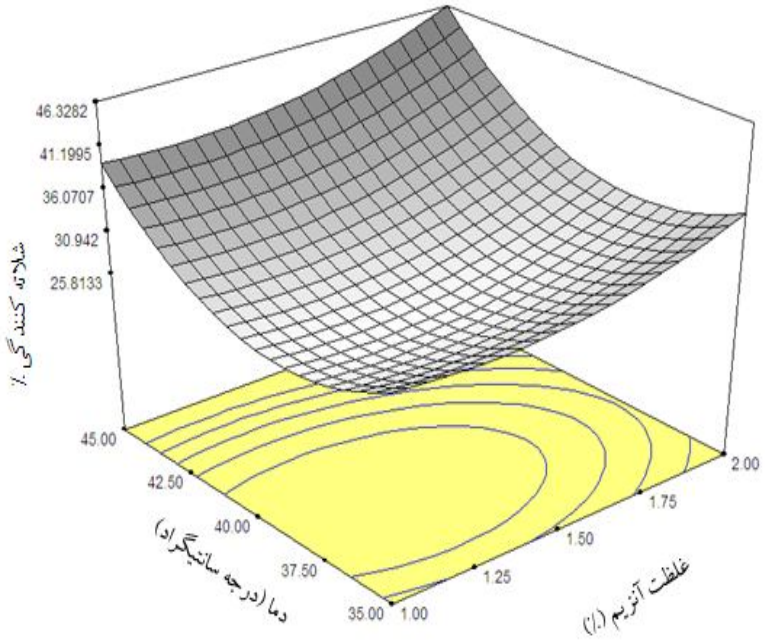
همانگونه که اشاره شد غلظت آنزیم در نواحی میانی کمترین اثر را در ممانعت از فعالیت یون فرو داشت، در حالی‌که این میزان در غلظت ۲٪ آنزیم به حداکثر خود رسید. از دمای ۳۵ تا ۴۰ درجه سانتی‌گراد یک کاهش ناچیز و از ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد یک افزایش شدید در قدرت شلاته‌کنندگی یون فرو مشاهده شد و حداکثر قابلیت شلاته‌کنندگی مربوط به دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد بود (شکل ۴).

این موضوع به اثبات رسیده است که یون‌های فلزی نقش مهمی را درشکل‌گیری واکنش‌های اکسایش بر عهده دارند. یون آهن قادر به کاتالیز کردن واکنشی به نام Haber–Weiss است که منجر به تحریک آنیون سوپراکسید و شکل‌گیری گونه‌های خطرناک رادیکال هیدروکسیل می‌گردد. این رادیکال‌ها سریعا با بافت‌های زنده وارد واکنش شده و منجر به ایجاد صدمات جدی خواهند شد. گزارش شده است که مهارشدن رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق ضداکساینده‌ها عمدتا از طریق تشکیل پیوند با یون‌های فلزی امکان‌پذیر است. از آنجائی‌که دخالت در فعالیت کاتالیتیک یون‌های فلزی ممکن است بر فعالیت‌های اکسایشی تأثیرگذار باشد، اندازه‌گیری قابلیت شلاته‌کنندگی نقش مهمی را در بررسی توانائی ترکیب در مهار رادیکال‌های آزاد دارد (Xie *et al.*, 2008).

این موضوع مکررا تأکید شده است که پپتیدهای مختلف با اندازه و توالی اسیدآمینه‌متفاوت، وجود گروه‌های خاص در زنجیره جانبی اسیدهای آمینه و یا وجود ساختارهای خاص پپتیدی نقش مهمی در ایجاد خواص شلاته‌کنندگی دارند (Nalinanon *et al.*, 2011; Taha *et al.*, 2013; Khantaphant *et al.*, 2011). تصور بر این است که اسیدهای آمینه تریپتوفان، متیونین و تیروزین و به دنبال آنها سیستئین، هیستیدین و فنیل آلانین دارای قابلیت بالایی در شلاته کردن یون‌های فلزی هستند (Zhu *et al.*,2006).با توجه به گزارشات می‌توان نتیجه گرفت در اثر هیدرولیز در غلظت ۲٪ آنزیم، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۲ ساعت احتمال تشکیل این دسته از پپتیدها بیشتر بوده است.



شکل ۳- تأثیر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو



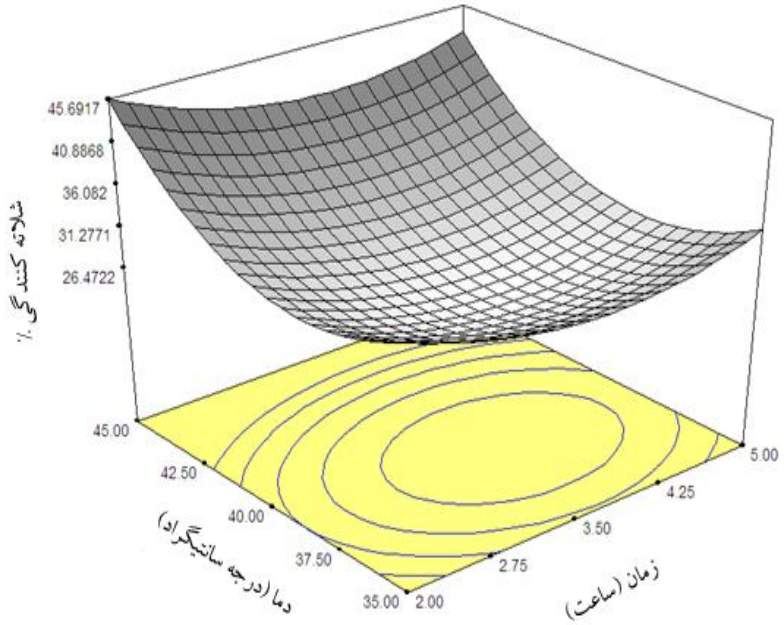
شکل ٤- نمودار سه‌بعدی و کانتور خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو در غلظت آنزیم و دماهای متفاوت

در تحقیقاتی که توسط Jamdar و همکاران (۲۰۱۰) و Hmidet و همکاران (۲۰۱۱) به ترتیب در مورد خواص ضداکسایشی پروتئین نخود و پروتئین ده پا *(Sepia officinalis)* انجام گرفت، خاصیت شلاته‌کنندگی با افزایش درجه هیدرولیز افزایش معنی‌داری نشان داد و پیشنهاد شد که درجات هیدرولیز بالاتر منجر به شکسته شدن پیوندهای پپتیدی بیشتر و ایجاد خاصیت ضداکسایش بالاتر خواهد شد

اثر زمان و دمای هیدرولیز بر شلاته‌کنندگی یون آهن

شکل ۵ نمودار سه بعدی و کانتور اثر متقابل زمان و دمای هیدرولیز را بر قدرت شلاته‌کنندگی نشان می‌دهد. در قسمت‌های میانی یعنی زمان ۳/۵ ساعت حداقل شلاته‌کنندگی مشاهده شد و در دو انتها به ویژه در زمان ۲ ساعت قدرت شلاته‌کنندگی از سایر زمان-ها بیشتر بود. شرایط مشابه در مورد اثر دما نیز مشاهده شد. به این صورت که کمترین اثر شلاته‌کنندگی مربوط به دمای میانی (۴۰ درجه سانتی‌گراد) بود و از دمای ۴۰ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد افزایش شدیدی در قدرت شلاته‌کنندگی دیده شد.

نتایج تحقیقات انجام شده وجود یک تضاد را میان قابلیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو نشان داده است. به عبارت دیگر الزاما یک رابطه مستقیم میان این دو ویژگی وجود نخواهد داشت. مقایسه نتایج حاصل از بررسی قدرت شلاته‌کنندگی یون فرو و قدرت احیاکنندگی رادیکال DPPH در این تحقیق نیز وجود چنین تضادی را تأئید کرد. با توجه به جدول ۳ بیشترین خاصیت احیاکنندگی رادیکال DPPH (۷۸٪) مربوط به غلظت ۱٪ آنزیم، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ ساعت بود که اثر شلاته‌کنندگی نسبتا ضعیفی (۳۱/۴۴٪) از خود بروز داد. در مقابل بالاترین قدرت شلاته‌کنندگی در غلظت ۲٪ آنزیم، زمان ۲ ساعت و دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد به میزان ۵۱/۹۸٪ مشاهده شد که معادل با قدرت مهارکنندگی رادیکال ۲۹/۶۴٪ بود. این موضوع احتمالا مربوط به ایجاد پپتیدهایی با اندازه و ترکیب متفاوت بوده است (Je *et al.*,2009). کاهش خاصیت شلاته‌کنندگی از زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت را می‌توان به کاهش در طول زنجیره‌های پپتیدی نیز مربوط دانست. به علاوه افزایش این ویژگی از زمان ۳/۵ تا ۵ ساعت هیدرولیز ممکن است به علت افزایش معرض‌گیری بیشتر مکان‌های فعال و اسیدهای آمینه مؤثر مانند هیستیدین که قادر به واکنش دادن با یون آهن و شلاته‌کردن آن می‌باشند، باشد (Tang *et al.*, 2009).



شکل ۵- نمودار کانتور و سه‌بعدی اثر زمان و دمای هیدرولیز بر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو

اعتبارسنجی مدل

برای بررسی میزان اعتبار مدل ارائه شده، تیمارهای بهینه پیشنهاد شده توسط نرم افزار Design Expert از نظر خواص مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو مورد بررسی قرار گرفتند. شرایط بهینه از نظر خاصیت مهار رادیکال DPPH مربوط به دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۵ ساعت هیدرولیز و غلظت آنزیم ۱٪ بود

که قابلیت ضداکسایش ۷۵/۸۹٪ برای این تیمار توسط نرم افزار تخمین زده شد. بهینه شرایط از نظر خاصیت شلاته‌کنندگی یون فرو نیز در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲/۰۵ ساعت و غلظت آنزیم ۲٪ و خاصیت شلاته‌کنندگی۵۰/۸۴٪ توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. به‌منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده، تیمارهای بهینه در دو تکرار تولید و خواص مذکور در سه تکرار مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. قابلیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در شرایط بهینه برابر با ۷۶/۲۸٪ و خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن برابر با ۴۹/۶۱٪ بدست آمد. این نتایج نشان داد که مدل ارائه شده توسط نرم‌افزار قادر به پیش‌بینی تأثیر فاکتورهای زمان، دما و غلظت آنزیم بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بود.

نتیجه‌گیری

این تحقیق امکان استفاده از فرایند هیدرولیز آنزیمی به‌منظور ارزش افزائی به یک فراورده جانبی حاصل از روغن‌کشی دانه کدو (کنجاله دانه کدو) را تأیید کرد. نتایج تحقیق نشان داد که از طریق بهینه کردن شرایط هیدرولیز پروتئین مانند تغییر در غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز می‌توان به پپتیدهای زیست فعال با قابلیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون فرو دست یافت. پپتیدهای تولید شده در شرایط بهینه هیدرولیز دارای قدرت مهار رادیکال DPPH بیشتری (۷۸٪) نسبت به قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن (۵۱/۹۸٪) بودند. مقدار R^2 ۰/۹۱۸۴ و ۰/۹۷۶۱ و R^2 تعدیل شده ۰/۱۳۳۳ و ۰/۱۸۲۷ به ترتیب برای خاصیت مهار رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن توسط نرم‌افزار تخمین زده شدکه نشان-دهنده مناسب بودن مدل پیشنهاد شده و برازش مدل بر اساس پاسخ-های در نظر گرفته شده بود.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مقاله مراتب سپاس خود را از دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به جهت حمایت‌های مالی در انجام این تحقیق اعلام می‌دارند.

منابع

Balti, R., Bougatef, A., El-Hadj Ali, N., Zekri, D., Barkia, A., &Nasri, M. 2010, Influence of degree of hydrolysis on functional properties and angiotensin I-converting enzyme-inhibitory activity of protein hydrolysates from cuttlefish (Sepia officinalis) by-products. *Journal of the Science of Food andAgriculture* 90(12), 2006-2014.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., &Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., &Shahidi, F. 2008.Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 109, 144-148.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., &Nasri, M. 2011, Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. *Food Research International*, 44(9), 2703-2711.

Jamdar, S., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., & Sharma, A. 2010, Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysates.*Food Chemistry*, 121(1), 178-184.

Jayaprakasha, G.k., Singh, R.P., & Sakariah, K.K. 2001, Antioxidant activity of grape seed (Vitis vinifera) extracts on peroxidation models in vitro. *Food Chemistry*, 73(3), 285-290.

Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. 2009, Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266-1272.

Kamau, S.M., & Lu, R.R. 2011, the effect of enzymes and hydrolysis conditions on degree of hydrolysis and DPPH radical scavenging activity of whey protein hydrolysates. *Current Research in Dairy Sciences*, 3, 25-35.

Khantaphant, S., Benjakul, S., &Ghomi, M.R. 2011, the effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (Lutjanus vitta). LWT-*Food Science and Technology*, 44(4), 1139-1148.

Khantaphant, S., Benjakula, S., &Kishimurab, H. 2011, Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper preparedusing pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, 46(1), 318-327.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. 2007, Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroidesleptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4), 1317-1327.

Lazos, E.S. 1986, Nutritional, fatty acid, and oil characteristics of pumpkin and melon seeds. *Journal of food science*, 51(5), 1382-1383.

Mehrgan nikoo, A., Sadeghi mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Taheri, A., & Aalami, M. 2014, Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (Carassius carassius) protein hydrolysate by response surface methodology. *Food Processing and Preservation Journal*, 1, 95-110.

Meshginfar, N., Sadeghi mahoonak, A.R., ziaeefar, A.M., Ghorbani, M., & Kashani nejad, M. 2015, Evaluation of antioxidant activity of bioactive peptides prepared from meat industry by-products. *Journal of Food Science and Technology*, 2, 215-225.

Mohamed, R.A., Ramadan, R.S., &Ahmed, L.A. 2009, Effect of substituting pumpkin seed protein isolate for casein on serum liver enzymes, lipid profile and antioxidant enzymes in CCl4-intoxicated rats. *Advances in Biological Research*, 3(1-2), 9-15.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., &Shahidi, F. 2011, Functionalitiesand antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4), 1354-1362.

Ren, J., Zheng, X.Q., Liu, X.L., & Liu, H. 2010, Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate. *Food Technology and Biotechnology*, 48(4), 519-523.

Sun, Q., Shen, H., &Luo, Y. 2011, Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin, 48(1), 53-60.

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 Sciences Journal*, 21(5), 651-658.

Taheri, A., Jalali nejad, S., & Anvar, S.A.A. 2013, Anti-hypertensive and Anti-oxidative Properties of Five Protein Hydrolysates from White Shrimp (Penaeus indicus) By-products. *Comparative Pathobiology*, 1, 599-608.

Tang, C.H., Wang, X.S., & Yang, X.Q. 2009, enzymatic hydrolysis of hemp (Cannabis sativa) protein isolate by various proteases and antioxidant properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*, 114(4), 1484-1490.

Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martı´nez-Ayala, A., Da´vila-Ortı´z, G., &Betancur-Ancona, D. 2009, Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and Phaseolus vulgaris seeds. LWT-*Food Science and Technology*, 42(10), 1597-1604.

Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., &Millán, F. 1999, Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(12), 1455-1460.

Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., &Millan, F. 1999, Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 76(7), 819-823.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., &Yongsawadigul, J. 2012, Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104-111.

Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. 2008, Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2), 370-376.

Zhu, K., Zhou, H., &Qian, H. 2006, Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 13, No. 1, Apr. May. 2017, p. 14- 26

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۳، شماره ۱، فروردین-اردیبهشت ۱۳۹۶ ص.۲۶-۱۴

The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein

E. Nourmohammadi[1], A.R. Sadeghimahoonak*[2], M. Ghorbani[2], M. Alami[2] and M. Sadeghi[3]

Received: 2015.03.17
Accepted: 2015.10.31

Introduction: Proteins are vital substances for health since they provide nitrogen, amino acids and the energy required for normal body performance. However, the applications of proteins are limited due to their certain properties, such as their low solubility. The enzymatic hydrolysis of proteins is an extensively used approach to produce bioactive peptides and promote the chemical, functional and nutritional properties of proteins. These compounds have interesting biological properties such as anti-oxidative, anti-hypertensive, anti-bacterial, anti-cancer and anti-thrombotic activities. Lipid peroxidation is one of the main reasons behind the deterioration of foodstuffs during processing and storage. In this case, the addition of anti-oxidative compounds is considered as an effective way to improve the shelf-life of lipid containing foods. Due to carcinogenic effect of synthetic anti-oxidative compounds, extensive efforts have been done to find natural anti-oxidative compounds with plant origin during recent years. Pumpkin (Cucurbitapepo) seeds are rich of proteins, unsaturated fatty acids, phytosterols and essential minerals like Zn, K, Ca, Mg, Fe, Cu and P. Oil content of pumpkin seeds is about 40-60%, and mostly consisted of oleic, palmitic and stearic acids. On the other hand, its protein content is about 45-46%, and this amount will reach to 55-56% after defatting. To date, pumpkin seeds have been mainly used for pumpkin oil production. After the oil extraction, a protein-rich by-product (pumpkin oil cake) remains, which is often used for animal feeding. In this study, the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate by a food-grade protease named trypsin was attempted and the optimum treatment was selected based on the DPPH radical scavenging and ferrous ion chelating activities

Materials and Methods: In this study, the optimization of the hydrolysis of pumpkin (*Cucurbitapepo)* oil cake protein was investigated using response surface methodology (RSM) and central composite design (CCD) in order to achieve the maximum DPPH radicals scavenging and metal ion chelating activities. For this purpose, trypsin concentrations of 1-2% and hydrolysis temperatures and times of 35-45 ċ and 2-5 hours were examinedas independent variables.

Preparations of pumpkin oil cake protein isolate (POCPI)

Defatted pumpkin oil cake was dispersed in distilled water (1:10 w/v). The pH was adjusted to 10 with 1N NaOH, mixed for 1 hour at room temperature and centrifuged at 5000g for 20 minutes (Combi514R, South Korea). The supernatant was collected, pH was adjusted to 5 with 1N HCl and centrifugation was performed at the same condition. Supernatant was discarded and precipitate was collected as pumpkin oil cake protein isolate.

Enzymatic hydrolysis

Pumpkin oil cake protein isolate was dispersed in tris-HCl at pH= 8 for trypsin enzymatic treatment (5% w/v). After that, trypsin was added at 1%, 1.5% and 2% and hydrolysis was carried out for 2, 3.5 and 5h at 200 rpm in shaker incubator (8480-VS, South Korea). Hydrolysis temperatures were 35, 40 and 45˚C. At the end of hydrolysis, the enzyme was inactivated for 15 minutes at 85˚C; dispersion was centrifuged at 4000g for 30 minutes, the supernatant was collected and freeze dried.

DPPH radical scavenging activity

An aliquot of 1000 microliterpumpkin oil cake proteinhydrolysate was mixed with 1000 microliter of 0.1mM DPPH solution prepared in 96% ethanol. The mixture was allowed to stand for 60 minutes in the dark and the

1. PhD graduated of Food Science, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
2. Associate Professors, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.
3. Faculty Member, Isfahan Cardiovascular Research Center.
(*Corresponding Author Email: sadeghiaz@yahoo.com)

absorbance was read at 517 nm. The blank was prepared with the same manner except that 1000 microliter water was used instead of 1000 microliter pumpkin oil cake proteinhydrolysate.

Ferrous ion chelating activity

Pumpkin oil cake protein hydrolysate(4.7 ml) was mixed with 0.1 ml 2mM $FeCl_2$ and 0.2 ml 5 mM ferrozine and was kept at room temperature for 20 min. The absorbance was read at 562 nm and the blank sample was prepared with the same manner except that 4.7 ml distilled water was used instead of sample.

Results & Discussions: The results of this study, showed that the optimum conditions to reach the maximum DPPH radicals scavenging and metal ion chelating activities were 35 ċ, 5h, 1.1% enzyme concentration and 45 ċ, 2.05h and 2% enzyme concentration that showed DPPH radicals scavenging and metal ion chelating activities of 76.28% and 49.61% respectively. These results were to large extent similar to those suggested by Design Expert software (75.89% and 50.84%). The R^2 was 0.9184% and 0.9761% for DPPH radicals scavenging and metal ion chelating activities respectively. Moreover the adjusted R^2 was estimated to be 0.1333 and 0.1827 for DPPH radicals scavenging and metal ion chelating activities respectively, which suggested the suitability and fitness of proposed model for the considered responses.

Conclusions: Based on the results, pumpkin oil cake protein hydrolysate demonstrated appropriate anti-oxidative and metal ion chelating abilities. The results of this study indicated that pumpkin oil cake protein hydrolysate had the ability to be used as an effective and natural anti-oxidative compound in lipid containing foods.

Keywords: Pumpkin seed, enzymatic hydrolysis, trypsin, Response Surface Method