

The effect of molecular weight and amino acid composition on antioxidant properties of peptide components of pumpkin seed protein hydrolysate

Alireza Sadeghi Mahoonak^{1*}, Shima Kaveh², Masoomeh Alvand³

¹Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: sadeghi@yahoo.com

²Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

³Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2021/03/03
Revised: 2021/04/27
Accepted: 2021/05/08

Keywords:
Antioxidant
Hydrolyzed protein
Pumpkin seeds
Chromatography

ABSTRACT

Background and purpose: The formation of free radicals in aerobic organs is inevitable. These radicals cause cells and tissues damages. Oxidation of lipids by producing harmful compounds and as the result spoilage of food products is one of the most important concerns of the food industry. The use of synthetic antioxidants is tightly controlled due to their harmful effects on human health. Therefore, scientists' research has turned to the identification and extraction of natural antioxidant compounds. Bioactive peptides are specific protein components that are inactive at the primary protein source and are produced by enzymatic hydrolysis, microbial fermentation, and chemical synthesis. These peptides have different health-promoting properties such as antihypertensive, anti-cholesterol, anti-cancer, strengthening the immune system and antioxidant properties that are influenced by their amino acid composition and sequence. This study aimed to investigate the effect of molecular weight and amino acid composition on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, Fe reducing power and ABTS radical scavenging activity) of peptide components of pumpkin seed protein hydrolysate.

Materials and Methods: Pumpkin seed protein hydrolysate was prepared under optimum conditions based on the results of previous research and then the effect of molecular weight distribution on the bioactive properties of the resulting fractions and also the relationship between the amino acid composition of these peptides and their antioxidant properties after separation and purification by size exclusion chromatography (SEC) and reverse phase high pressure liquid chromatography (RP-HPLC) was examined.

Results: The results of size exclusion chromatography showed that fractions 49 to 56 and 49 to 63 with a molecular weight in the range of 9000 to 13,000 daltons have the highest DPPH and ABTA radical scavenging activity. The antioxidant activity reached its maximum value after further purification of fractions with a holding time of 22 minutes by RP-HPLC. The results of the amino acid analysis showed that fractions with high antioxidant capacity contain high amounts of hydrophobic amino acids (about 33.5%), which include non-polar aliphatic groups (such as valine, isoleucine, proline, leucine, tryptophan, and tyrosine). In other words, low molecular weight peptides, with aromatic and hydrophobic amino acids have higher antioxidant activity.

Conclusion: Pumpkin seed protein hydrolysate with peptide components of significant antioxidant properties, can compete with synthetic antioxidants used in the food industry. Therefore, it can be used as a natural preservative in food formulations to produce functional products to increase public health levels and for medicinal purposes.

Cite this article: Sadeghi Mahoonak, A.R., Kaveh, Sh., Alvand, M. 2022. The effect of molecular weight and amino acid composition on antioxidant properties of peptide components of pumpkin seed protein hydrolysate. *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (1), 39-58



© The Author(s).

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.18928.1655

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

تأثیر وزن مولکولی و ترکیب آمینواسیدی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اجزاء پتیدی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو

علیرضا صادقی ماهونک^{۱*}، شیما کاوه^۲، معصومه الوند^۳

^۱ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، رایانامه: sadeghiaz@gau.ac.ir
^۲ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
^۳ گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: تشکیل اجتناب ناپذیر رادیکال‌های آزاد در اندام‌های هوازی منجر به آسیب سلول‌ها و بافت‌ها می‌شوند. اکسیداسیون لیپیدها به دلیل تولید ترکیبات مضر و در نتیجه فساد محصولات غذایی یکی از مهم‌ترین دغدغه‌های صنعت غذا است. اثرات مضر آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی بر سلامتی انسان با کنترل و نظارت شدید کاربرد این ترکیبات همراه است. بنابراین، پژوهش‌های دانشمندان معطوف به شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی شده است. پپتیدهای زیست‌فعال اجزای پروتئینی ویژه هستند که در منبع پروتئین اولیه غیرفعال بوده و به روش‌های هیدرولیز آنزیمی، تخمیر میکروبی و سنتز شیمیایی تولید می‌شوند. این پپتیدها ویژگی‌های سلامتی‌بخشی متفاوتی مانند ضد فشار خون، ضد کلسترول، ضد سرطان، تقویت سیستم ایمنی بدن و آنتی‌اکسیدانی دارند که تحت تأثیر ترکیب و توالی آمینواسیدی آنهاست. هدف از پژوهش حاضر بررسی تأثیر وزن مولکولی و ترکیب آمینواسیدی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی یون آهن و فعالیت مهار رادیکال ABTS) اجزاء پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بود.
واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو کروماتوگرافی	مواد و روش‌ها: پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو در شرایط بهینه (بر مبنای یافته‌های تحقیق قبلی) تهیه شد. پس از جداسازی و خالص‌سازی فراکسیون‌های پتیدی توسط کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) و همچنین کروماتوگرافی مایع با فشار بالا-فاز معکوس (RP-HPLC)، تأثیر توزیع وزن مولکولی بر ویژگی‌های زیست‌فعالی فراکسیون‌های حاصله بررسی شد. همچنین ارتباط بین ترکیب اسیدآمینه این پپتیدها با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت.
	یافته‌ها: نتایج کروماتوگرافی طرد اندازه نشان داد که فراکسیون‌های ۴۹ تا ۵۶ و ۴۹ تا ۶۳ با وزن مولکولی در محدوده‌ی ۹۰۰۰ تا ۱۳۰۰۰ دالتون به ترتیب دارای بیشترین قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS بوده و پس از خالص‌سازی بیشتر این فراکسیون‌ها توسط RP-HPC این قابلیت در فراکسیون‌های با زمان بازداری ۲۲ دقیقه بالاترین میزان را نشان داد. نتایج آنالیز اسید آمینه نشان داد که فراکسیون‌های با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا حاوی مقادیر بالایی (حدود ۳۳/۵ درصد) اسیدهای آمینه آبگریز شامل گروه‌های آلیفاتیک غیر قطبی (نظیر والین، ایزولوسین، پرولین، لوسین، تریپتوفان و تیروزین) هستند. به عبارت دیگر پپتیدهای با وزن مولکولی پایین، دارای اسیدهای آمینه آروماتیک و آبگریز با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند.

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو با دارا بودن اجزاء پپتیدی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجه قابلیت رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده در صنعت مواد غذایی را دارد. بنابراین به-عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی در فرمولاسیون محصولات غذایی فراسودمند با هدف افزایش سطح سلامت عمومی و نیز کاربردهای دارویی پیشنهاد می‌شود.

استناد: صادقی ماهونک، ع.ر، کاوه، ش.، الوند، م. (۱۴۰۱). تأثیر وزن مولکولی و ترکیب آمینواسیدی بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی اجزاء پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۴ (۱)، ۵۸-۳۹.

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.18928.1655



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

پراکسیداسیون لیپیدها در سیستم‌های غذایی با ایجاد عطر و طعم تند و غیرقابل قبول و کاهش ماندگاری محصول موجب از بین رفتن کیفیت مواد غذایی می‌شود. تنش اکسایشی نقش مهمی در ایجاد بیماری‌های شایع دوران کهنسالی از جمله آلزایمر، آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد مانند تصلب شرایین، دیابت و سرطان ایفا می‌کند (۲۳). همچنین، تنش اکسیداتیو موجب شروع یا تشدید بیماری‌های قلبی - عروقی مانند تصلب شرایین در بیماران با سندروم متابولیک یا نشانگان سوخت و سازی می‌شود (۳۲). بنابراین با توجه به ارتباط مستقیم و نزدیک بروز بیماری‌ها و تنش‌های اکسیداتیو، کنترل رادیکال‌های آزاد و تنش اکسیداتیو یکی از راه‌های مهم کاهش سرعت رشد و یا جلوگیری از بروز بیماری‌ها و اختلال‌های ناشی از آن‌هاست.

به‌منظور پیشگیری از اکسیداسیون لیپیدها در صنایع غذایی طی تولید محصولات مختلف از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی سنتزی BHT، BHA و... استفاده می‌شود. کاربرد ترکیبات اشاره شده در برخی محصولات غذایی و کشورها به‌علت مسائل مرتبط با ایمنی و سلامت در بلندمدت، محدود یا ممنوع شده است. از این رو تحقیقات بسیاری پیرامون استخراج، شناسایی و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات استحصال‌ی از منابع طبیعی به‌ویژه پروتئین‌ها صورت گرفته است. پروتئین‌ها به‌عنوان منبع تأمین انرژی و اسیدهای آمینه ضروری برای رشد و حفظ فعالیت‌های فیزیولوژیکی انسان شناخته می‌شوند. اخیراً، پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع حیوانی و گیاهی مورد توجه محققین قرار گرفته‌اند (۲۴). پپتیدهای زیست‌فعال بخش‌های پروتئینی خاصی با جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون و حاوی ۲۰-۲ آمینواسید هستند. این ترکیبات در ساختار پروتئینی

اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن بر حسب نوع و توالی آمینواسیدی خود، تأثیر مثبتی بر عملکرد بدن و در نتیجه سلامت فرد از جمله اثرات ایمنی‌بخشی (۱۱)، ضد میکروبی (۲۳)، آنتی‌اکسیدانی (۲۵)، ضد فشار خون (۱۴) و ضد سرطان (۲۴) دارند. این پپتیدها به روش‌های مختلف شامل سنتز شیمیایی، هیدرولیز توسط اسید و یا قلیا، تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی (با منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی) تولید می‌شوند. در این میان هیدرولیز آنزیمی به‌عنوان فرآیندی قابل کنترل و ملایم تعریف می‌شود که می‌تواند به حفاظت بیشتر آمینواسیدها منتج گردد (۴۱). در مقایسه با آنزیم‌های با منشأ گیاهی و جانوری، آنزیم‌های میکروبی به‌دلیل تنوع ویژگی‌های پروتئولیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف مزیت‌های قابل توجهی دارند (۳۱). به‌طور کلی آنزیم آلكالاز به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه‌ی هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره‌ی پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است (۴). در سال‌های اخیر، پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی بسیاری مانند شیر (۱)، دانه کدو (۳۰)، پروتئین زرده‌ی تخم مرغ (۳۷)، کینوا (۳۵)، دانه پرتقال (۲۲)، ضایعات میگو (۸) و لوبیای سویا (۱۰) مورد بررسی قرار گرفته‌اند که منابع گیاهی به‌دلیل قیمت مناسب‌تر، آلرژی‌زایی کمتر و دسترسی بالاتر مورد توجه بیشتری هستند (۲۰).

دانه کدو (*Pepo cucurbita*) حاوی بیش از ۳۵ درصد پروتئین و ۵۰ درصد چربی است. همچنین غنی از آمینواسیدهای آرژنین، آسپارتیک‌اسید و گلوتامیک اسید بوده و ارزش تغذیه‌ای آن به دانه‌های روغنی مانند سویا بسیار نزدیک است (۲۹). این دانه به‌دلیل میزان بالای فیتواسترول، مواد معدنی (روی،

مواد و روش‌ها

مکان انجام تحقیق: مواد اولیه این تحقیق (پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو) بر مبنای یافته‌های تحقیقات انجام گرفته قبلی (۳۰) در گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شدند. جهت انجام تحقیقات تکمیلی از جنبه شناسایی و جداسازی فراکسیون‌های فعال، در آزمایشگاه تحقیقاتی آقای دکتر فیدل تولدرا واقع در IATA-CSIC در شهر والنسیا در کشور اسپانیا طی فاصله زمانی فوریه تا سپتامبر ۲۰۱۶ مورد مطالعه قرار گرفتند.

مواد اولیه: کنجاله دانه کدو *Cucurbita pepo con.* (*Pepo var. Styriaca*) از شرکت سویابین گرگان تهیه شد. مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک، سیگما و نووزایم دانمارک تهیه گردیدند.

چربی‌گیری کنجاله کدو و تهیه ایزوله پروتئین دانه کدو: ابتدا کنجاله کدو با آسیاب الکتریکی پودر و فرآیند چربی‌زدایی، با اختلاط با هگزان به نسبت ۱:۴ (وزنی / حجمی) و به مدت ۳ ساعت همزدن در دمای اتاق با استفاده از شیکر با دور ۱۵۰rpm انجام گرفت. سپس با استفاده از قیف بوخنر هگزان جدا و پودرهای چربی‌گیری شده به مدت ۱ ساعت در آن با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند و از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. در مرحله بعد، کنجاله چربی‌گیری شده دانه کدو به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول توسط سود ۰/۲ نرمال به ۹ رسیده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار قرار گرفت. به منظور رسوب پروتئین‌های دانه کدو، pH رومانند توسط اسید کلریدریک ۰/۲ نرمال به ۵ رسیده و تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ

پتاسیم، کلسیم، منیزیوم، آهن، مس، فسفر) و بتاکاروتن به‌لحاظ ترکیبات تغذیه‌ای ضروری برای انسان منبع مفیدی است. به‌علاوه، ایزوله پروتئین دانه کدو حاوی ترکیبات ضد اکسایش بوده و در کاهش اثرات مخرب مربوط به سوء تغذیه نیز مؤثر می‌باشد (۲۸). کاربرد اصلی دانه کدو در صنعت تولید آجیل و روغن می‌باشد. کنجاله حاصل از دانه کدو پس از روغن‌کشی حاوی درصد بالایی پروتئین است که در حال حاضر با قیمت اندک به مصرف خوراک دام می‌رسد. بنابراین با توجه به ترکیب اسید آمینه مناسب پروتئین دانه کدو، در تحقیق قبلی تلاش شد تا از کنجاله دانه کدو به‌عنوان منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی استفاده شده و شرایط مناسب برای رسیدن به حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی بررسی گردد (۳۰). در تحقیقات مختلف جداسازی پپتیدهای زیست‌فعال از مخلوط پروتئین هیدرولیز شده توسط روش‌های مختلف کروماتوگرافی، بررسی تأثیر توزیع وزن مولکولی بر ویژگی‌های زیست‌فعالی فراکسیون‌های حاصله و همچنین ارتباط بین ترکیب اسید آمینه این پپتیدها با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و زیست‌فعالی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفته است (۱۹، ۲۱، ۲۷). لذا در این تحقیق ابتدا پروتئین هیدرولیز شده در شرایط بهینه بر مبنای یافته‌های تحقیق قبلی تهیه و سپس تأثیر توزیع وزن مولکولی بر ویژگی‌های زیست‌فعالی فراکسیون‌های حاصله و همچنین ارتباط بین ترکیب اسید آمینه این پپتیدها با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پس از جداسازی و خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی طرد اندازه^۱ (SEC) و همچنین کروماتوگرافی مایع با فشار بالا- فاز معکوس^۲ (RP-HPLC) مورد بررسی قرار گرفت.

1. Size Exclusion Chromatography
2. Reverse-Phase High Performance Liquid Chromatography

۰/۴۵ میکرومتر در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۰).

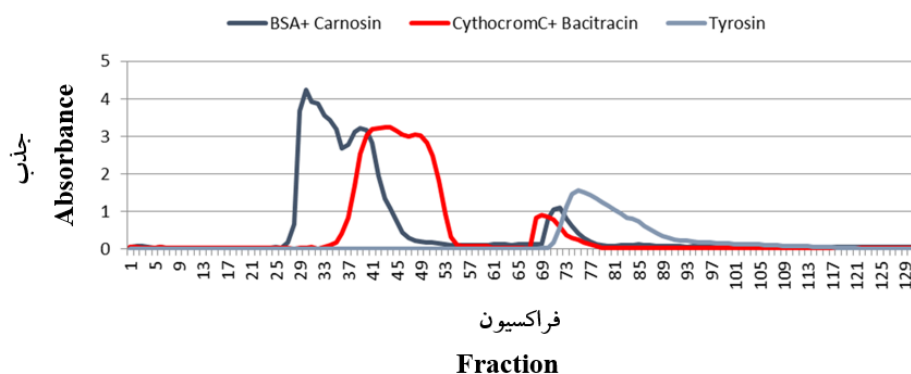
جزء به جزء سازی و خالص‌سازی با استفاده از کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC): جهت جزء به جزء سازی اولیه اجزاء پپتیدی موجود در هیدرولیز شده‌های پروتئینی سیستم کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) بر اساس جرم مولکولی مورد استفاده قرار گرفت. مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیز شده پروتئین‌زدایی شده (۲۵ mg/ml) حاصل از مرحله قبل به ستون Sephadex G-25 (65×2.5 cm) که قبلاً با اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال مشروط شده بود، منتقل گردید. عمل جداسازی اجزاء پپتیدی در ۴ درجه سانتی‌گراد با استفاده از اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال با سرعت جریان ۱۵ میلی‌لیتر در ساعت انجام گرفت. با استفاده از جمع‌کننده اتوماتیک، اجزاء (فراکسیون‌ها) ۵ میلی‌لیتری حاصله در لوله‌های مخصوص جمع‌آوری شد و جذب آن‌ها در طول موج‌های ۲۱۴ (برای اسیدهای آمینه غیرآروماتیک و گروه‌های کربونیل)، ۲۵۴ (جذب بیشینه فنیل آلانین) و ۲۸۰ نانومتر (برای اسیدهای آمینه آروماتیک) قرائت شد. سپس لوله‌های جمع‌آوری نمونه‌ها که در بررسی اسپکتروفتومتری دارای جذب (شاخص حضور پپتید) بودند توسط خشک‌کن انجمادی خشک شده و سپس با افزودن آب مقطر با حجم مشخص نمونه‌ها رقیق‌سازی شده و آزمون‌های مختلف آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH، مهار رادیکال ABTS و احیاء کنندگی یون آهن)، در مورد تمام فراکسیون‌های به‌دست آمده به صورت جداگانه انجام گرفت و فعال‌ترین اجزاء پپتیدی شناسایی شدند (۲۷). مجموعه اجزاء پپتیدی فراکسیون‌های شماره ۵۶-۴۹ که بیشترین فعالیت را در آزمون‌های فوق نشان دادند، جمع‌آوری و مخلوط شدند و پس از لیوفیلیز شدن به

شد. رسوب بدست آمده (ایزوله پروتئینی) مستقیماً برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت (۵۰).

هیدرولیز ایزوله پروتئین دانه کدو: هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم آلکالاز و بر اساس شرایط بهینه جهت دستیابی به حداکثر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی که در مطالعه قبلی بدست آمده بود، صورت گرفت. به این منظور کنسانتره پروتئینی به نسبت ۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH برابر با ۹ پراکنده و آنزیم آلکالاز در غلظت ۲ درصد (حجمی/وزنی) نسبت به سوبسترای پروتئینی) افزوده شد. سپس هیدرولیز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۳/۵ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه به انجام رسید. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفیوژ کردن برای حذف ترکیبات اضافه در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت. در نهایت رومانند توسط خشک‌کن انجمادی به پودر تبدیل گردید (۳۰).
آماده‌سازی پروتئین هیدرولیز شده جهت خالص‌سازی: مشابه با روش مورد استفاده توسط اسکودرو و همکاران (۲۰۱۲)، ۴ گرم نمونه هیدرولیز شده پروتئینی لیوفیلیزه (خشک شده با خشک‌کن انجمادی) در ۲۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال حل شد و به مدت ۸ دقیقه در استوماکر هموژن گردید. سپس نمونه هموژن شده سانتریفیوژ (g × ۱۲۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه) شد و به منظور پروتئین زدایی، فاز رومانند با سه برابر حجم خود با اتانول مطلق مخلوط و به مدت ۲۰ ساعت در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. نمونه مجدداً تحت عمل سانتریفیوژ قرار گرفت و پس از تبخیر اتانول، لیوفیلیزه شد. در نهایت عصاره پروتئین‌زدایی شده خشک شده در ۱۵ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۰۱ نرمال حل شد و پس از صاف شدن با فیلتر غشایی

زیر انجام گرفت: سرم آلبومین گاوی (۷۰ کیلودالتون)، سیتوکروم C (۱۳ کیلودالتون)، باسیتراسین (۱/۴۲ کیلودالتون)، کارنوزین (۰/۲۲ کیلودالتون) و تیروزین (۰/۲ کیلودالتون). شکل ۱ پروفایل SEC نمونه‌های استاندارد را نشان می‌دهد.

منظور بررسی بیشتر با سیستم RP-HPLC در مراحل بعد در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند. همچنین جهت تخمین توزیع جرم مولکولی اجزاء پپتیدی موجود در هیدرولیز شده از سیستم SEC استفاده گردید. کالیبراسیون ستون با بارگذاری ترکیبات استاندارد با وزن مولکولی مشخص به شرح



شکل ۱- پروفایل پروتئینی حاصل از کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) بر اساس جرم مولکولی نمونه‌های استاندارد
Figure 1- Protein profile from size exclusion chromatography (SEC) based on molecular mass of standard samples.

در فواصل زمانی یک دقیقه جمع‌آوری شد و پس از لیوفیلیز شدن در شرایط انجماد نگهداری شدند (۲۷). سپس محتویات هر فრაکسیون مجدداً در آب دیونیزه حل شد و قدرت آنتی‌اکسیدانی بر مبنای به دام اندازی رادیکال ABTS بر روی تمام فرکسیون‌های حاصله انجام و در نهایت فعال‌ترین فრაکسیون‌ها شناسایی شدند.

اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی فრაکسیون‌ها به روش DPPH: جهت تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از روش جمیل و همکاران (۲۰۱۴) استفاده شد. در این آزمون، قدرت یک آنتی‌اکسیدان در بلوکه کردن رادیکال آزاد DPPH ارزیابی می‌شود. در این روش، ۱۰۰ میکرولیتر نمونه هیدرولیز شده با ۳۵۰ میکرولیتر اتانول مطلق ۹۹/۵ درصد و ۳۰۰ میکرولیتر محلول اتانولی DPPH (۰/۰۲ درصد در اتانول مطلق) مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در جای تاریک قرار گرفت. بعد از گذشت این زمان جذب آن در

خالص‌سازی و جزء به جزء سازی مخلوط پپتیدها با HPLC فاز معکوس (RP-HPLC): با استفاده از HPLC فاز معکوس (Agilent 1100, Agilent Tech., California, USA) اجزاء پپتیدی بر مبنای میزان آبگریزی نسبی تفکیک و تخلیص شدند. ستون مورد استفاده برای این کار، ستون Symmetry C18 (Waters 250×4.6 mm, 5µm) از کمپانی Waters بود. فاز متحرک متشکل از فاز A (تری فلئورو استیک اسید (TFA) ۰/۱ درصد در آب دو بار تقطیر) و فاز B که حاوی TFA (۰/۰۸۵ درصد) در مخلوط استونیتریل با آب دیونیزه (۶۰:۴۰) بود. فاز متحرک به صورت گرادپانی (۰ تا ۵۰ درصد فاز B در طول ۵۰ دقیقه) و با نرخ ۱ میلی‌لیتر در دقیقه جریان داشت. تزریق بصورت دستی و در حجم ۳۰۰ میکرولیتر انجام گردید. کیفیت جداسازی با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۲۱۴ و ۲۸۰ نانومتر بررسی گردید. اجزاء پپتیدی حاصله با استفاده از جمع‌کننده اتوماتیک

بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۷/۴) تا جذب ۰/۷±۰/۰۲ در ۷۳۴ نانومتر رقیق شد. سپس ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه (حاوی ۴ میلی‌گرم پروتئین بر میلی‌لیتر) به ۴ میلی‌لیتر محلول رقیق شده ABTS⁺ افزوده شد. مخلوط برای ۳۰ ثانیه به شدت ورتکس و به مدت ۶ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. جذب محلول نهایی در ۷۳۴ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال ABTS⁺ نمونه‌ها بر اساس رابطه ۲ محاسبه گردید که در آن A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه کازئین هیدرولیز شده) هستند (۴۵).

$$\text{AA (\%)} = \left[\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100 \quad \text{رابطه ۲.}$$

آنالیز اسیدهای آمینه: ۲ تا ۴ میلی‌گرم پروتئین با ۴ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۶ نرمال به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد هیدرولیز گردید. استانداردهای داخلی به مخلوط افزوده شد و پس از مشتق‌سازی با فنیل ایزوتیوسیانات ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه به ستون کروماتوگرافی فاز معکوس (Technochrom-RP-C18, ODS-A) به طول ۵ سانتی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر تریق گردید. متیونین و سیستئین به دلیل فرآیند اکسیداسیون قابل شناسایی نبودند. نتایج بر اساس گرم اسید آمینه در ۱۰۰ گرم پروتئین گزارش گردید. استانداردهای داخلی شامل آمینواسیدهای آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، سرین، آسپاراژین، گلیسین، گلوتامین، بتا آلانین، تائورین، هیستیدین، ترئونین، آلانین، آرژنین، پرولین، تیروزین، والین، متیونین، ایزولوسین، لوسین، نورلوسین، فنیل آلانین، تربیتوفان، اورنیتین و لیزین بودند.

تجزیه و تحلیل آماری: کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار تکرارها گزارش شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار اکسل استفاده شد.

طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد بازدارندگی فعالیت رادیکال DPPH با استفاده از رابطه (۱) محاسبه گردید که در آن As جذب نمونه و Ac جذب کنترل بود (۱۳). رابطه ۱.

$$\% \text{DPPH} = \left(1 - \frac{As}{Ac} \right) \times 100$$

آزمون قدرت احیاءکنندگی یون آهن فراکسیون‌ها: ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶/۶ و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم فروسیانید (۱ درصد وزنی / حجمی) مخلوط شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از انکوباسیون ۲۵۰ میکرولیتر محلول تری کلرواستیک اسید (با غلظت ۱۰ درصد وزنی / حجمی) به مخلوط بالا اضافه شد. سپس این مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و ۲۵۰ میکرولیتر از فاز رومانده به یک لوله جدید منتقل شد. در ادامه، ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه و ۵۰ میکرولیتر کلرید آهن ۲ (با غلظت ۰/۱ درصد وزنی / حجمی) افزوده شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (۴۴). قدرت کاهندگی یون آهن به صورت شدت جذب در ۷۰۰ نانومتر گزارش گردید.

فعالیت مهار رادیکال ABTS فراکسیون‌ها: فعالیت مهار رادیکال ABTS پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از روش تشریح شده توسط یو و همکاران (۲۰۱۰) با کمی اصلاحات تعیین گردید. محلول رادیکال ABTS⁺ با ترکیب نسبت حجمی یکسانی از ABTS در غلظت ۷ میلی‌مولار و ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات تهیه گردید. مخلوط در تاریکی و در دمای محیط به مدت ۱۶-۱۲ ساعت قبل از مصرف قرار داده شد. در این مدت، اکسیداسیون و تولید رادیکال ABTS⁺ به وسیله پتاسیم پرسولفات انجام می‌گیرد. قبل از آزمون، محلول ABTS⁺ با استفاده از

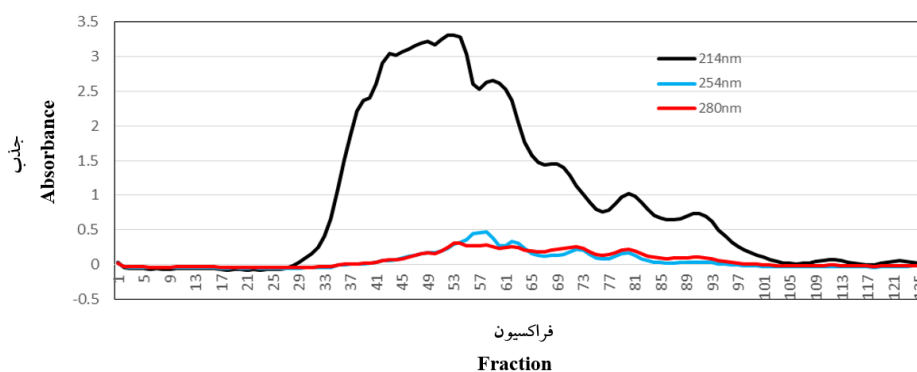
نتایج و بحث

توزیع وزن مولکولی با SEC و تأثیر بر فعالیت آنتی اکسیدانی: به منظور دستیابی به درک بهتری از نقش عوامل مؤثر در ایجاد تفاوت در فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از دانه کدو، و همچنین بررسی تغییرات اجزاء مختلف پروتئینی در نتیجه هیدرولیز، نمونه‌ها با استفاده از SEC جزء به جزء شدند. در شکل ۲ پروفایل کروماتوگرافی طرد اندازه نمونه پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو نمایش داده شده است. همانطور که در پروفایل مشخص است نمونه‌های حاوی پپتیدها و آمینواسیدها در طول موج‌های مربوطه از خود جذب نشان می‌دهند. با مقایسه الگوی SEC پروتئین‌های هیدرولیز شده با الگوی SEC پروتئین‌های استاندارد (شکل ۱) مشخص شد، وزن مولکولی پپتیدهای فراکسیون‌های عمده پروتئین‌های هیدرولیز شده در محدوده وزن مولکولی ۱۳ کیلودالتون و همچنین به میزان کمتری در محدوده بین ۲۰۰ دالتون تا ۱۳ کیلودالتون می‌باشند. همچنین فراکسیون‌های ۲۵ تا ۴۹ در محدوده وزن مولکولی ۷۰ کیلو دالتون هستند.

ستون‌های کروماتوگرافی SEC جهت بررسی

توزیع وزن مولکولی پپتیدهای تشکیل شده از هیدرولیز پروتئین‌ها توسط چالامیاه و همکاران (۲۰۱۳) استفاده شدند. آن‌ها با استفاده از ستون Sephadex G-200 نشان دادند که هیدرولیز ضایعات ماهی با پیپسین و تریپسین منجر به تشکیل پپتیدهایی با دامنه وزن مولکولی وسیع (از ۶۵۰۰ دالتون تا کمتر از ۶۶۰۰۰ دالتون) شده است (۲). مویدی و همکاران (۲۰۱۶) گزارش کردند که پروفایل کروماتوگرافی طرد اندازه پپتیدهای حاصل از تفاله‌ی گوجه فرنگی حاوی دو پیک اصلی با وزن مولکولی بیشتر از ۱۴۲۳ دالتون بود (۲۷).

به منظور بررسی فعالیت زیستی فراکسیون‌های مختلف به دست آمده از جداسازی با SEC، فراکسیون از نقطه ابتدایی شروع جذب در کروماتوگرام (از نمونه شماره ۲۵) جمع‌آوری و سپس لیوفیلیز شدند. در زمان انجام آزمون‌ها در آب دیونیزه حل گردیدند و آزمون‌های مختلف بر روی آن‌ها صورت گرفت. در ادامه فعالیت‌های زیستی مختلف این فراکسیون‌ها بر اساس آزمون‌های برون زیستی مختلف مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۲- الگوی کروماتوگرافی طرد اندازه فراکسیون‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو

Figure 2- SEC pattern of different hydrolyzed fractions of pumpkin seed protein

آنتی اکسیدانی خود را از طریق مکانیسم‌های مختلف همچون مهار پراکسیداسیون لیپید، مهار رادیکال‌های

فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون‌ها: پپتیدهای زیست فعال موجود در هیدرولیز شده‌های پروتئینی فعالیت

به دلیل نقش الکترون‌دهندگی آن‌ها است. لی و همکاران (۲۰۰۸) و تانگ و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده نمودند که بخشی از پروتئین‌های هیدرولیز شده و فراکسیون‌های پپتیدی نخود و گندم سیاه که دارای بالاترین خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بودند حاوی غلظت‌های بالاتری از اسیدهای آمینه هیدروفوب بودند (۱۷، ۴۲).

آنالیز اسیدهای آمینه: ترکیب اسیدهای آمینه نقش کلیدی در بروز ویژگی‌های ضداکسایش پپتیدها دارد (۴۷). این ویژگی جهت یافتن رابطه‌ای میان قدرت ضداکسایش و محتوای اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده کدو مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به جدول ۱ می‌توان دریافت که گلوتامیک و آسپارتیک اسید و آرژنین اسیدهای آمینه اصلی در پروتئین هیدرولیز شده کدو به شمار می‌روند. هرچند مقدار دو اسید آمینه اول ممکن است بیشتر از میزان واقعی آن‌ها برآورد شود، زیرا این اسیدهای آمینه ممکن است از طریق دامپدی شدن گلوتامین و آسپارژین طی تیمار نمونه با اسید تولید شوند (۳۸).

پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده به شکل مؤثری تحت تأثیر نوع پروتئاز مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۳). آلکالاز اختصاصیت گسترده‌ای بر انواع اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین)، اسیدی (گلوتامیک اسید)، سولفور (متیونین)، آلیفاتیک (لوسین و آلانین)، هیدروکسیل‌دار (سرین) و بازی (لایزین) دارد (۴۳). بر مبنای گزارشات تحقیقات آسپارتیک و گلوتامیک اسید (۳۶)، پرولین، آرژنین، متیونین، هیستیدین، لوسین، ایزولوسین، آلانین، تیروزین و والین (۴۹) واجد ویژگی‌های ضد اکسایشی بالایی هستند. با در نظر

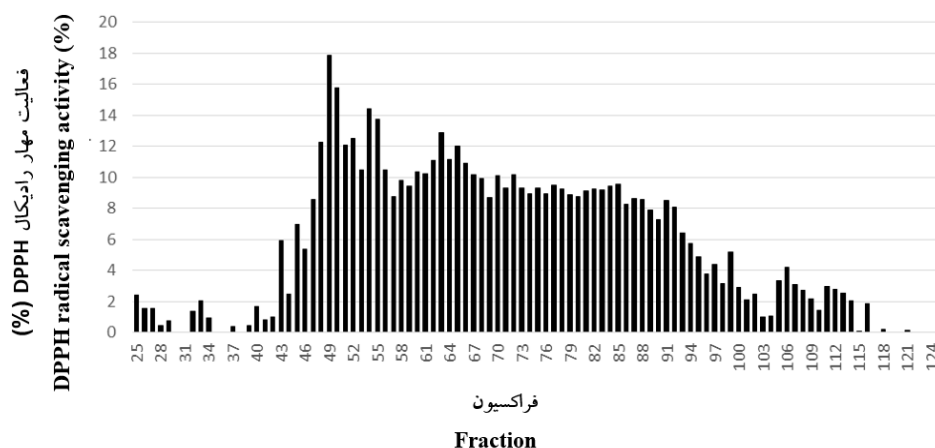
آزاد و چلاته کردن یون‌های فلزی اعمال می‌کنند (۷). بنابراین ارزیابی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها از طریق انجام بیش از یک نوع روش درک بهتری از فعالیت آن‌ها ارائه می‌دهد. در این مطالعه فعالیت آنتی‌اکسیدانی فراکسیون‌های پروتئین‌های هیدرولیز شده با ارزیابی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی یون آهن (تست FRAP) و آزمون مهار رادیکال ABTS اندازه‌گیری شد که نتایج در اشکال ۳ تا ۵ نشان داده شده است.

آزمون مهار رادیکال DPPH: نتایج به دست آمده از آزمایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال DPPH در فراکسیون‌های مختلف نمونه پروتئین هیدرولیز شده در شکل ۳ آورده شده است. بیشترین میزان مهار رادیکال در نمونه پروتئین هیدرولیز شده کدو در فراکسیون‌های ۴۹ تا ۵۶ مشاهده گردید که این میزان معادل وزن مولکولی بین ۹۰۰۰ تا ۱۳۰۰۰ دالتون است. در تحقیق مقصودلو و همکاران (۲۰۱۹) در زمینه هیدرولیز پروتئین گرده گل بالاترین قدرت مهار رادیکال DPPH در فراکسیون ۶۴ تا ۶۶ به دست آمد که معادل با وزن مولکولی ۱۴۲۰ دالتون بود. همچنین فراکسیون ۴۶ تا ۴۸ نیز میزان مهار رادیکال DPPH نسبتاً بالایی از خود نشان دادند که این دامنه معادل با وزن مولکولی ۹۰۰۰ تا ۱۳۰۰۰ دالتون بود (۱۹). همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در فراکسیون‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه پرتقال بعد از کروماتوگرافی طرد اندازه مربوط به فراکسیون ۵۰ تا ۵۴ (معادل وزن مولکولی ۱۳۰۰۰ دالتون) بود (۲۱).

افزایش نسبت آمینواسیدهای آروماتیک در هیدرولیز شده‌های پروتئینی می‌تواند تأثیر مثبتی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته باشد. بویژه در مورد تریپتوفان و فنیل‌آلانین که نقش مهمی در فعالیت بلوکه‌کنندگی رادیکال DPPH دارند و این امر احتمالاً

آمینه آبگریز پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو که در ارتباط مستقیم با قدرت ضداکسایش این ترکیب است به میزان ۲۶۰۱۵/۹۲ میلی گرم / ۱۰۰ گرم برآورد شد که ۳۳/۴۹ درصد از کل اسیدهای آمینه آن را به خود اختصاص داد.

گرفتن محتوای اسیدهای آمینه در پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو، برقرار کردن یک رابطه میان قدرت ضداکسایش و میزان لوسین، ایزولوسین، آلانین و والین، اسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید و آرژنین در این ترکیب امکان پذیر است. به علاوه میزان اسیدهای



شکل ۳- درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH فراکسیون‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده کدو

Figure 3- DPPH Free radical scavenging activity (%) of different fractions of hydrolyzed pumpkin protein

داده می‌شود. بنابراین، تفاوت قدرت کاهندگی و مهارکنندگی بین هیدرولیز شده‌ها می‌تواند به دلیل حضور پپتیدهای خاص با توالی آمینواسیدی خاص باشد. چنین به نظر می‌رسد که حضور هیستیدین، فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین در ساختار پپتیدها، در فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئین مؤثر است (۷). احتمالاً یکی از عوامل مؤثر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیزی به دست آمده، وجود نسبت بالایی از اسیدهای آمینه آروماتیک و هیدروفوب در پروتئین‌های هیدرولیز شده است. این نتیجه‌گیری در انطباق با یافته‌های ژانگ و همکاران (۲۰۰۸) است که گزارش دادند فراکسیون‌های پپتیدی کلزا که حاوی غلظت‌های بالاتری از اسیدهای آمینه هیدروفوب بودند بالاترین قدرت کاهندگی را نشان دادند (۴۶). آمینواسیدهای دارای ساختار حلقوی آروماتیک (فنیل آلانین، تیروزین، تریپتوفان) می‌تواند

قدرت احیاءکنندگی یون آهن: آزمون قدرت احیاءکنندگی یون آهن به عنوان یک روش مستقیم اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نظر گرفته می‌شود و منعکس کننده قدرت الکترون دهنده یک آنتی‌اکسیدان است. ترکیباتی که از خود قدرت کاهندگی یون آهن نشان می‌دهند قادر به احیاء ترکیبات اکسید شده حد واسط در فرآیند پراکسیداسیون هستند و بنابراین به عنوان آنتی‌اکسیدان عمل می‌کنند. هیدرولیز شده‌های پروتئینی با قدرت کاهندگی بالاتر توانایی بهتری جهت اهدا الکترون یا هیدروژن دارند. این مسأله شاخص مهمی جهت ارزیابی یک ترکیب به عنوان آنتی‌اکسیدان است. قدرت کاهندگی فراکسیون‌های مختلف هیدرولیز شده‌ی پروتئینی کدو در شکل ۴ نشان داده شده است. به طور کلی، اثر آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئینی به خاصیت الکترون دهنده آن‌ها نسبت

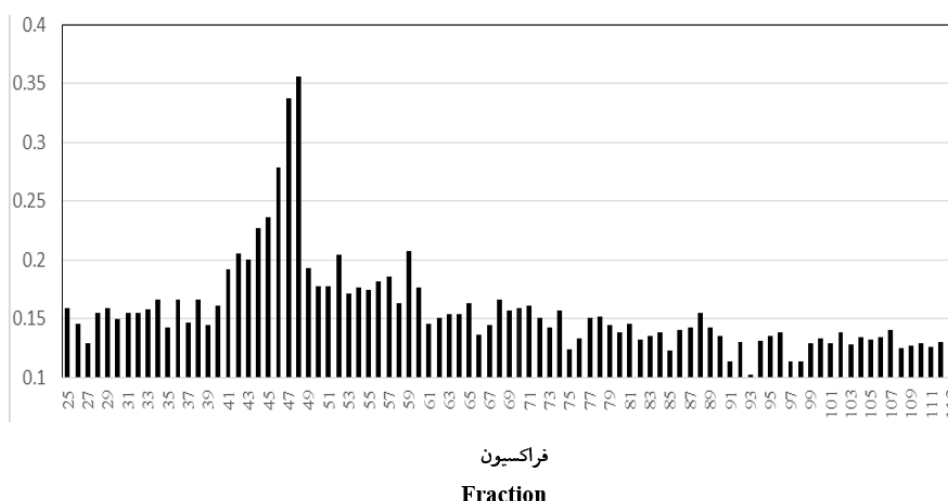
تأثیر وزن مولکولی و ترکیب آمینواسیدی بر ویژگی‌های... / علیرضا صادقی ماهونک و همکاران

به رادیکال‌هایی که معمولاً دارای کمبود الکترون هستند، الکترون اهدا کنند و با این مکانیسم در ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مؤثر باشند (۳۴).
 فعالیت ضداکسایشی فراکسیون‌های مختلف پپتیدهای زیست فعال در مطالعات مختلف مورد بررسی قرار گرفته است. مقصودلو و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی پروتئین هیدرولیز شده گرده گل به کمک کروماتوگرافی طرد اندازه نشان دادند که بالاترین میزان احیاء یون آهن مربوط به فراکسیون‌های ۵۲ تا ۵۴ است (۱۹).

جدول ۱- محتوای اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده کدو (میلی‌گرم / ۱۰۰ گرم)

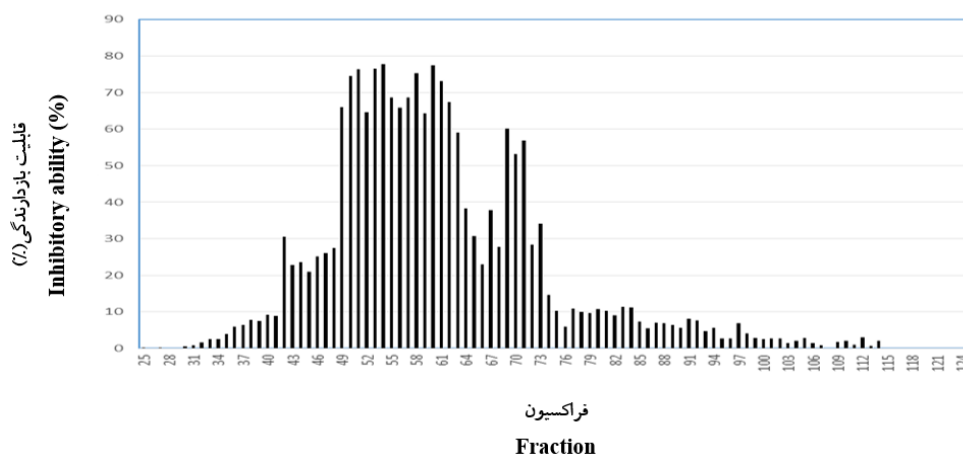
Table 1- Amino acid content of hydrolyzed pumpkin protein (mg / 100 g)

درصد Percentage	میزان پیشنهادی توسط FAO Quantity suggested by FAO	مقدار Quantity	اسیدهای آمینه Amino acids
		3466.94	آلانین Alanin
		4043.34	سرین Serin
		7555.42	آسپارتیک اسید Aspartic acid
		17194.35	گلوتامیک اسید Glutamic acid
88.11	1900	1674.18	*هیستیدین Histidine
100<	6300	2579.24	*تیروزین Tyrosine
		13597.18	آرژنین Arginine
		3953.19	گلیسین Glycine
59.03	3400	2007.17	*ثرئونین Threonine
84.91	2500	2122.97	*متیونین Methionine
98.45	3500	3445.97	*والین Valine
85.7	6600	5641.62	*لوسین Leucine
100<	2800	3100.20	*ایزولوسین Isoleucine
51.77	5800	3002.74	*لایزین Lysine
		4285.03	*فنیل‌آلانین Phenylalanine
		77669.54	جمع Total
		26015.92	میزان کل اسیدهای آمینه آبگریز Total amount of hydrophobic amino acids



شکل ۴- قدرت احیا کنندگی فراسیون‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده کدو

Figure 4- Reducing power of different fractions of hydrolyzed pumpkin protein



شکل ۵- قابلیت بازدارندگی ABTS فراسیون‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده کدو

Figure 5- ABTS inhibitory capacity of different fractions of hydrolyzed pumpkin protein

(۲۰۰۶) با بررسی فعالیت ضد اکسایشی و ضد رادیکالی پروتئین هیدرولیز شده‌ی جوانه‌ی گندم با آنزیم آلکالاز نشان دادند فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیب در سیستم امولسیون اسیدلینولئیک نزدیک به آلفاتوکوفرول بود. همچنین هیدرولیز شده جوانه گندم فعالیت مهار رادیکالی خوبی در مقابل رادیکال‌های آزاد نظیر DPPH، سوپراکسید و رادیکال‌های هیدروکسیل از خود نشان داد (۴۸).

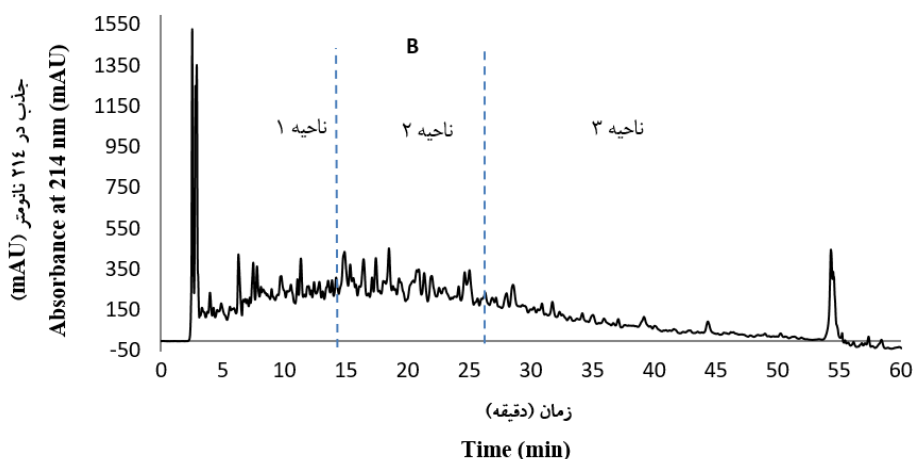
آزمون مهار رادیکال ABTS: فعالیت ضد اکسایشی و قابلیت مهار رادیکال کاتیونی و محلول در آب ABTS

در تحقیق مظلومی و همکاران (۲۰۲۰) بالاترین قدرت احیاء یون آهن در فراسیون‌های ۵۰ تا ۵۴ پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال گزارش شد (۲۱). نشان داده شده است که پپتیدهای زیست فعال تولید شده در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها دارای اثرات ضد اکسایش هستند (۶، ۳۹) به منظور تولید پپتیدهای ضد اکسایش، 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. زو و همکاران

ارائه دهد (۱۶). این تکنیک پروتئین‌ها را با توجه به تفاوت در درجه آبگریزی سطحی آن‌ها جدا می‌کند و عملکرد آن بر مبنای ایجاد برهمکنش‌های برگشت‌پذیری استوار است که بین نواحی آبگریز موجود در سطح پروتئین و گروه‌های آبگریز متصل به ماتریکس بستر ایجاد می‌شود (۳). لسود و همکاران (۲۰۱۵) در شرایط کاملاً مشابه با شرایط به کارگرفته شده در پژوهش حاضر، به منظور تقسیم‌بندی کروماتوگرام به نواحی هیدروفیل و هیدروفوب، دو اسید آمینه تیروزین و تریپتوفان را به صورت جداگانه به HPLC تزریق نمودند و با توجه زمان بازداری آن‌ها (۱۳/۳ دقیقه در مورد تیروزین و ۲۶/۰۳ دقیقه در مورد تریپتوفان) کروماتوگرام را به سه بخش شامل ناحیه ۱؛ پپتیدهای قبل از تیروزین (پپتیدهای هیدروفیل)، ناحیه ۲؛ بین تیروزین و تریپتوفان (پپتیدهای اندکی هیدروفوب) و ناحیه ۳، پس از تریپتوفان (پپتیدهای بسیار هیدروفوب) تقسیم نمودند (۱۶). بر اساس نتایج ترتیب آمینواسیدی در پپتید، الگوی جریان پپتید را تحت تأثیر قرار می‌دهد (شکل ۶).

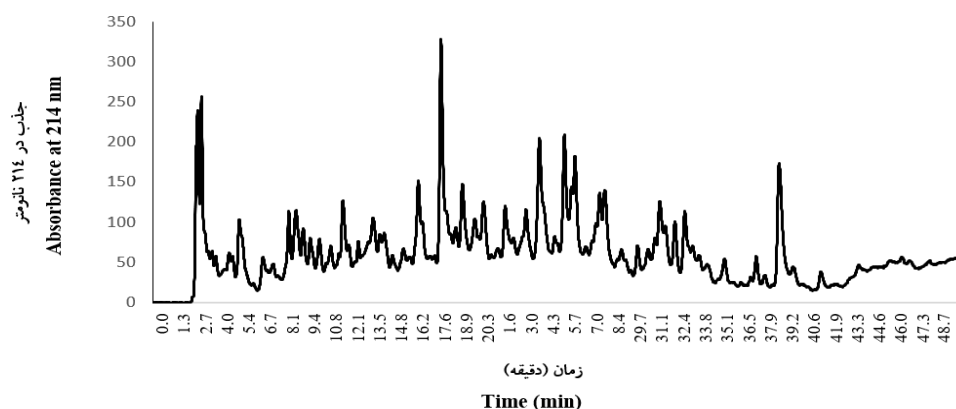
نیز مانند سایر شاخص‌ها به نوع آنزیم پروتئاز، درجه هیدرولیز و ترکیب اسید آمینه‌ای پپتیدها وابسته است. میزان این شاخص به خصوص در فراکسیون‌های ۴۹ تا ۶۳ پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بیشینه بود (شکل ۵). مطابق انتظار نتایج این بخش با نتایج مهار رادیکال آزاد DPPH همخوانی بالایی داشت. این امر می‌تواند به دلیل پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و دارای اسیدهای آمینه آروماتیک و آبگریز باشد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند. همچنین نوع اسید آمینه موجود در توالی پپتیدی تأثیر زیادی بر روی ویژگی آن دارد. به‌عنوان مثال اسیدهای آمینه آبگریز حاوی گروه‌های آلفاتیک غیر قطبی (نظیر والین، ایزولوسین، پرولین، لوسین، تریپتوفان و تیروزین) به‌طور مؤثری توانایی جذب رادیکال‌های آزاد در مواد غذایی با چربی بالا دارند (۳۳، ۱۸).
خالص‌سازی با RP-HPLC و بررسی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی فراکسیون‌ها: RP-HPLC یکی از مناسب‌ترین روش‌ها جهت جداسازی پپتیدها در هیدرولیز شده‌های پروتئینی است که می‌تواند برآورد خوبی از نسبت هیدروفوبیک/هیدروفیلیک پپتیدها نیز



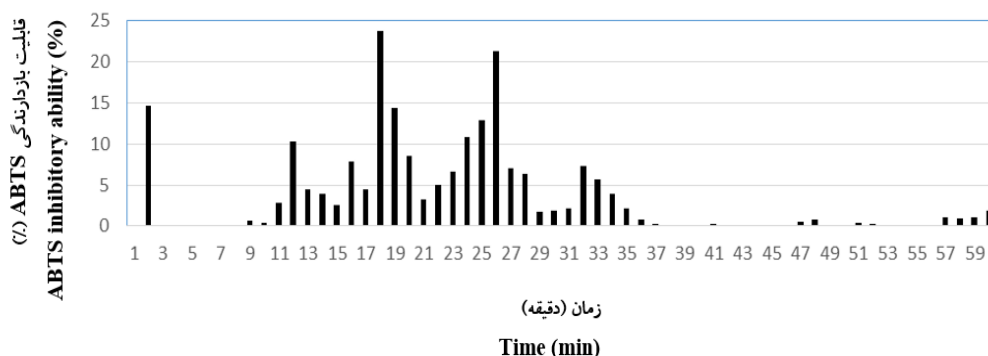
شکل ۶- پروفایل RP-HPLC نمونه کنترل
 Figure 6- RP-HPLC profile of control sample

در این مرحله در شکل‌های ۷ و ۸ آورده شده است. بر اساس نتایج به دست آمده محدوده فعالیت فراکسیون‌های کدو از نظر به دام اندازی رادیکال ABTS از حدود صفر تا ۲۴ درصد (شکل ۸) متغیر بود. بیشترین فعالیت به فراکسیون‌های جریان یافته در زمان‌های ۱۸ و ۲۶ دقیقه مربوط بود. مظلومی و همکاران (۲۰۲۰) در بررسی خصوصیات فراکسیون‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه پرتقال بعد از انجام RP-HPLC روی فعال‌ترین فراکسیون‌های حاصل از SEC، گزارش کردند که فراکسیون جریان یافته در زمان ۲۲ دقیقه دارای بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بود (۲۱).

مخلوطی از اجزاء پپتیدی فعال بدست آمده از جداسازی کروماتوگرافی با SEC (مجموعه اجزاء پپتیدی فراکسیون‌های شماره ۵۶-۴۹ با بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی) پس از حل شدن در آب دیونیزه با استفاده از RP-HPLC آنالیز گردیدند و فراکسیون‌های پپتیدی بر اساس میزان قطبیت جداسازی شدند. در طی خلص سازی با RP-HPLC فراکسیون‌های یک میلی‌لیتری (مجموعاً ۵۰ فرکسیون) جمع‌آوری گردید و پس از خشک شدن مجدداً در آب دیونیزه حل گردید تا از نظر فعالیت آنتی اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفته و فعال‌ترین فراکسیون‌ها تعیین گردند. نتایج مربوط به جداسازی با RP-HPLC و فعالیت آنتی اکسیدانی فراکسیون‌های به دست آمده



شکل ۷- پروفایل RP-HPLC مخلوط فراکسیون‌های فعال پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو پس از جداسازی با SEC
Figure 7- RP-HPLC profile of a mixture of active fractions of hydrolyzed pumpkin seed protein after separation by SEC



شکل ۸- ویژگی‌های آنتی اکسیدانی بر اساس بازدارندگی رادیکال ABTS فراکسیون‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بعد از جداسازی توسط RP-HPLC

Figure 8- Antioxidant properties based on ABTS radical inhibition of pumpkin seed hydrolyzed protein fractions after separation by RP-HPLC

نتیجه‌گیری

امروزه پپتیدهای زیست فعال به علت قابلیت استفاده در تهیه مواد غذایی فراسودمند مورد علاقه و توجه هستند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش‌های متداول برای تولید پپتیدهای زیست فعال با قابلیت آنتی اکسیدانی مناسب است. در تحقیق حاضر پروتئین دانه کدو ابتدا بر مبنای یافته‌های تحقیق قبلی در شرایط بهینه جهت حصول به حداکثر قابلیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده و سپس تأثیر توزیع وزن مولکولی بر خصوصیات زیست‌فعالی فراکسیون‌های حاصله و همچنین ارتباط بین ترکیب اسید آمینه این پپتیدها با ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پس از جداسازی و خالص‌سازی توسط کروماتوگرافی طرد اندازه (SEC) و همچنین کروماتوگرافی مایع با فشار بالا- فاز معکوس (RP-HPLC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج

کروماتوگرافی طرد اندازه نشان داد که فراکسیون‌های ۴۹ تا ۵۶ با وزن مولکولی معادل ۱۳۰۰۰ دالتون دارای قابلیت آنتی اکسیدانی بالایی بوده و پس از خالص‌سازی بیشتر این فراکسیون‌ها توسط RP-HPLC این قابلیت در فراکسیون‌های با زمان بازداری ۲۲ دقیقه بالاترین میزان را نشان داد. نتایج آنالیز اسید آمینه نشان داد که فراکسیون‌های با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا حاوی مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه آبریز (حدود ۳۳/۵ درصد) هستند. نتایج این تحقیق نشان داد که با هیدرولیز پروتئین دانه کدو تحت شرایط بهینه امکان دستیابی به محصولی حاوی فراکسیون‌های با قابلیت آنتی اکسیدانی بالا وجود دارد. بنابراین از پروتئینی هیدرولیز شده دانه کدو می‌توان به عنوان یک جزء در فرمولاسیون غذاهای فراسودمند استفاده نمود.

References

- Blanca, H.L., Ana, Q., Lourdes, A., and Isidra, R. 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy J.* 17:1. 42-49.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Hemalatha, R., and Kumar, B.D. 2013. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Research International.* 52:1. 221-229.
- Chang, S.K., Ismail, A., Yanagita, T., Esa, N.M., and Baharuldin, M.T.H. 2015. Antioxidant peptides purified and identified from the oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) kernel protein hydrolysate. *J. Functional Foods.* 14:1. 63-751.
- Clement, A., Vioque, J., and Millan, F. 1999. Vegetable Protein Hydrolysate in *Nutricion y Obesidad.* Food Science. 2:1. 289- 296.
- Collins, A.R. 2005. Antioxidant intervention as a route to cancer prevention. *European J. of Cancer.* 41:13.1923-30.
- Contreras, M., Hernández-ledesma, B., Amigo, L., and Martín-Álvarez, P.J. 2011. Production of antioxidant hydrolyzates from a whey protein concentrate with thermolysin: Optimization by response surface methodology. *LWT - Food Science and Technology.* 44:1. 9-15.
- Corêa, A.P.F., Daroit, D.J., Fontoura, R., Meira, S.M.M., Segalin, J., and Brandelli, A. 2014. Hydrolysates of sheep cheese whey as a source of bioactive peptides with antioxidant and angiotensin - converting enzyme inhibitory activities. *Peptides.* 61:1. 48-55.
- Dey, S.S., and Dora, K.C. 2014. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *J of food science and technology.* 51:3.449-457.

9. Escudero, E., Aristoy, M.C., Nishimura, H., Arihara, K., and Toldrá, F. 2012. Antihypertensive effect and antioxidant activity of peptide fractions extracted from Spanish dry-cured ham. *Meat Science*. 91:1. 306–311
10. Etemadi, M., Sadeghi mahoonak, A.R., Ghorbani, M. and Maqsoudlou, Y. 2016. Production and evaluation of chelating activity and reducing power of hydrolyzed proteins derived from soy protein. *J of Food Science and Nutrition*. 13: 1.65-74. (In Persian)
11. Gauthier, SF., Pouliot, Y., and Saint-Sauveur, D. 2006. Immuno modulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy J*. 16:11. 1315-1323.
12. Gibbs, B.F., Kermasha, S., Alli, I., and Mulligan, C.N. 1999. Encapsulation in the food industry. *International J of Food Sciences and Nutrition*. 50:3. 213–224.
13. Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R.B.S.-B., Mehiri, M., and Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry*. 49: 6.963-972
14. Jia, J., Maa, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., and Luo, L. 2010. The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*. 119:1. 336–42.
15. Kaveh, Sh., Sadeghi mahoonak, A.R., Ghorbani, M. and Sarabandi, Kh. 2019. Comparison of antioxidant properties of hydrolyzed fenugreek seed protein with alcalase and pancreatin. *J. Innovation in Food Science and Technology*. 11: 4.77-88. (In Persian)
16. Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.-C., and Nasri, M. 2015. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. *J. Functional Foods*. 13:1. 225-238 .
17. Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*. 106:2. 444-450 .
18. Liang, L., Cai, S., Gao, M., Chu, X., Pan, X., Gong, K., Xiao, C., Chen, Y., Zhao, Y., Wang, B., and Sun, k. 2019. Purification of antioxidant peptides of *Moringa oleifera* seeds and their protective effects on H₂O₂ oxidative damaged Chang liver cells. *J. Functional Foods*. 64:1. 103698.
19. Maqsoudlou, A., Sadeghi mahoonak, A.R., Mora, L., Mohebodini, H., Toldrá, F., and Ghorbani, M. 2019. Peptide identification in alcalase hydrolysed pollen and comparison of its bioactivity with royal jelly. *Food Research International*. 116:1. 905-915.
20. Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J of Agricultural and Food Chemistry*. 50:1. 3444–3452.
21. Mazloomi, N., Mora, L., Aristoy, M., Sadeghi mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Houshmand, Gh., and Toldrá, F. 2020. Impact of Simulated Gastrointestinal Digestion on the Biological Activity of an Alcalase Hydrolysate of Orange Seed (*Siavaraze, Citrus sinensis*) by-Products. *Foods*. 9: 9. 1217.
22. Mazloomi, N., Sadeghi mahoonak, A.R., Ghorbani, M. and Hooshmand, Gh.R. 2019. Determination of optimal production conditions of antioxidant peptides resulting from hydrolysis of orange kernel protein with alcalase enzyme. *Food science and Technology*. 88: 16. 343-356. (In Persian)
23. McCann, KB., Shiell, BJ., Michalski, WP., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. 2006. Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine As1-casein. *International Dairy J*. 16:1. 316–323.
24. Meisel, H., and Fitz-gerald, R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins, mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical design*. 9: 1. 1289–1295.
25. Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, S.K. 2005. Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin

- gelatin hydrolysate. Food Chemistry. 53: 3. 581-587.
26. Meshginfar, N., Sadeghi-mahoonak, A. R., Ghorbani, M. and Aalamai, M. 2016. Effects of protein hydrolysate from sheep visceral on oxidative stability of soybean oil and chicken sausage. J of Food Processing and Preservation. 41: 2.12875.
 27. Moayedi, A., Mora, L., Aristoy, M., Hashemi, M., Safari, M., and Toldra, F. 2016. ACE-Inhibitory and Antioxidant Activities of Peptide Fragments Obtained from Tomato Processing By-Products Fermented Using *Bacillus subtilis*: Effect of Amino Acid Composition and Peptides Molecular Mass Distribution. Applied Biochemistry Biotechnology. 181: 1.48-64.
 28. Mohamed, R.A., Ramadan, R.S., and 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. Advanced Biomedical Research. 3: 1. 9-15.
 29. Nkosi, C.Z, Opoku A.R., and Terblanche S.E. 2006. Antioxidative effects of pumpkin seed (*Cucurbita pepo*) protein isolate in CCl₄ Induced liver injury in low protein fed rats. Phytotherapy Research 20:11. 935-940
 30. Normohamadi, E., Sadeghi-mahoonak, A.R., Aalami, M., Ghorbani, M. and Sadeghi, M. 2018. Optimization of pumpkin seed meal protein hydrolysis with alcalase to achieve to maximum antioxidant properties. J. Food Processing and Preservation, 9: 2.11-17. (In Persian)
 31. Ovissipour, M.R., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., and Nazari, R.M. 2010. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioprocess Technology. 5: 2. 696-705.
 32. Palmieri, V.O., Grattagliano, I., Portincasa, P., and Palasciano, G. 2006. Systemic oxidative alterations are associated with visceral adiposity and liver steatosis in patients with metabolic syndrome. J. Nutrition. Oxford University Press.136: 12.3022–3026.
 33. Phongthai, S., and Rawdkuen, S. 2019. Fractionation and characterization of antioxidant peptides from rice bran protein hydrolysates stimulated by. Cereal Chemistry. 97:2. 316–325.
 34. Power, O., Jakeman, P., and FitzGerald, R. 2013. Antioxidative peptides: enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. Amino Acids. 44: 3. 797-820.
 35. Sadeghian, A., Sadeghi-mahoonak, A.R. Ghorbani, M., Aalami, M. and Joshghani, H. 2020. Effect of process time on functional and antioxidant properties of quinoa hydrolyzed protein with alcalase and pancreatin. Journal of Nutrition Science and Food Technology. 14: 4.89-102. (In Persian)
 36. Saiga, A.I., Tanabe, S., and Nishimura, T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. J. Agriculture and Food Chemistry. 51: 12. 3661-3667.
 37. Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., and Juneja, L.R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. Food Chemistry. 86: 1.99-103.
 38. Salwanee, S., Wan Aida, W.M., Mamot, S., and Maskat, M.Y. 2013. Effects of enzyme concentration, temperature, pH and time on the degree of hydrolysis of protein extract from viscera of tuna (*Euthynnus affinis*) by using alcalase. Sains Malaysiana. 42:3. 279-287.
 39. Samaranyaka, G.P.A., and Li-Chan, C.Y.E. 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J. Functional Foods. 3: 4. 229-254.
 40. Shariat-alvai, M., Sadeghi mahoonak, A.R., Gorbani, M., Aalami, M. and Mohammadzadeh, J. 2019. Determining the optimal conditions for the production of hydrolyzed proteins with antioxidant capacity and reduction of nitric oxide from tomato waste by

- alcalase. Food science and Technology. 15: 84. 137-151. (In Persian)
41. Sun, J., He, H., and Xie, B.J. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. Food Chemistry. 52: 6646-52.
 42. Tang, C.-H., Peng, J., Zhen, D.-W., and Chen, Z. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (*Fagopyrum esculentum Moench*) protein hydrolysates. Food Chemistry. 115: 2.672-678.
 43. Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., and Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chemistry. 132: 1.104-111.
 44. Yildirim, A., Mavi, A., and Kara, A.A. 2001. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. J. Agricultural and Food Chemistry. 49: 8.4083-4089 .
 45. You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M., and Ren, J. 2010. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 120: 3.810-6.
 46. Zhang, S.B., Wang, Z., and Xu, S.Y. 2008. Antioxidant and antithrombotic activities of rapeseed peptides. J of the American Oil Chemists' Society. 85: 6.521-527.
 47. Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, D. X., Zhong, H., Wang, S., Sun, W., and Zhou, Q. 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food Chemistry. 134: 1.1360-1367.
 48. Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry. 41:6. 1296-1302.
 49. Zhu, L., Chen, J., Tang, X., and Xiong, Y.L. 2008. Reducing, radical scavenging and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. J. of Agricultural and Food Chemistry. 56: 8. 2714-2721.
 50. Živanović, I., Vaštag, Z., Popović, S., Popović, L., and Peričin, D. 2011. Hydrolysis of hull-less pumpkin oil cake protein isolate by Pepsin. International J of Biological and Life Sciences. 7: 1. 30-34.