

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از کنجاله‌ی پنبه دانه توسط آنزیم آلکالاز

بهروز اکبری آدرگانی^{۱*}، پریا شعبانی^۲

۱- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
۲- کارشناس ارشد صنایع غذایی، مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

چکیده

پپتیدهای زیست فعال از اتصال اسیدهای آمینه تشکیل شده اند و با پیوندهای کوالانسی به یکدیگر پیوند یافته اند. اگرچه برخی از این پپتیدها در فرآورده های طبیعی به صورت آزاد هستند ولی تعداد زیادی از آنها در ساختار پروتئینی اصلی پنهان شده‌اند و از طریق فرآیندهای آنزیمی آزاد می شوند. هدف از انجام این پژوهش، ارزیابی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از کنجاله‌ی پنبه دانه توسط آنزیم آلکالاز می باشد. هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم آلکالاز در pH ثابت ۸، بازه‌ی زمانی ۲، ۳/۵ و ۵ ساعت، دمای ۴۵، ۵۰ و ۵۵ °C و نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۵، ۱/۵ و ۲ درصد مورد بررسی قرار گرفت. بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی توسط روش سطح پاسخ انجام شد و در شرایط بهینه برخی از ویژگی های پروتئین هیدرولیز شده شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از کنجاله پنبه‌دانه، مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت شلاته کنندگی یون آهن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیا کنندگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج پژوهش نشان می دهد که با درجه هیدرولیز ۳۲٪، شرایط بهینه هیدرولیز برای پروتئین کنجاله‌ی پنبه دانه شامل زمان ۵ ساعت، دمای ۵۵ °C و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷٪ بوده است. در این شرایط، مقدار مهار رادیکال آزاد ۶۲/۶۹٪، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۲/۱ میلی مول آلفا توکوفرول بر میلی لیتر، قدرت احیا کنندگی ۰/۰۷۸ انگستروم و قدرت شلاته‌کنندگی برابر با ۸۰/۲۰٪ می باشد. پپتیدهای زیست فعال حاصل از کنجاله‌ی پنبه دانه دارای خواص فیزیکوشیمیایی و عملکردی سلامت‌بخش هستند. روش سطح پاسخ به صورت یک روش آسان، معتبر و در دسترس در بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیز شده و در جهت دستیابی به ویژگی‌های مطلوب سلامت بخش مفید و مؤثر بود. از این رو استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی پنبه دانه در برخی از فرمولاسیون‌های غذایی و دارویی توصیه می شود.

کلید واژگان: هیدرولیز آنزیمی، پپتیدهای زیست فعال، پنبه دانه، روش سطح پاسخ، ویژگی های عملکردی

*مستول مکاتبات: analystchemist@yahoo.com

۱- مقدمه

به طور مثال: فعالیت ایمونولوژیکی [۶]، فعالیت آنتی اکسیدانی [۷]، فعالیت ضد فشارخون [۸] و فعالیت ضد میکروبی [۹] و دیگر ویژگی‌های سلامت بخش که کاربردهای جدیدی را در تهیه فرمولاسیون‌های غذایی برای گروه‌های خاص جامعه مثل مبتلایان به دیابت داشته‌اند. هیدرولیز آنزیمی یک روش مؤثر جهت تولید پپتیدهای زیست فعال است که هدف اصلی آن تولید محصولاتی با کارایی بالا و ارزش تغذیه‌ای مطلوب می‌باشد [۱۱]. در بین آنزیم‌های رایج به کار رفته در صنعت غذا، آنزیم آلکالاز یک پروتئاز قلیایی با منشأ میکروبی است که توسط باکتری *Bacillus licheniformis* تولید می‌شود، این آنزیم در کوتاه‌ترین زمان و شرایط pH مناسب، درجه هیدرولیز بالاتری را ایجاد کند [۱۰]. پنبه گیاهی است از جنس گوسپیوم، خانواده مالواسه^۲ می‌باشد. یکی از اولین گیاهانی است که توسط انسان کشف شده و بیش از ۴۰۰۰ سال قدمت دارد. به دلیل فیبر بالای آن در صنعت نساجی استفاده می‌شود، این دانه سرشار از روغن است و از کنجاله ی پنبه دانه به دلیل میزان پروتئین بالا، انرژی بالا و کم هزینه بودن جهت خوراک دام استفاده می‌شود [۱۲]. این محصول حاوی ۶۴٪ کنسانتره (شامل کنجاله و روغن) و ۳۶٪ علوفه (شامل پوسته و پرز) می‌باشد. از مهمترین خواص پروتئینی فرآورده‌های پنبه دانه، طعم شیرین، رنگ روشن، زیاد بودن ارزش تغذیه‌ای، شکل پذیری در تولید، ماشین پذیری مناسب، خاصیت آنتی اکسیدانی، قابلیت جذب روغن، خاصیت امولسیفایری، قابلیت جذب آب و بهبود رنگ محصولات تولیدی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

مواد مورد نیاز هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم آلکالاز تهیه شده از شرکت سیگما-آلدریج انجام شده است. هیدروکلریک اسید و هیدروکسید سدیم، بافر فسفات، اتانول و واکنشگر DPPH^۳ از شرکت آلدریج (Luis, USA) و TCL^۴، فری

واکنش‌های اکسیداسیون در مواد غذایی منجر به کاهش کیفیت ویژگی‌هایی از جمله عطر، طعم، رنگ و بافت می‌شوند. اصلی‌ترین هدف واکنش اکسیداسیون که بر کیفیت غذا اثرگذار است چربی‌ها و پروتئین‌های موجود در ماده غذایی می‌باشد. انواع واکنش‌های اکسیداسیون مستلزم وجود رادیکال‌های آزاد در مسیر شکل‌گیری هیدروپراکسیدهای لیپیدها می‌باشد که در نهایت در حضور پراکسیدها به ترکیبات کربونیلی با وزن مولکولی کمتر تقسیم می‌شوند. شناخته شده است که فساد مواد غذایی خام و فراوری شده ناشی از یک سری فرایندهای پیچیده شیمیایی، فیزیکی و میکروبی مانند اکسیداسیون، هیدرولیز و گسترش فلور میکروبی می‌باشد که ارتباط نزدیکی با هم دارند. رخداد و سرعت این فرایندها تحت تأثیر بسیاری از فاکتورها از جمله: رطوبت، pH، ترکیبات و حالت سیستم غذایی، ذخیره و فرآوری مواد خام، فعالیت آنزیمی، حضور آنتی اکسیدان‌ها، ترکیبات ضد میکروبی و مواد نگهدارنده می‌باشد [۱]. انواع نگهدارنده‌های طبیعی و مصنوعی و آنتی اکسیدان جهت طولانی شدن مدت زمان نگهداری مواد خوراکی مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه توجه زیادی به استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی بر پایه پلی فنول‌ها و پپتیدهای مشتق شده از مواد گیاهی بسیار مورد توجه قرار گرفته است [۴-۲]. نقش پروتئین‌ها به عنوان اجزاء فعال فیزیولوژیکی در رژیم غذایی به طور فزاینده تأیید شده است. پروتئین‌ها و اسیدهای آمینه ضروری موجود در رژیم غذایی یک منبع مهم انرژی می‌باشند (KCal/gr) که برای رشد، حفظ توابع فیزیولوژیکی مانند تجدید بافت و انتقال اطلاعات سلولی مورد نیاز بدن می‌باشند. پپتیدهای زیست فعال به عنوان قطعات پروتئینی خاص تعریف می‌شوند که در نهایت بر سلامتی و عملکرد بدن تأثیر مثبت دارند [۵]. پپتیدهای زیست فعال در توالی اصلی پروتئین‌ها غیر فعال هستند و پس از رها سازی به وسیله ی هیدرولیز آنزیمی از خود خواص عملکردی چندگانه نشان می‌دهند. نتایج مطالعات بسیاری از محققان نشان داده که پپتیدهای حاصل منابع پروتئین مختلف از جمله محصولات لبنی، پروتئین‌های حیوانی، گیاهی، دریایی رنج وسیعی از فعالیت بیولوژیکی چندگانه را از خود بروز می‌دهند

1. *Gossypium* spp
2. Malvaceae family
3. 1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl radical, 2,2-Diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl
4. Trichloro acetic acid

TCA v/w ۱۰٪ اضافه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و ۲/۵ mL از فاز فوقانی با ۲/۵ mL آب مقطر و ۰/۵ mL محلول ۰/۱٪ v/w کلرید آهن اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه در دمای اتاق جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر ثبت شد [۱۵].

۲-۲-۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

۰/۱ mL نمونه به علاوه ۱ mL معرف را به مدت ۹۰ دقیقه و در دمای ۹۰ گرمخانه گذاری شد، شدت جذب نور در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. در نمونه ی شاهد به جای نمونه مورد نظر از آب مقطر استفاده شد. جهت ساخت معرف، در یک بالن ژوژه ۱۰۰ mL از ترکیب ۰/۳۸۶ g سدیم دی هیدروژن فسفات و ۰/۴۹۴ g آمونیوم مولیبدات در ۲۰ mL آب مقطر، ۳/۲۶ mL اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و توسط آب مقطر به حجم رسانده شد [۱۵].

۲-۲-۵- فعالیت شلاته کنندگی

۴/۷ mL محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۰/۱ mL از محلول کلرید آهن و ۰/۲ mL فروزین ۵ mM ترکیب شده و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داد شد. شدت جذب نور در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. در نمونه شاهد به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. فعالیت شلاته کنندگی از رابطه ی زیر بدست می آید: [۱۶].

رابطه ۱:

جذب نمونه - جذب شاهد = فعالیت شلاته کنندگی٪

جذب شاهد

۲-۲-۶- بررسی میزان فعالیت مهاررادیکالهای DPPH

۵۰۰ μL نمونه در غلظت های مختلف به علاوه ۵۰۰ μL اتانول ۹۹/۵٪ و ۱۲۵ μL از DPPH ۰/۰۲٪ در اتانول ۹۹/۵٪ ترکیب شدند. محلول حاصل به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق و تاریکی نگهداری شد. در نمونه شاهد بجای نمونه مورد نظر از آب مقطر استفاده شد. شدت جذب نور در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil, United kingdom) مورد بررسی قرار گرفت [۱۵].

جذب نمونه - جذب شاهد = DPPH٪

جذب شاهد

سیانید پتاسیم، آمونیوم مولیبدات، فروزین، سدیم دی هیدروژن فسفات با درجه خلوص بیش از ۹۹/۹٪ از شرکت مرک (Dortmund, Germany) تهیه شده است.

۲-۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- بررسی خصوصیات شیمیایی کنجاله ی پنبه

دانه

کنجاله پنبه دانه با کمترین مقدار چربی از یک دامداری در استان اصفهان شهرستان مبارکه تهیه شد. برای اندازه گیری میزان پروتئین کنجاله از روش کج‌دلال ۱۲-۶۶ AACC استفاده شد [۱۳].

۲-۲-۲- آماده سازی هیدرولیز آنزیمی جهت استخراج

پروتئین کنجاله پنبه دانه

آرد توزین شده را به نسبت (V/W) ۱:۱۵ در آب مقطر مخلوط کرده و به مدت ۲ ساعت توسط دستگاه هیتر استایرر (بدون دما) Ika®RH basic 2 ساخت کشور آلمان هم زده شد، باید توجه داشت این مخلوط در حین هم زدن در pH=۱۰/۵۰ توسط دستگاه متر دیجیتال (GLP, Barcelona, Spain) ثابت بماند (توسط سود ۰/۱ مولار). سپس توسط سانتریفیوژ یخچال دار (Heidolph, Germany) با گرانش ۱۱۰۰۰ g، دمای ۰°C و به مدت ۲۵ دقیقه انجام شد. رسوب حاصل با رقت v/w ۱:۱۵ در آب مقطر تهیه شد و عمل سانتریفیوژ مطابق مرحله قبل انجام شد. تنظیم pH محلول فوقانی حاصل از هر دو مرحله ی سانتریفیوژ توسط ۰/۱M HCl در ۴/۳ انجام شد و جهت استخراج پروتئین مطابق مراحل فوق عمل سانتریفیوژ ادامه یافت. در نهایت با رقیق کردن رسوب حاوی پروتئین توسط آب مقطر و رساندن pH آن به ۸، آنزیم آلکالاز در نسبت آنزیم به سوبسترای ۰/۵، ۱/۲۵ و ۲ درصد اضافه شد. عمل هیدرولیز در بازه های زمانی ۲، ۳/۵ و ۵ ساعت و دمای ۵۰، ۴۵ و ۵۵°C انجام شد. محلول فوقانی حاصله لیوفیلیز شد و تا زمان آزمون در دمای فریزر ۴۰°C- نگهداری شد [۱۴].

۲-۲-۳- آزمون قدرت احیاء کنندگی

۱ mL از محلول نمونه در غلظت های مختلف با ۲/۵ mL بافر فسفات ۰/۱ M (pH = ۶/۶) با ۲/۵ mL محلول فری سیانید پتاسیم ۱٪ ترکیب شد. محلول حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰°C گرمخانه گذاری شد، در ادامه ۲/۵ mL از محلول

۲-۷- تعیین درجه هیدرولیز

حجم برابر از محلول فوقانی و تری کلرو استیک اسید ۲۰٪ تهیه شد، محلول حاصل در دمای ۱۰۰°C، با دور ۶۷۰۰ g و به مدت ۱۰ دقیقه جهت جمع آوری ترکیبات محلول در تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ سانتریفیوژ انجام شد [۱۷] محاسبه‌ی درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه زیر انجام شد:

رابطه ۳:

$$100 \times \text{میزان نیتروژن در } TCA\ 10\% = \text{درجه هیدرولیز (درصد)}$$

نمونه نیتروژن کل

۲-۸- طراحی آزمایش و آنالیز آماری

در این پروژه جهت رسیدن به شرایط بهینه فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از عمل هیدرولیز به وسیله نرم افزار Design Expert نسخه ۱۰ طرح آزمایشی در رابطه با متغیرهای مستقل تعیین شد، با استفاده از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ آزمون آنالیز واریانس ANOVA جهت ارزیابی مناسب بودن مدل سطح پاسخ برازش شده جهت تفسیر کل تغییرات در بازه‌ی مطالعاتی استفاده شد. طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل دما (X₁°C)، نسبت آنزیم به سوپسترا (X₂%)، زمان (X₃h) در سه سطح (-۱، ۰، +۱) یک بلوک و شش تکرار در نقطه مرزی طرح جهت بررسی تکرار پذیری آزمایشات انجام شده مورد استفاده قرار گرفته است. برای آنزیم آلکالاز اثر متغیرهای دما (در سطوح ۴۵، ۵۰ و ۵۵)، زمان (در سطوح ۲، ۳/۵ و ۵ ساعت)، نسبت آنزیم به سوپسترا (در سطوح ۰/۵، ۱/۲۵ و ۲ درصد) بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون آماری دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد صورت گرفت [۳۰]. جهت اندازه گیری تغییر خصوصیات فیزیکوشیمیایی، از یک مدل درجه دوم چند جمله‌ای به صورت زیر استفاده شده است:

معادله ۱:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، $\beta_1, \beta_2, \beta_3$ (β_i) ضرایب خطی، $\beta_{11}, \beta_{22}, \beta_{33}$ اثرات مربعی و $\beta_{12}, \beta_{13}, \beta_{23}$ و (β_{ij}) اثرات متقابل می باشند.

ضرایب رگرسیون چندگانه با استفاده از روش حداقل مربعات جهت پیش بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ تعیین شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب مدل‌های پیشنهادی زیر ارائه گردید:

$$\begin{aligned} & 3/75 + 44/61 = \text{مهار رادیکال آزاد DPPH (رابطه شماره ۱)} \\ & X_1 + 8/74 X_2 + 8/71 X_3 + 0/76 X_1 X_2 - 2/79 X_1 X_3 + \\ & 7/21 X_2 X_3 + 2/95 X_1^2 - 1/45 X_2^2 - 7/97 X_3^2 \\ & 0/068 + 0/012 X_1 + \\ & 2/150 X_2 + 0/014 X_3 - 4/5 X_1 X_2 - 8/750 X_1 X_3 + \\ & 5/250 X_2 X_3 - 7/455 X_1^2 + 1/045 X_2^2 - 0/014 X_3^2 \\ & 69/04 + 10/24 X_1 + \\ & 4/39 X_2 + 8/08 X_3 + 0/19 X_1 X_2 - 4/51 X_1 X_3 - \\ & 2/29 X_2 X_3 + 2/77 X_1^2 + 0/97 X_2^2 - 3/10 X_3^2 \\ & 1/55 + 0/23 X_1 \\ & + 0/12 X_2 + 0/27 X_3 + 0/098 X_1 X_2 + 0/015 X_1 X_3 + \\ & 7/292 X_2 X_3 - 0/11 X_1^2 - 0/026 X_2^2 + 0/13 X_3^2 \end{aligned}$$

۳- نتایج

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی ویژگی‌های عملکردی

نتایج حاصل از آزمون آماری ANOVA برای آنزیم آلکالاز در جدول شماره ۱ نشان داده شده است که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به خوبی بیانگر پاسخ با ضرایب مشخص می‌باشد. در جدول شماره ۲ نتایج هر چهار آزمون فعالیت آنتی اکسیدانی ارائه شده است که این نتایج با استفاده از روش سطح پاسخ آنالیز گردید. باتوجه به نتایج مندرج شده در جدول شماره ۱، تنها اثر خطی زمان ارتباط معناداری با فعالیت مهار کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH دارد، همینطور اثر متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا ارتباط معناداری را با مهار رادیکال‌های آزاد DPPH دارد (p > 0/05). مقادیر 0/83، 0/87، 0/88، 0/82، $R^2 =$ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته 0/80، 0/76، 0/77، 0/70 به ترتیب از کل تغییرات در دامنه مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیا کنندگی، فعالیت

۶۶٪ مربوط به آزمون شماره ۱۲ در مدت زمان ۲ ساعت، دمای ۵۵ °C و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲٪ بوده، بیشترین میزان قدرت احیا کنندگی مربوط به آزمون شماره ۲ در دمای ۵۵ °C، زمان ۳/۵ ساعت، نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۲۵٪ برابر با ۰/۰۸۰ آنگستروم بوده. بالاترین میزان آنتی اکسیدانی کل فعالیت شلاته کنندگی مربوط به آزمون شماره ۱۲ در دمای ۵۵ °C مدت زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲٪ به ترتیب برابر با ۲/۲ میلی مول آلفا-توکوفرول و فعالیت شلاته کنندگی برابر با ۸۳٪ بوده است.

شلاته کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را توضیح دهد. نتایج به دست آمده توسط روش سطح پاسخ جهت دستیابی به شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین در این مطالعه این گونه بوده است: در زمان حدود ۵ ساعت (۲۸۶ دقیقه)، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۷٪، مقدار بهینه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH برابر ۶۲/۶۹٪، قدرت احیا کنندگی برابر با ۰/۰۷۸٪، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برابر با ۲/۱ میلی مول آلفا توکوفرول بر میلی لیتر و شلاته کنندگی برابر با ۸۵/۲۰٪ بوده است. در جدول ۲ بالاترین درصد مهار کنندگی رادیکال DPPH با مقدار

Table 1 Analysis variance for a second order equation model from response surface method

| Source | DPPH radical-scavenging assay | | | | Reducing power | | | | Total antioxidant capacity | | | | Metal-Chelating activity | | | |
|-------------------------------|-------------------------------|----|-------------|---------|----------------|----|-------------|---------|----------------------------|----|-------------|---------|--------------------------|----|-------------|---------|
| | Sum of Squares | df | Mean Square | p-value | Sum of Square | df | Mean Square | p-value | Sum of Squares | df | Mean Square | p-Value | Sum of Squares | df | Mean Square | p-value |
| Model | 1770.76 | 9 | 196.75 | 0.007 | 3.632 | 9 | 4.036 | 0.0016 | 1.55 | 9 | 0.17 | 0.0015 | 1651.68 | 9 | 183.52 | 0.0076 |
| X ₁ | 135.76 | 1 | 135.76 | 0.0812 | 1.468 | 1 | 1.468 | 0.0003 | 0.52 | 1 | 0.52 | 0.0006 | 1014.13 | 1 | 1014.13 | 0.0003 |
| X ₂ | 737.61 | 1 | 737.61 | 0.0011 | 4.467 | 1 | 4.467 | 0.3687 | 0.15 | 1 | 0.15 | 0.0241 | 186.01 | 1 | 186.01 | 0.0426 |
| X ₃ | 396.53 | 1 | 396.53 | 0.0078 | 9.724 | 1 | 9.724 | 0.0014 | 0.39 | 1 | 0.39 | 0.0016 | 341.96 | 1 | 341.96 | 0.0103 |
| X ₁ X ₂ | 4.65 | 1 | 4.65 | 0.7271 | 1.620 | 1 | 1.620 | 0.1033 | 0.077 | 1 | 0.077 | 0.0861 | 0.28 | 1 | 0.28 | 0.9298 |
| X ₁ X ₃ | 45.60 | 1 | 45.60 | 0.2873 | 4.500 | 1 | 4.500 | 0.7712 | 1.250 | 1 | 1.250 | 0.8135 | 119.35 | 1 | 119.35 | 0.0924 |
| X ₂ X ₃ | 230.05 | 1 | 230.05 | 0.0302 | 1.620 | 1 | 1.620 | 0.1033 | 3.125 | 1 | 3.12 | 0.9060 | 30.81 | 1 | 30.81 | 0.3667 |
| X ₁ ² | 23.86 | 1 | 23.86 | 0.4351 | 1.146 | 1 | 1.146 | 0.1626 | 0.035 | 1 | 0.035 | 0.2263 | 21.14 | 1 | 21.14 | 0.4517 |
| X ₂ ² | 5.82 | 1 | 5.82 | 0.6965 | 3.006 | 1 | 3.006 | 0.8120 | 1.859 | 1 | 1.859 | 0.7738 | 2.60 | 1 | 2.60 | 0.7891 |
| X ₃ ² | 94.26 | 1 | 94.26 | 0.1372 | 3.006 | 1 | 3.006 | 0.0347 | 0.027 | 1 | 0.027 | 0.2893 | 14.26 | 1 | 14.26 | 0.5346 |
| Residual | 360.96 | 10 | 36.10 | | 5.041 | 10 | 5.041 | | 0.21 | 10 | 0.021 | | 344.71 | 10 | 34.47 | |
| Lack of Fit | 285.37 | 5 | 57.07 | 0.0856 | 3.227 | 5 | 6.455 | 0.2711 | 0.091 | 5 | 0.018 | 0.6255 | 278.86 | 5 | 55.77 | 0.0696 |
| Pure Error | 75.59 | 5 | 15.12 | | 1.813 | 5 | 3.627 | | 0.12 | 5 | 0.024 | | 65.85 | 5 | 13.17 | |
| Cor Total | 2131.72 | 19 | | | 4.137 | 19 | | | 1.76 | 19 | | | 1996.39 | 19 | | |
| CV.% | | | | 13.81 | | | | 11.52 | | | | 9.29 | | | | 8.29 |
| R ² | | | | 0.83 | | | | 0.87 | | | | 0.88 | | | | 0.82 |
| Adj-R ² | | | | 0.80 | | | | 0.768 | | | | 0.77 | | | | 0.70 |

Table 2 The results of the central composite test and the levels of variables and the response of independent variables for the antioxidant activity of the hydrolyzed protein

| Metal-chelating activity (%) | Total antioxidant capacity (α - tocopherol mmol/ml) | Reducing power assay (A) | DPPH radical-scavenging assay (%) | E/S (X ₃) | Time (X ₂) | Temperature (X ₁) | Run |
|------------------------------|---|--------------------------|-----------------------------------|-----------------------|------------------------|-------------------------------|-----|
| 75.6 | 1.512 | 0.071 | 40 | 1.25 | 3.5 | 50 | 1 |
| 76.1 | 1.845 | 0.080 | 54.6 | 1.25 | 3.5 | 55 | 2 |
| 57.7 | 1.179 | 0.052 | 37.2 | 1.25 | 2 | 50 | 3 |
| 48 | 1.119 | 0.03 | 32.2 | 0.5 | 2 | 45 | 4 |
| 75.1 | 1.319 | 0.065 | 49 | 1.25 | 3.5 | 50 | 5 |
| 78.6 | 1.953 | 0.06 | 40.6 | 2 | 3.5 | 50 | 6 |
| 71 | 1.669 | 0.078 | 50.9 | 1.25 | 3.5 | 50 | 7 |
| 62.3 | 1.02 | 0.03 | 30.4 | 0.5 | 2 | 55 | 8 |
| 78 | 1.881 | 0.075 | 36 | 2 | 5 | 45 | 9 |
| 61 | 1.362 | 0.065 | 30.8 | 1.25 | 3.5 | 45 | 10 |
| 83 | 1.853 | 0.078 | 57 | 1.25 | 5 | 50 | 11 |
| 70.5 | 1.645 | 0.065 | 66.2 | 2 | 2 | 55 | 12 |
| 66.2 | 1.702 | 0.06 | 45 | 1.25 | 3.5 | 50 | 13 |
| 72.8 | 1.552 | 0.04 | 31.2 | 2 | 2 | 45 | 14 |
| 77.4 | 1.231 | 0.061 | 31.2 | 0.5 | 5 | 45 | 15 |
| 66.2 | 1.702 | 0.06 | 45 | 1.25 | 3.5 | 50 | 16 |
| 69.5 | 1.719 | 0.068 | 48.9 | 1.25 | 3.5 | 50 | 17 |
| 52 | 1.503 | 0.062 | 36 | 0.5 | 3.5 | 50 | 18 |
| 83.7 | 1.692 | 0.05 | 47.8 | 0.5 | 5 | 55 | 19 |
| 85.2 | 2.2 | 0.075 | 58.7 | 2 | 5 | 55 | 20 |

کنندگی در مقدار ثابت قرار دارد. ارتباط معنادار اثر خطی هر سه متغیر مستقل با ظرفیت آنتی اکسیدانی کل دیده شده است ($p < 0.05$). در شکل شماره ۷ با گذشت زمان ظرفیت آنتی اکسیدانی تا حدودی افزایش یافته است و سپس به مقدار به ثباتی رسیده است، در شکل شماره ۸ با افزایش دما نیز قدرت احیا کنندگی افزایش یافته است. در شکل شماره ۹ با توجه به افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا هم قدرت احیا کنندگی افزایش پیدا کرده است. در مورد نتایج آزمون شلاته کنندگی اثر خطی هر سه متغیر مستقل (دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا ارتباط معناداری با فعالیت شلاته کنندگی دارند ($p < 0.05$). با توجه به شکل شماره ۱۰، با گذشت زمان، فعالیت شلاته کنندگی افزایش یافته است، شکل شماره ۱۱ نیز با افزایش آنزیم به سوبسترا هم میزان شلاته کنندگی افزایش پیدا کرده است. افزایش دما نیز سبب افزایش قدرت شلاته کنندگی می شود، شکل شماره ۱۲ با افزایش دما نیز فعالیت شلاته کنندگی افزایش می یابد.

در شکل ۱ فعالیت مهار کنندگی رادیکالهای آزاد در مدت زمان اولیه واکنش به طور تقریبی در مقدار ثابت بوده و سپس روند افزایشی پیدا کرده است. فعالیت مهار کنندگی رادیکال های آزاد DPPH در مدت زمان ۵ ساعت بیشترین درصد را برخوردار بوده است و همچنین در شکل ۲ با افزایش دما روند افزایشی داشته است. در شکل ۳، نسبت آنزیم به سوبسترا در میزان ۲ درصد در پایین ترین سطح خود قرار دارد. و در میزان ۱،۵ درصد در ماکزیمم درصد خود قرار دارد. با توجه به نتایج مندرج در جدول ۱، اثر خطی زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیا کنندگی ارتباط معناداری داشته است ($p < 0.05$). در رابطه قدرت احیا کنندگی، آزمون شماره ۲ بیشترین قدرت احیا کنندگی را در مدت ۳/۵ ساعت، نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۲۵ درصد را داشته است. در شکل ۴ قدرت احیا کنندگی رو به افزایش بوده است و در نهایت به مقدار ثابت خود رسیده است. در شکل شماره ۵ با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا قدرت احیا کنندگی نیز افزایش یافته است. در شکل ۶ با افزایش دما قدرت احیا

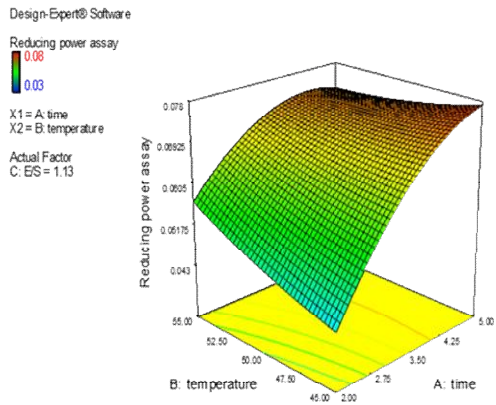


Fig 4 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (temperature of the time) on reducing power

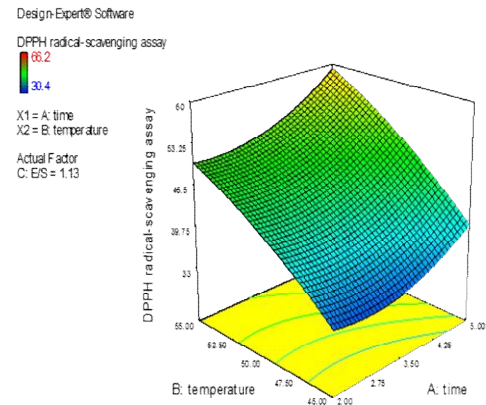


Fig 1 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (temperature and time) on DPPH-free radical inhibitory activity

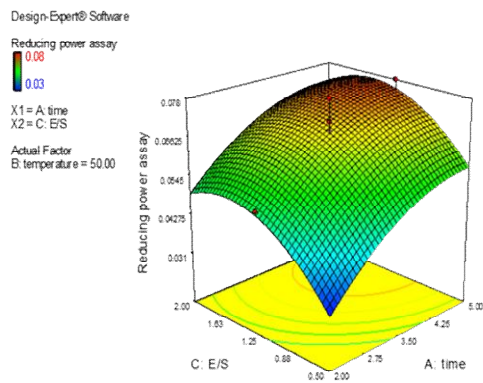


Fig 5 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and time) on reducing power

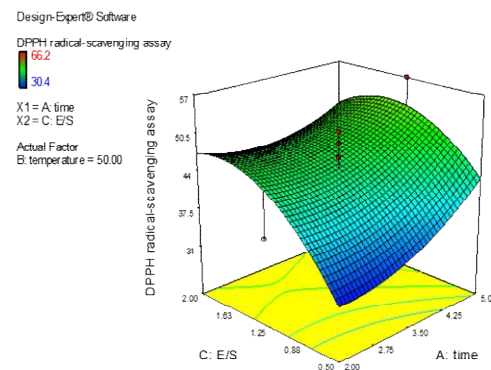


Fig 2 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Time and Enzyme/Substrate) on DPPH-free radical inhibitory activity

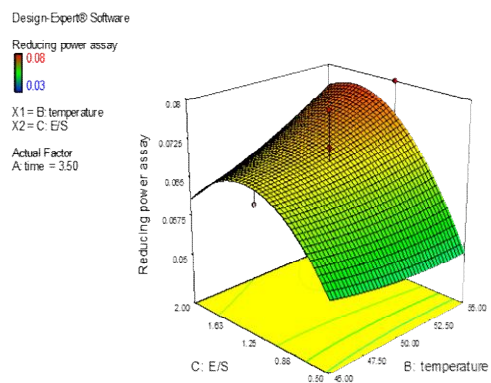


Fig 6 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (temperature and Enzyme/Substrate) on reducing power

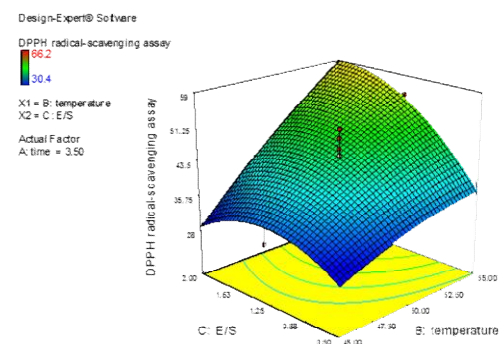


Fig 3 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and temperature) on DPPH-free radical inhibitory activity

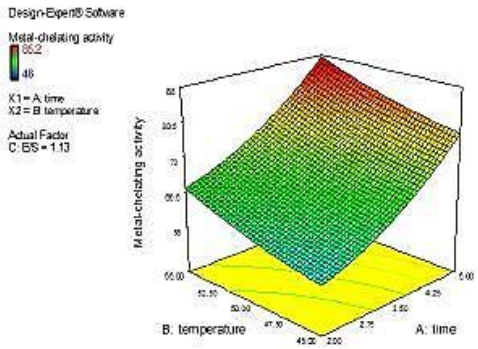


Fig 10 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (temperature and time) on metal chelating activity

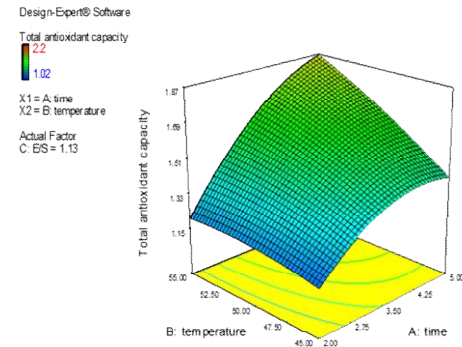


Fig 7 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (temperature and time) on total antioxidant capacity changes

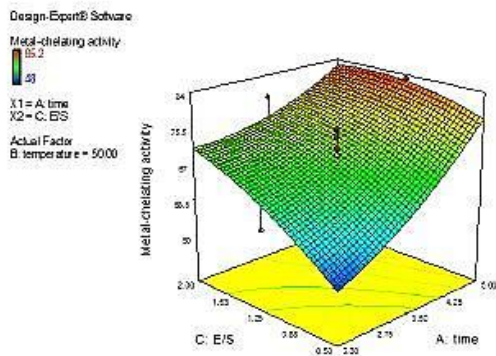


Fig 11 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and time) on chelating activity

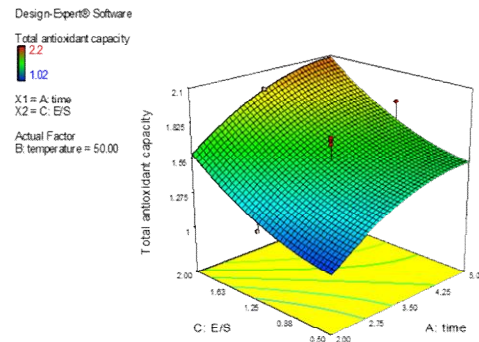


Fig 8 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and time) on total antioxidant capacity changes

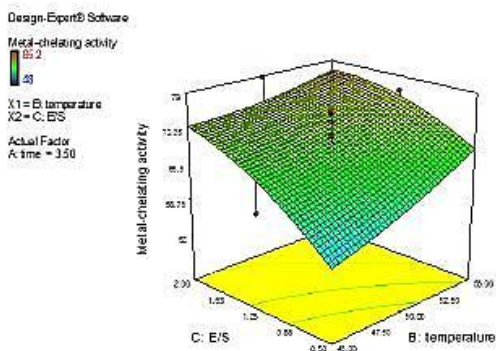


Fig 12 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and temperature)

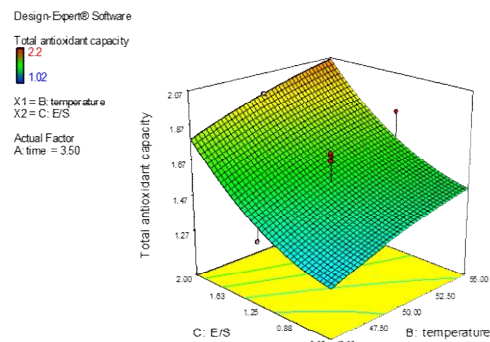


Fig 9 The response surface curve for evaluating the effect of independent variables (Enzyme/Substrate and temperature) on total antioxidant capacity changes

فلزی، پیوند رادیکال های آزاد، توالی اسیدهای آمینه و همین طور وجود اسیدهای آمینه خاص در زنجیره پپتیدی وابسته است [۱۸]. در واقع سینتیک بازیافت پروتئین در طی هیدرولیز آنزیمی به دو مرحله تقسیم می شود، یک واکنش اولیه سریع که در آن زنجیره های پلی پپتیدی با باندهای ضعیف از ذرات پروتئینی نامحلول جدا می شوند و یک واکنش آهسته تر که در آن پروتئین های مرکزی زنجیره شکسته می شوند [۲۰]. توجیه تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی با گذشت زمان به دلیل تغییر طول زنجیره های پپتیدی تولید شده با افزایش هیدرولیز بوده، محققان زیادی این نظر را داشته اند که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان می دهند [۲۱]. به منظور تولید پپتیدهای ضد اکسایش، آنزیم مورد نظر باید قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره پروتئینی باشد. متغیرهای مستقل هیدرولیز (دما، زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا) تاثیر مستقیم بر فعالیت آنزیم نشان داد و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی تولید شده مؤثر بود [۳۱]. در حال حاضر مکانیسم عمل پپتیدهای ضد اکسیداسیون به درستی مشخص نشده است، ولی این اثر به احتمال زیاد به دلیل مهار کردن یون های فلزی، باند کردن رادیکال ها و مهار گونه های فعال اکسیژن بوده است و قدرت ضد اکسایشی پپتیدهای زیست فعال نتیجه اثر مشارکتی این فرایندها می باشد [۲۲]. در واقع تغییرات فعالیت فعالیت آنتی اکسیدانی با گذشت زمان تحت تاثیر تغییر طول زنجیره های پپتیدهای حاصل با افزایش هیدرولیز بوده است. نتایج مطالعات بسیاری از محققان نشان می دهد که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان داده اند [۲۳]. بر اساس نتایج به دست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان واکنش، هیدرولیز آنزیمی با یک فاز سریع آغاز می شود و در این مرحله تعداد بسیار زیادی از پیوندهای پپتیدی شکسته می شود. کاهش در سرعت هیدرولیز واکنش ممکن است به علت کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای مهار آنزیمی، هیدرولیز و غیر فعال سازی آنزیم باشد [۲۴]. روش های تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی بر اساس مهار رادیکال آزاد توسط آنتی اکسیدان مهار می که در قبل اشاره شد به دو گروه تقسیم می شوند: روش انتقال هیدروژن و روش انتقال الکترون در روش انتقال اتم هیدروژن، آنتی اکسیدان و

۲-۳- نتایج درجه هیدرولیز جهت تعیین شرایط

بهینه

همانطور که نتایج مربوط به تغییرات درجه هیدرولیز در گذر زمان در شکل ۱۳ نشان می دهد، که با افزایش مدت زمان واکنش، درجه هیدرولیز افزایش می یابد، در واقع بیشترین درصد درجه هیدرولیز در رابطه با آنزیم آلكالاز در مدت زمان ۵ ساعت بوده و همینطور نسبت آنزیم به سوبسترا در مقدار بهینه برای آنزیم آلكالاز ۱/۷٪ بوده است. این ارزیابی میزان درجه هیدرولیز را برابر با ۳۲٪ می دهد.

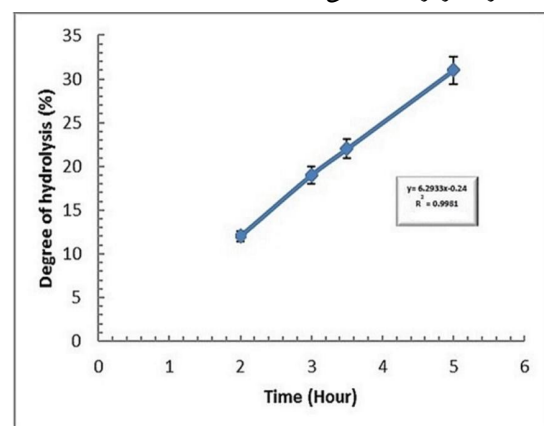


Fig 13 The progress of hydrolysis in the presence of Alcalase

۴- بحث و نتیجه گیری

در سال های اخیر به علت ویژگی آنتی اکسیدان ها در ممانعت از اثرات رادیکال آزاد در ایجاد بیماری ها و فساد مواد غذایی، نقش و اثر آنتی اکسیدان ها مورد توجه محققین و پزشکان قرار گرفته است. اندازه گیری ظرفیت آنتی اکسیدانی یکی از رایج ترین موضوعات مورد بررسی بوده است. به علت تنوع ساز و کار، مواد فعال و سایر خصوصیات واکنش از قبیل حضور مواد دخالت کننده در نمونه، آنتی اکسیدان های مختلف، روش مورد استفاده و عدم شرکت همه آنتی اکسیدان های نمونه در واکنش اکسایشی سبب شده که ارزیابی صحیحی جهت تعیین مقدار آنتی اکسیدان-ها ارائه نشود [۱۸]. قابلیت فعالیت ضد اکسایش پپتیدهای زیست فعال به مقدار انتخابی پروتئاز مورد نظر، ساختار پپتید و در کل ماهیت پپتیدهای آزاد شده و ویژگی های شلاته کنندگی یون های

ضروری است اولین پارامتر مورد بررسی وزن مولکولی پپتیدهای زیست فعال است که به طور معمول کمتر از ۱۰ کیلو دالتون باشد و دومین پارامتر مهم اسیدهای آمینه تشکیل دهنده سوبسترا و پپتیدهای تولید شده می باشد. در این پروژه شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین پنبه دانه با استفاده از آنزیم آلکالاز با روش سطح پاسخ توسط نرم افزار Design Expert ارزیابی شد. بر اساس نتایج به دست آمده توسط روش سطح پاسخ جهت دستیابی به شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین در این مطالعه در زمان حدود ۵ ساعت، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم به سوبسترای ۱/۷٪، مقدار بهینه فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH برابر با ۶۲/۶۹٪، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برابر با ۲/۱ میلی مول آلفا توکوفرول بر میلی لیتر، قدرت احیا کنندگی برابر با ۰/۰۷۸٪ و شلاته کنندگی برابر با ۸۰/۲۰٪ بوده است. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین پنبه دانه با آنزیم آلکالاز می تواند به عنوان یک غنی منبع آنتی اکسیدانی در فرمولاسیون مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

- [1] Nechaev, A.P., 2007. Food Chemistry. *GIORD*, St. Petersburg, 349-464 (Ru).
- [2] Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Akbari-adergani, B., Ghorbani, M., and Toldra, F. 2018. Investigation of calcium-binding ability of bioactive peptide from tomato seed protein. *Journal of Food Science and Technology*, 76 (15): 167-175.
- [3] Shabani, P., and Akbari-adergani, B. 2018. Optimization of the production of protein hydrolysates from cotton seed by response surface methodology. *Journal of Food Technology and Nutrition*. 15 (4): 61-76.
- [4] Kitts, D.D., and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1309-1323.
- [5] Mechkarska, M., Attoub, S., Sulaiman, S., Pantic, J., Lukic, M.L., and Conlon, J.M. 2014. Anti-cancer, immunoregulatory, and antimicrobial activities of the frog skin host-defense peptides pseudhymenochirin-1Pb and

سوبسترا بر سر واکنش با رادیکال هیدروکسیل تولید شده از تجزیه حرارتی ترکیبات آزو با یکدیگر رقابت می کنند. در روش انتقال الکترون، ظرفیت آنتی اکسیدانی بر مبنای کاهش رادیکال آزاد که با تغییر رنگ همراه است اندازه گیری می شود که این رنگ بر اساس غلظت آنتی اکسیدانی موجود در محیط تغییر می کند [۱۶]. آنزیم های میکروبی مانند آلکالاز (پروتئاز تهیه شده از باکتری *Bacillus licheniformis*) به علت تولید پروتئین با درجه بالای آبکافت در کوتاه ترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم های خنثی یا اسیدی به طور گسترده استفاده می شود [۲۵]. اندازه گیری میزان مهار رادیکال های آزاد DPPH یکی از روش های معتبر، آسان، دقیق، مقرون به صرفه با قابلیت تکرارپذیری بالا می باشد که در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های گیاهی در شرایط آزمایشگاهی مورد استفاده قرار می گیرد [۲۶]. DPPH در واقع یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که با احیا توسط فرایندهای گرفتن هیدروژن یا الکترون رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیباتی که قابلیت انجام این عمل را دارند به عنوان یک آنتی اکسیدان مطرح می شوند [۲۷]. توان احیا کنندگی آهن (III) مبنایی است برای قابلیت الکترون دهنده و اکسیداسیون ترکیبات فنولی، سنجش قدرت احیا کنندگی در نمونه ها، ناشی از احیاء آهن III (فریک) به آهن II (فروس) با اهداء الکترون می باشد. این آزمون به طور معمول در رابطه با ردوکتان ها می باشد. ردوکتان ها نقش آنتی اکسیدانی خود را از طریق دادن هیدروژن و مختل کردن واکنش های زنجیره ای، تشکیل رادیکال های آزاد و یا واکنش با برخی از پیش سازهای پراکسید و جلوگیری از تشکیل آن ها ایفا می کنند [۲۸]. یکی از قوی ترین پراکسیدان ها در بین یون های فلزی، یون آهن (Fe^{++}) است که منجر به آغاز و سرعت بخشی به اکسیداسیون چربی با مداخله پراکسید هیدروژن طی واکنش تولید گونه های فعال اکسیژن و رادیکال های آزاد هیدروکسیل می می شود. به جز آهن، فلزات دیگری مانند مس و کبالت توانایی سرعت بخشی به اکسیداسیون لیپید را دارند. شلاته شدن یون های فلزی توسط پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین ها می تواند واکنش اکسیداسیون را به تأخیر اندازد [۲۹]. جهت بررسی خواص آنتی اکسیدانی و مهار رادیکال های آزاد در پروتئین های هیدرولیز شده توسط هیدرولیز آنزیمی دو پارامتر

- gastrointestinal protease. *Food chemistry*, 114: 1198-1205.
- [15] Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., and Nasri, M. 2011. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*sepia officinalis*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases. *Food research international*, 44: 2703-2711.
- [16] Hoyle, N.T., and Merritt, J.H., (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*), *J. Food Sci*, 59:76-79.
- [17] Styer, L., *Biochemistry* 3rd edn. Freeman, W.H., San Francisco. Suetsuna, K., Maekawa, K., and Chen, J. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (15).
- [18] Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff in model and food systems. *Food Chemistry*, (105): 57-64.
- [19] Guerard, F., Guimas L., and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 489-498.
- [20] Silva, V.S., and Malcata, F.X. 2004. Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Science*, 15(1): 1-15.
- [21] Erdmann, K.W.Y., Cheung, B., and Schröder, H. 2008. The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutritional Biochemistry*, (19)643-654.
- [22] Rajapakse, N., Yung, W.K., Mendis, E., Moon, S.H., and Kim, S.K. 2005. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sciences*, (76): 2607-2619.
- [23] Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., and Millan, F. 1999. Production and characterization of an extensive rapeseed protein hydrolysate. *Journal of the American Oil Chemist's Society*, 76(7): 819-823.
- [24] Novozymes, *Alcalase 2.4L® application sheet*. 2001. Novozymes A/S, Denmark.
- pseudhymenochirin-2Pa. *Regul. Pept.* 194-195:69-76.
- [6] Babini, E., Tagliazucchi, D., Martini, S., Dei Pi_u,L., and Gianotti, A. 2017. LC-ESI-QTOF-MS identification of novel antioxidant peptides obtained by enzymatic and microbial hydrolysis of vegetable proteins. *Food Chem.* 228:186-196.
- [7] Capriotti, A.L., Caruso, G., Cavaliere, C., Samperi, R., Ventura, S., Chiozzi, R.Z., and Lagana, A. 2015. Identification of potential bioactive peptides generated by simulated gastrointestinal digestion of soybean seeds and soy milk proteins. *J. Food Comp. Anal.* 44:205-213.
- [8] Tang, W., Zhang, H., Wang, L., Qian, H., and Qi, X. 2015. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. *Food Chem*, 168:115-123.
- [9] Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43-81.
- [10] Ovissipour, M.R., Abedia, A.M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
- [11] Soto-Blanco, B., Spinosa, H.S., G'orniak, S.L., and Neto, J. P. 2008. "Gossipol e fatores antinutricionais da soja," in *Toxicologia Aplicada à Medicina Veterinária*. Manole, Barueri, Brazil, 531-545.
- [12] AACC, 1999. Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Association of Cereal Chemists. Ins.
- [13] Gao, D., Chang, T., Li, H., and Cao, Y. 2010. Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. *African Journal of biotechnology*, 9: 8977-8983.
- [14] 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

- [29] Karami, Z., Peighambaroust, S.H., Hesari, J., and Akbari-Adergani, B. 2018. Isolation and identification of antioxidant peptide from wheat germ protein by pepsin enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, In-press.
- [30] Karami, Z., Peighambaroust, S.H., Hesari J., and Akbari-Adergani, B. 2018 Response surface methodology to optimize hydrolysis parameters in production of the antioxidant peptides from wheat germ protein by Alcalase digestion. Identification of antioxidant peptides by LC-MS/MS. In press. *Journal of agricultural science and technology*, In-press.
- [31] Barraza, M.L., Coppock, C.E., Brooks, K.N., Wilks, D.L., Saunders, R.G., and Latimer, G.W. 1991. Iron sulfate and feed pelleting to detoxify free gossypol in cottonseed diets for dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 74: 3457-3467.
- [25] Herpandi, N., Huda, A., Rosma, W.A., and Wan Nadiah. 2013. Optimizing the Enzymatic Hydrolysis of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Flesh Using Alcalase® Enzyme: A Response Surface Approach. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 8: 494-505.
- [26] Liadakis, G.N., Floridis, A., and Tzia, C. 1993. Protein isolates with reduced gossypol content from screw-pressed cottonseed meal. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41(6): 918-922.
- [27] Chakrabarti, S., Jahandideh, F., and Wu, J. 2014. Food-derived bioactive peptides on inflammation and oxidative stress. *BioMed Research International*, 1-11.
- [28] Bamdad, F., Wu, J., and Chen, L. 2011 Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. *Journal of Cereal Science*, (54). 20-28.

Evaluation of physicochemical and functional properties of cottonseed protein hydrolyzed protein by Alcalase enzyme

Akbari-adergani, B. ^{1*}, Shabani, P. ²

1. Associate Professor of Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran
2. Master of Science in Food Science and Technology, Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

Bioactive peptides are organic substances composed of amino acids, which are linked by covalent bonds, are known as peptide bonds or amide bonds. Although some of these peptides are free in natural products, but many of them are encrypted in the primary protein structures that are released through enzymatic processes. The aim of this study was to evaluate the physicochemical and functional properties of hydrolyzed protein derived from cottonseed meal by alcalase enzyme. The enzyme hydrolysis was investigated with alcalase enzyme at constant pH equal to 8, different time interval (2, 3.5 and 5 hours), temperature (45, 50 and 55 °C) and enzyme/ substrate ratio (0.5, 1.5 and 2 %). Optimization of enzyme hydrolysis was performed by surface response method. In optimal conditions, some of the hydrolyzed protein features including antioxidant activity of hydrolyzed proteins derived from cottonseed meal, including free radical DPPH inhibiting, iron ion fermentation strength, capacity total antioxidants and regenerative effects were investigated. The results of this study show that with a degree of hydrolysis 32%. The optimal hydrolysis conditions for cottonseed meal protein were 5 hours, 55 °C and the ratio of enzyme to the substrate 1.7%. In these conditions, the optimum amount of free radical inhibitory activity DPPH was 62.69%, total antioxidant capacity was 2.1 mmol α -tocopherol/mL, regenerative capacity equaled 0.078%, and chelating capacity was 80.20%. The bioactive peptides derived from cottonseed meal have physicochemical and functional properties. The response surface method was also used as an easy, reliable and available method to optimize protein hydrolysis and was effective in achieving desirable health features. Therefore, the use of cottonseed hydrolyzed proteins is recommended in some of food and medicinal formulations.

Keywords: Enzyme hydrolysis, Bioactive peptides, Cottonseed, Response surface method, Functional properties.

* Corresponding Author E-mail address: analystchemist@yahoo.com (Behrouz Akbari-adergani)