نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد نهم، شماره اول، ۹۶
۱-۱۲
http://ejfpp.gau.ac.ir

بهینه‌سازی هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو با آلکالاز جهت دستیابی به بیشینه ویژگی ضداکسایشی

الهام نورمحمدی[1*]، علیرضا صادقی ماهونک[2]، مهران اعلمی[2]، محمد قربانی[2] و معصومه صادقی[3]

[1]دانش‌آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[2]دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[3]عضو هیأت‌علمی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان، اصفهان، ایران

دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۱۵ ؛ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۳/۰۴

چکیده

سابقه و هدف: یکی از ویژگی‌های پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، خاصیت ضداکسایش این ترکیبات است که امکان استفاده از آنها را به‌عنوان جایگزین‌های طبیعی ترکیبات ضداکسایش رایج در صنعت غذا میسر می‌سازد. در این پژوهش بهینه‌سازی تولید پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله دانه کدو (*Cucurbita pepo*) توسط آنزیم آلکالاز جهت دستیابی به بیشینه ویژگی مهارکنندگی رادیکال DPPH[2] مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز با استفاده از روش سطح پاسخ و توسط طرح مرکب مرکزی انجام گرفت. به این منظور غلظت آنزیم ۲-۱ درصد، دمای ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان هیدرولیز ۵-۲ ساعت به‌عنوان سطوح متغیرهای مستقل انتخاب شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای دست یافتن به بیشینه ویژگی مهارکنندگی رادیکال DPPH، دمای ۵۰/۱ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳/۵۲ ساعت و غلظت ۲ درصد آنزیم آلکالاز بود. در این شرایط قابلیت ضداکسایشی هیدرولیزشده‌های پپتیدی زیست فعال حاصله برابر با ۸۹/۴۷ درصد و تا حدود زیادی نزدیک به میزان پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار (۸۸/۰۸ درصد قابلیت ضد اکسایشی) بود. میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده برای مدل ارائه شده به‌ترتیب برابر با ۰/۹۵۸۵ و ۰/۹۲۱۱ و مقدار عدم برازش معادل ۰/۲۴۳۴ بیانگر اعتبار مدل پیشنهادی و تناسب بالای مدل می‌باشد.

نتیجه‌گیری: بر اساس نتایج حاصل پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله دانه کدو از قابلیت ضداکسایشی مناسبی جهت تولید مواد غذایی عملگرا برخوردار هستند.

واژه‌های کلیدی: هیدرولیز، آنزیم، آلکالاز، کنجاله دانه کدو

*مسئول مکاتبه: elham_2191@yahoo.com

2. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

مقدمه

هیدرولیز پروتئین‌ها، شکستن آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر و آمینواسیدهای آزاد است. آنزیم‌های مورد استفاده برای هیدرولیز پروتئین‌ها ممکن است منشأ حیوانی، گیاهی یا میکروبی داشته باشند. از طریق اثر همزمان اندوپپتیدازها و اگزوپروتئازها می‌توان به‌طور مؤثرتری به پپتیدهایی با درجه هیدرولیز بالا و ویژگی مورد نظر رسید. این ترکیبات هیدرولیز شده در تغذیه بیماران خاص مانند افراد مبتلا به فنیل کتونوری، حساسیت غذایی و بیماری‌های کبدی، تغذیه سالمندان، رژیم غذایی ورزشکاران و رژیم‌های غذایی برای کنترل وزن به‌کار می‌رود. علاوه بر ارزش غذایی، پروتئین‌های هیدرولیز شده واجد ویژگی‌های بیولوژیک متعدد مانند خاصیت ضداکسایشی، ضدمیکروبی، ضد فشار خون، ضد لخته شدن خون، ضدسرطان و کنترل کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی بدن نیز می‌باشند (۱۸).

تنش اکسایشی نوعی عدم تعادل میان گونه‌های فعال اکسیژن و قدرت ضداکسایشی دفاعی بدن است. این تنش ممکن است تحت تأثیر فاکتورهای داخل سلولی مانند تنفس، کمبود اکسیژن در بافت‌های بدن، گزانتین اکسیداز و کاتکول آمین‌ها یا فاکتورهای خارج سلولی مانند امواج ماوراء بنفش، آلودگی‌های محیطی، آلاینده‌های مواد غذایی و برخی متابولیت‌های تولید شده توسط میکروارگانیسم‌ها باشد. انواع مختلفی از ترکیبات ضد اکسایش به‌منظور کنترل رادیکال‌های آزاد تولید شده در جریان اکسیداسیون مورد استفاده قرار می‌گیرند که پپتیدهای زیست فعال تولید شده به روش‌های آنزیمی و یا شیمیایی جزء این گروه به شمار می‌روند. اخیراً به‌دلیل تقاضای روزافزون برای ضد اکسایندهای طبیعی و ایمن پپتیدهای زیست فعال کانون توجهات واقع شده و به شکل گسترده‌ای مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱۵). در پژوهشی که توسط کومبی و همکاران (۲۰۰۸) بر روی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا توسط آلکالاز و فلیورزایم انجام گرفت، پپتیدهای تولید شده خواص ضداکسایشی قوی به‌ویژه از نظر قدرت مهار رادیکال آزاد و قدرت احیاءکنندگی نشان دادند (۴). ویریافان و همکاران (۲۰۱۲) اعلام کردند که در نتیجه هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی راشگو توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین، پپتیدهای تولید شده توسط آنزیم پپسین با درجه هیدرولیز ۵ درصد بیشترین قابلیت ضد اکسایشی را به خود اختصاص دادند (۲۱). وجود خواص ضد اکسایشی در پپتیدهای حاصل از هیدرولیز دو مرحله‌ای ضایعات ماهی تون توسط فلیورزایم، آلکالاز، پروتامکس و نوتراز مشاهده شد. بررسی خاصیت ضد اکسایشی این پپتیدها از نظر رادیکال DPPH، رادیکال هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن نشان داد که مرحله دوم هیدرولیز منجر به ایجاد خواص ضداکسایش قوی‌تری نسبت به مرحله اول هیدرولیز شد (۵). وجود پپتیدهای ضداکسایش در ماهی اسقومری (۲۲)، یونجه (۲۳)، آفتابگردان (۱۸)، سیب زمینی (۱۱)، نخود (۷) و جوانه گندم (۲۴) نیز تأیید شده است.

آنزیم آلکالاز یک پروتئاز میکروبی و قلیایی با فعالیت کاتالیتیک بالاست که توسط *Bacillus Licheniformis* تولید شده و قادر است در pH مناسب و در کوتاه‌ترین زمان درجه هیدرولیز بالایی در مقایسه با پروتئازهای اسیدی یا طبیعی ایجاد نماید. این آنزیم بارها توسط محققین مختلف مورد استفاده قرار گرفته و تأثیر آن در تولید هیدرولیز شده‌های پروتئینی به اثبات رسیده است (۱۶). دانه کدو منبعی غنی از پروتئین و فیتوسترول و سرشار از مواد معدنی مانند روی، پتاسیم، کلسیم، منیزیوم، آهن، مس، فسفر و بتاکاروتن است. ایزوله پروتئین کدو به‌علاوه حاوی ترکیبات ضداکسایش بوده و در کاهش اثرات مخرب

مربوط به سوء تغذیه نیز مؤثر می‌باشد (۱۰). کاربرد اصلی دانه کدو در صنعت به منظور تولید روغن می‌باشد. کنجاله‌ای که پس از روغن کشی از این ترکیب به جای می‌ماند حاوی درصد بالائی پروتئین است که در حال حاضر با قیمت اندک به مصرف خوراک دام می‌رسد. با توجه به موارد ذکر شده در این تحقیق تلاش شده است شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین موجود در کنجاله دانه کدو با استفاده از آنزیم آلکالاز به منظور دستیابی به بیشینه ویژگی مهارکنندگی رادیکال DPPH مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: کنجاله دانه کدو (*Cucurbita pepo con. Pepo var. Styriaca*) از شرکت سویابین گرگان خریداری شد. آنزیم آلکالاز (تهیه شده از باکتری *Bacillus licheniformis*، با فعالیت ۲/۴ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم) و رادیکال DPPH از شرکت سیگما خریداری شدند. سود، اسیدکلریدریک و اتانول از شرکت مرک تهیه شدند. تمام مواد مورداستفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

اندازه‌گیری رطوبت به روش AACC ۴۴-۱۵ (۱۹۹۹) انجام شد (۱). به‌طور خلاصه ۳-۲ گرم نمونه در آون ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. پس از رسیدن نمونه‌ها به وزن ثابت توزین شده و رطوبت توسط رابطه ۱ محاسبه گردید.

$$\text{رابطه (۱)} \qquad \%\ \text{رطوبت} = \frac{\text{کاهش رطوبت بر حسب گرم}}{\text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰$$

خاکستر کنجاله با استفاده از روش AACC۰۸-۰۱ (۱۹۹۹) اندازه‌گیری شد (۱). ۵-۳ گرم از نمونه در کروزه با وزن معین توزین و کروزه در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به خاکستر بارنگ خاکستری روشن یا رسیدن به وزن ثابت قرار گرفت. سپس کروزه در دسیکاتور خنک و توزین شد. درصد خاکستر از رابطه ۲ محاسبه شد.

$$\text{رابطه (۲)} \qquad \%\ \text{خاکستر} = \frac{\text{وزن باقیمانده}}{\text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰$$

برای اندازه‌گیری پروتئین کنجاله از روش AACC ۱۲-۴۶ (۱۹۹۹) استفاده شد (۱). یک گرم از کنجاله آرد شده در ظرف مخصوص هضم توزین و ۲۵ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک ۹۸ درصد برای هضم به‌آن افزوده شد. هضم کامل نمونه تا رسیدن به رنگ سبز شفاف ادامه یافت. پس از هضم کامل ۳۰۰-۲۵۰ میلی‌لیتر آب و ۱۲۰ میلی‌لیتر سود ۴۰ درصد همراه با پرل و پودر روی برای ممانعت از ایجاد کف زیاد به محلول هضم شده افزوده شد. یک ارلن حاوی ۵۰ میلی‌لیتر اسید بوریک و چند قطره معرف متیل‌رد در انتهای دستگاه تقطیر به‌نحوی‌که قسمت انتهایی دستگاه تقطیر به شکل کامل در اسید غوطه‌ور باشد قرار داده شد و تقطیر تا رسیدن به حداقل حجم ۲۵۰ میلی‌لیتر انجام گرفت. محلول حاصل با استفاده از اسیدسولفوریک ۰/۱ نرمال تا رسیدن به رنگ صورتی تیتر و درصد پروتئین کل از رابطه ۳ محاسبه شد.

رابطه (۳)

$$\%\ \text{ازت} = \frac{\text{میلی‌لیتر اسیدمصرفی} \times \text{نرمالیته اسید سولفوریک} \times ۱۰۰ \times ۴/۷}{\text{وزن نمونه}}$$

برای اندازه‌گیری چربی ۳ گرم نمونه روی کاغذ صافی توزین شده و پس از بستن کاغذ صافی در قسمت استخراج‌کننده دستگاه سوکسله قرار داده شد. پس از متصل کردن بالن با وزن مشخص، دوسوم از حجم بالن با حلال پترولیوم اتر پرشده و عمل استخراج چربی به‌مدت ۶ ساعت انجام گرفت. پس از این مراحل حلال اضافی بازیافت و با قرار دادن بالن در آون ۶۰ درجه سانتی‌گراد باقی‌مانده حلال جداسازی و بالن مجدداً توزین شد. درصد چربی با استفاده از رابطه ۴ محاسبه شد (۱۲).

رابطه (۴) $\text{٪ چربی} = \frac{\text{وزن اولیه بالن} - \text{وزن ثانویه بالن}}{\text{وزن نمونه}} \times ۱۰۰$

تهیه کنسانتره پروتئین دانه کدو: کنجاله دانه کدو چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. به‌منظور باز شدن ساختمان پروتئین در اثر تجمع بارهای همنام، pH محلول توسط محلول سود ۱ نرمال به ۱۰ رسانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. محلول حاصل به‌مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۵۰۰۰ برابر شتاب گرانش زمین قرار گرفت. به‌منظور رسوب‌دهی پروتئین‌های دانه کدو مایع رویی پس از سانتریفیوژ توسط اسیدکلریدریک ۱ نرمال به pH ۵ رسانده شد و تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ شد. رسوب به‌دست‌آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت (۲۵).

هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو: به‌منظور هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو، کنسانتره به نسبت ۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر تریس-اسیدکلریدریک با pH برابر با ۹ (حد بهینه آنزیم) پراکنده و آنزیم در غلظت ۱ تا ۲ درصد افزوده شد. سپس هیدرولیز در محدوده‌ی دمایی ۵۵-۴۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کره جنوبی) با ۲۰۰ دور بر دقیقه انجام شد. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفیوژ کردن در ۵۰۰۰ برابر شتاب گرانش زمین به‌مدت ۳۰ دقیقه برای حذف ترکیبات اضافه انجام گرفت (۲۰).

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH: برای این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیزشده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد. مخلوط به‌مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه داشته شد. در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (۳).

در نمونه کنترل به‌جای محلول پروتئین هیدرولیزشده از ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه ۵ محاسبه گردید:

رابطه (۵)

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال (٪)} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

بهینه‌سازی فرایند: به‌منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر خواص ضد اکسایشی از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی 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 یک از متغیرهای مستقل با توجه به نتایج آزمون‌های آزمایشی به دست آمد .

پاسخ موردبررسی ویژگی مهارکنندگی رادیکال DPPH بود. 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 رگرسیونی به‌منظور پیش‌بینی پاسخ‌های موردنظر به‌صورت رابطه ۶ پیشنهاد شد. در رابطه ۶، y پاسخ یا متغیر وابسته (فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در مقدار واقعی)، b_0 مقدار ثابت، b_1، b_2 و b_3 اثرات خطی، b_{11}، b_{22} و b_{33} اثرات درجه دوم و b_{12} ، b_{13} و b_{23} اثرات متقابل می‌باشند. ضرایب رگرسیونی، رسم نمودارها و بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار دیزاین اکسپ انجام و معنی‌داری آزمون‌ها از طریق محاسبه مقدار F در سطح احتمال ۰/۰۵ بررسی شد.

رابطه (۶)

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

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه‌سازی فعالیت ضد اکسایشی پروتئین هیدرولیزشده دانه کدو

Table 1. Different levels of independent factors used for optimization of anti-oxidative activity of hydrolyzed pumpkin seed protein

حدود تغییرات Range			متغیرهای مستقل Independent factors
1	1.5	3	غلظت آنزیم (٪) Enzyme concentration (%)
45	50	55	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد) Hydrolysis temperature (°C)
2	3.5	7	زمان هیدرولیز (ساعت) Hydrolysis time (h)

درنهایت رابطه ۷ با در نظر گرفتن ضرایب رگرسیونی معنی‌دار برای ویژگی مهارکنندگی رادیکال DPPH پیشنهاد شد.

رابطه (۷)

فعالیت مهار رادیکال(٪) =

$$1.17\ X_3^2-2764.52-175.98X_1+42.57X_1^2-4.4\ X_2^2-$$

که در آن X_1، X_2 و X_3 به ترتیب غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز می‌باشند. میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده برای مدل ارائه‌شده به‌ترتیب برابر با ۰/۹۵۸۵ و ۰/۹۲۱۱ و مقدار عدم برازش ۰/۲۴۳۴ بود که بیانگر اعتبار مدل پیشنهاد شده است.

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

Table 2. Random treatments and resulting anti-oxidant activities of pumpkin seed protein hydrolysates

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪) DPPH radical scavenging activity (%)	زمان هیدرولیز (ساعت) Hydrolysis time (h)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد) Hydrolysis temperature (°C)	غلظت آنزیم (٪) Enzyme concentration (%)	تیمار Treatments
48.05	5	45	1	1
47.43	2	45	2	2
45.87	2	45	3	3
41.86	3.5	45	1.5	4
49.27	5	45	2	5
90.14	3.5	50	2	6
68.33	3.5	50	1.5	7
73.16	3.5	50	1.5	8
71.37	3.5	50	1.5	9
77.24	3.5	50	1.5	10
77	3.5	50	1.5	11
69.42	3.5	50	1.5	12
81.93	3.5	50	1	13
69.58	5	50	1.5	14
61.37	2	50	1.5	15
38.12	2	55	1	16
50.68	2	55	2	17
33.71	5	55	1	18
46.2	5	55	2	19
50.37	3.5	55	1.5	20

نتایج و بحث

ویژگی‌های کنجاله کدو:

نتایج آنالیز تقریبی کنجاله کدو در جدول ۳ آورده شده است.

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی کنجاله کدو.

Table 3. Chemical compositions of Pumpkin oil cake.

ویژگی* characteristic	درصد (٪) Percent (%)
پروتئین (Protein)	48.57± 3.51
چربی (Fat)	8.93± 0.58
رطوبت (Moisture)	6.24± 0.52
خاکستر (Ash)	7.11± 0.17

* نتایج میانگین سه تکرار هستند.

Data were obtained from three replications.

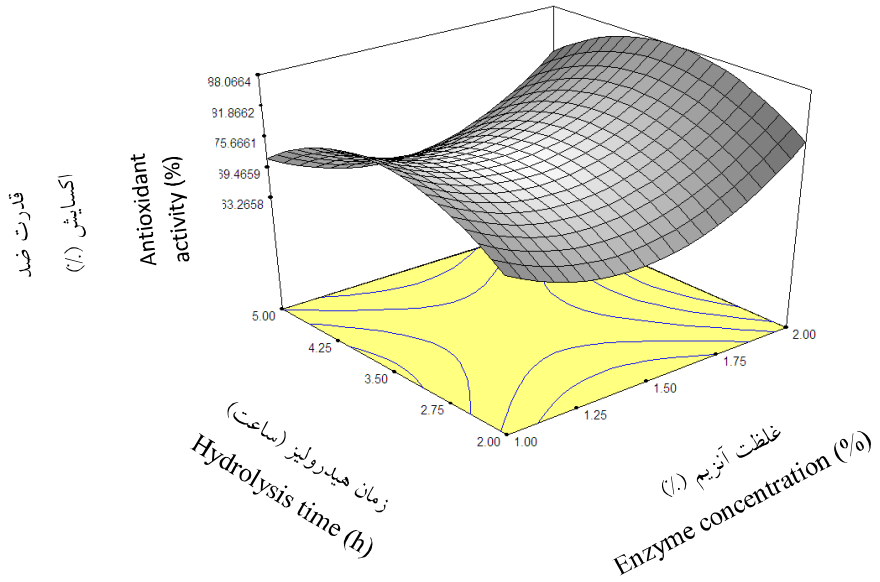
تأثیر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر مهار رادیکال DPPH: نقش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر ویژگی ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده در شکل ۱ نشان داده‌شده است. با افزایش غلظت آنزیم از ۱ تا ۱/۵ درصد کاهش جزئی در فعالیت ضداکسایشی مشاهده شد. این ویژگی با افزایش غلظت از ۱/۵ تا ۲ درصد افزایش چشمگیری نشان داد. بیشترین خاصیت ضد اکسایشی مربوط به غلظت ۲ درصد آنزیم بود.

اعتقاد بر این است که پپتیدهای حاوی ۲۰-۲ آمینواسید و با وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ (۳۰۰۰-۱۰۰۰) دالتون خاصیت ضداکسایشی قوی از خود بروز می‌دهند (۲ و ۱۳). با توجه به نتایج گزارش‌شده می‌توان نتیجه گرفت که احتمالاً میزان تولید چنین پپتیدهایی در غلظت ۲ درصد آنزیم بیشتر بوده است

در قسمت میانی نمودار مربوط به زمان هیدرولیز، قدرت ضد اکسایشی بیشتری نسبت به سایر زمان‌ها مشاهده شد. درحالی‌که در دو انتهای نمودار یعنی در زمان ۲ و ۵ ساعت هیدرولیز قدرت این ویژگی کمتر از زمان ۳/۵ ساعت بود. کمترین خاصیت ضد اکسایشی پس از ۲ ساعت هیدرولیز مشاهده شد. کم بودن خاصیت ضد اکسایشی در ساعت دوم هیدرولیز نسبت به سایر زمان‌ها را می‌توان به کم بودن زمان دسترسی آنزیم به سوبسترا برای هیدرولیز پروتئین‌ها و تولید پپتیدهای ضداکسایش نسبت داد. کاهش ویژگی ضد اکسایشی پپتیدهای تولیدی در زمان ۵ ساعت هیدرولیز نیز ممکن است در ارتباط با پیشرفت هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده پروتئینی باشد که منجر به شکسته شدن برخی از پپتیدهای ضد اکسایش تولیدشده در مراحل اولیه هیدرولیز گردد (۹).

سون و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی قدرت ضد اکسایشی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز هموگلوبین خوک اعلام کردند الزاماً رابطه مستقیمی میان زمان هیدرولیز و خاصیت ضد اکسایشی پپتیدها وجود ندارد، بلکه خواص ضد اکسایشی پپتید جزء ویژگی‌های ذاتی آن بوده و وابسته به نوع اسیدهای آمینه موجود در پپتید است (۱۷). به‌عنوان‌مثال تری پپتیدهای حاوی تریپتوفان یا تیروزین در انتهای C زنجیره یا یون هیدروکسیل اسیدهای آمینه آروماتیک در خاصیت ضد اکسایشی پپتیدها مؤثر می‌باشند (۴، ۱۴). روند تغییرات در قدرت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده در طول زمان مشابه با روند گزارش شده توسط مهرگان و همکاران (۲۰۱۳) در مورد هیدرولیز آنزیمی ماهی کاراس با استفاده از آنزیم آلکالاز بود (۸).

نقش غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر مهار رادیکال DPPH: کاهش ویژگی ضداکسایشی پپتیدها با تغییر غلظت آنزیم از ۱ تا ۱/۵ درصد و افزایش ویژگی مذکور با افزایش غلظت آنزیم از ۱/۵ تا ۲ درصد رابطه مستقیم دارد (شکل ۲).

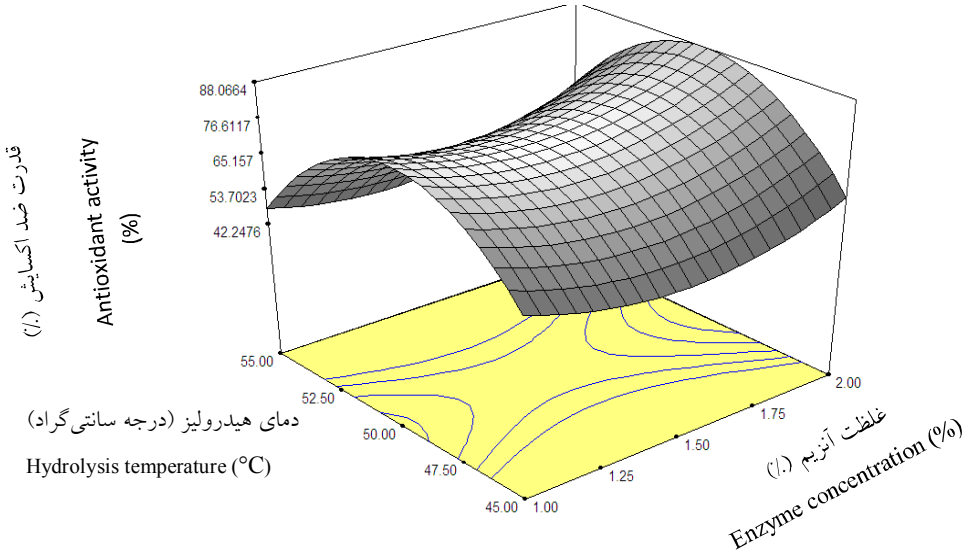


شکل ۱- تغییرات قدرت ضد اکسایش پروتئین هیدرولیز شده کدو با تغییر در غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز

Figure 1. Changes in the anti-oxidant activities of pumpkin oil cake hydrolysates in response to change in enzyme concentration and hydrolysis time

در مورد اثر دما بر خاصیت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده، از دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد تا دمای میانی یعنی ۵۰ درجه سانتی‌گراد میزان فعالیت ضد اکسایشی افزایش یافت و در ۵۰ درجه این ویژگی به حداکثر خود رسید، سپس با افزایش دما از ۵۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد این ویژگی مجدداً دچار افت گردید.

پژوهش‌ها در مورد دی- و تری پپتیدها در روغن یا سوسپانسیون‌های لیپوزومی نشان داده است که قدرت ضداکسایشی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز مربوط به شلاته کردن یون‌های فلزی و خاتمه دادن به فعالیت رادیکال‌های آزاد از طریق آمینواسیدهای خاص در زنجیره جانبی پپتیدها است (۱۸). تخریب ساختمان طبیعی پروتئین‌ها توسط آنزیم منجر به معرض‌گیری گونه‌های فعال آمینواسیدی با قابلیت ضد اکسایشی می‌گردد (۱۷) که بسته به نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، شرایط محیطی و پیش تیمارهای اعمال‌شده بر ماده اولیه متفاوت خواهد بود (۱۸). احتمالاً هیدرولیز شده‌های تولید شده در غلظت ۲٪ آنزیم و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد حاوی آمینواسیدهای خاص و ترکیبات الکترون دهنده‌ای باقابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد بوده‌اند. به‌علاوه ممکن است میزان تولید آمینواسید سیستئین که دارای خاصیت پرو اکسیدانی است، تحت این شرایط کمتر بوده باشد (۲۳). گزارش‌شده است که افزایش غلظت پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌تواند اثر ضد اکسایشی را به یک حد بیشینه برساند و پس از افزایش غلظت مزبور، اثر ضداکسایشی به پرو اکسیدانی تبدیل گردد (۱۸).

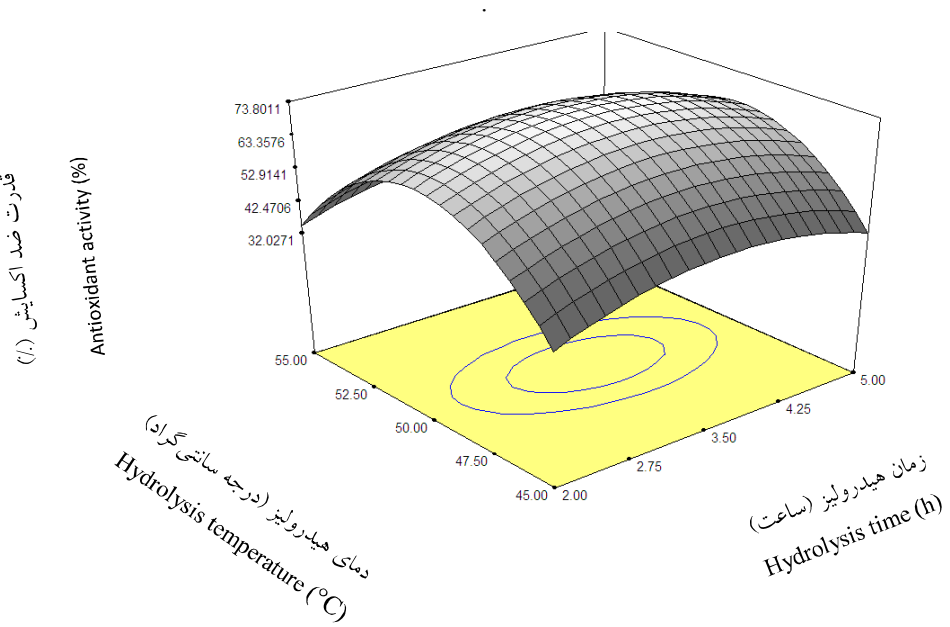


شکل ۲- اثر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال DPPH توسط پروتئین هیدرولیز شده کدو

Figure 2. Effect of enzyme concentration and hydrolysis temperature on DPPH radical scavenging activity of pumpkin oil cake hydrolysates

اثر زمان و دمای هیدرولیز بر خاصیت ضداکسایشی: مطابق با شکل ۳ کمترین قدرت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده کدو مربوط به دمای ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد و بیشترین میزان این ویژگی مربوط به دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد بود. تأثیر تغییرات زمان هیدرولیز بر خاصیت مهار رادیکال DPPH کندتر از غلظت آنزیم بود و این تغییرات در انتهای دوره هیدرولیز کندتر از سایر زمان‌ها بود. از زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت خواص ضد اکسایشی نمونه‌ها افزایش و پس از زمان ۳/۵ تا ۵ ساعت این ویژگی با سرعت اندکی دچار افت گردید. بنابر نتایج به‌دست‌آمده تمامی پپتیدهای زیست فعال تولیدشده دارای خاصیت مهار رادیکال DPPH بودند، اما بیشترین میزان این خاصیت مربوط به پپتیدهای تولیدشده تحت شرایط دمایی ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۳/۵ ساعت هیدرولیز و غلظت ۲ درصد آنزیم بود که ممکن است به علت افزایش در دسترس بودن مکان‌های فعال و آمینواسیدهای مؤثر مانند تیروزین و متیونین، آمینواسیدهای آب‌گریز مانند پرولین، لوسین، آلانین، تریپتوفان و فنیل آلانین، آمینواسیدهای اسیدی مانند اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک و آمینواسیدهای بازی مانند لیزین باشد که قادر به واکنش دادن با رادیکال و مهار آن می‌باشند (۱۹)

اعتبار سنجی مدل: بررسی اعتبار مدل ارائه‌شده توسط نرم‌افزار دیزاین انجام گرفت. شرایط بهینه به‌منظور دستیابی به بیشینه پتانسیل مهار رادیکال DPPH به میزان ۸۸/۰۸ درصد در دمای ۵۰/۱ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۳/۵۲ ساعت و غلظت آنزیم برابر با ۲ درصد توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. به‌منظور بررسی اعتبار شرایط پیشنهادشده توسط نرم‌افزار تیمار مورد نظر در دو تکرار تولید و خاصیت مهار رادیکال DPPH طبق روش ذکر شده بررسی شد. این ویژگی در شرایط بهینه برابر با ۸۹/۴۷ درصد محاسبه گردید که تا حدود زیادی نزدیک به میزان پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار است. با توجه به نتایج، مدل پیشنهادی توسط نرم‌افزار به‌خوبی قادر به پیش‌بینی اثرات سه متغیر زمان، دما و غلظت آنزیم بر خاصیت ضد اکسایشی پروتئین دانه کدو بوده است.



شکل ۳- تغییرات قدرت ضد اکسایشی پروتئین هیدرولیز شده کدو با تغییر در دما و زمان هیدرولیز

Figure 3. Changes in anti-oxidative activity of pumpkin oil cake hydrolysates in response to changes in hydrolysis time and temperature

نتیجه‌گیری کلی

رادیکال‌های آزاد ناشی از اکسیداسیون چربی‌ها منجر به صدمات جدی به‌سلامت مصرف‌کننده و نیز تغییر و یا افت کیفیت مواد غذایی می‌گردند. در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو به‌منظور تعیین شرایط بهینه در تولید پپتیدهای واجد خواص ضد اکسایشی موردبررسی قرار گرفت. بنا بر نتایج به‌دست‌آمده هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو یک روش مؤثر در تولید پپتیدها با ویژگی ضد اکسایشی است. از چنین پپتیدهایی می‌توان به‌عنوان ترکیبات ضد اکسایش طبیعی و جایگزین ترکیبات ضد اکسایش سنتزی در فرمولاسیون‌های غذایی استفاده نمود.

منابع

1. AACC. 1999. Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Accusation of Cereal Chemists. Ins.
2. Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., and Zhou, H.M. 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. International Food Research Journal. 20: 5.2081-2090.
3. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and 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.
4. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry.109: 1.144-148.
5. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., and Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International. 42: 9.1266-1272.

6. Kaur, M., and Singh, N. 2007. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicerarietinum* L.) cultivars. Food Chemistry. 102: 1.366-374.
7. 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.
8. Mehregan Nikoo, A.R., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Taheri, A., and Alami, M. 2013. Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by response surface methodology. Electronic Journal of Food Processing and Preservation. 5: 1. 95-110. (In Persian)
9. Meshkinfar, N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ziaiifar, A.M., Ghorbani, M., and Kashani Nejad, M. 2014. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. Tabriz Journal of Food Researches. 24: 2.215-225. (In Persian)
10. 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: 1-2. 9-15.
11. Nieto, G., Castillo, M., Xiong, Y., Alvarez, D., and Payne, F. 2009. Antioxidant and emulsifying properties of alcalase-hydrolyzed potato proteins in meat emulsions with different fat concentrations. Meat Science. 83: 1.24-30.
12. Parvaneh, V. 2004. Quality control and chemical analysis of foods. Tehran Univ. Press, 332p. (In Persian)
13. Ren, J., Zheng, X.Q., Liu, X.L., and Liu, H. 2010. Purification and characterization of antioxidant peptide from sunflower protein hydrolysate. Food Technology and Biotechnology. 48: 4.519-523.
14. Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., and Nokihara, K. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural Food Chemistry. 51: 12.3668-3674.
15. Sakanaka, S., and Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry. 95: 2.243–249.
16. Sherafat, N., Motamedzadegan, A., and Safari, R. 2012. The effect of enzymatic hydrolysis of Skipjack tuna after cooking waste by alcalase on the nitrogen recovery and molecular size of hydrolyzed proteins. Sabzevar Azad University, Journal of Innovation in Food Science and Technology, 3: 47-54.
17. Sun, Q., Shen, H., and Luo, Y. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. Journal of Food Science and Technology. 48: 1.53-60.
18. Taha, F.S., Mohamed, S.S., Wagdy, S.M., and Mohamed, G.F. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. World Applied Science Journal. 21: 5.651-658.
19. Tang, C.H., Wang, X.S., and 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.
20. Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., and Millán, F. 1999. Peptide characteristics of sunflower protein hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society. 76: 12.1455-1460.
21. 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.
22. Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International. 36: 9-10.949-957.

23.Xie, Z., Huang, J., Xu, X., and Jin, Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food Chemistry. 111: 2.370-376.
24.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.
25.Živanović, I., Vaštag, Z., Popović, S., Popović, L., and Peričin, D. 2011. Hydrolysis of hull-less pumpkin oil cake protein isolate by pepsin. International Journal of Biological Life Science. 7:1. 30-34.

EJFPP, Vol. 9 (1): 1-12
http://ejfpp.gau.ac.ir

Optimization of pumpkin oil cake protein hydrolysis with Alcalase to achieve the maximum antioxidant activity

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

[1]Ph.D. Graduate, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[2]Associate Professors, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

[3] Faculty Member, Isfahan Cardiovascular Research Center, Isfahan, Iran

Received: 2015/03/06; Accepted: 2015/05/25

Abstract

Background and objectives: Antioxidant activity is one of the most important properties of bioactive peptides derived from enzymatic hydrolysis of proteins which makes them suitable to be used as a natural antioxidative agent in foods. In the present research, the possibility of bioactive peptide production with the maximum 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity through the enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita pepo*) oil cake protein by using Alcalase was investigated.

Materials and methods: Optimization of hydrolysis conditions was carried out using the Response Surface Methodology (RSM) with the Central Composite Design plot. For this purpose, enzyme concentration of 1-2%, temperature 45-55 °C and the hydrolysis time of 2-5 h were evaluated as independent variables.

Results: The results showed that the optimum condition to achieve maximum DPPH radical scavenging activity was: hydrolysis temperature 50.1 °C, hydrolysis time 3.53 h and the enzyme concentration of 2% that resulted in antioxidant activity of 89.47%. Such activity was very close to the value suggested by the software (88.08%). R^2 and adjusted R^2 of the suggested model were 0.9585 and 0.9211, respectively. Moreover the lack of fit was calculated as 0.2434 indicating the reliability and fitness of suggested model based on the considered response.

Conclusion: Based on the results, bioactive peptides from enzymatic hydrolysis of pumpkin cake protein had suitable antioxidant activity and can be applied to develop functional foods.

Keywords: Hydrolysis; enzyme; Alcalase; Pumpkin oil cake.

* Corresponding author: elham_2191@yahoo.com