

تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز

سیده نرگس مظلومی^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۳، غلامرضا هوشمند^۴

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی- شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی دانشگاه گرگان

۲- دانشیار علوم و صنایع غذایی- شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی دانشگاه گرگان

۳- دانشیار علوم و صنایع غذایی- شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی دانشگاه گرگان

۴- استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۱/۳۱)

چکیده:

استفاده از آنزیم جهت هیدرولیز منابع پروتئینی از روش‌های معمول در فرآوری غذایی به حساب می‌آید. یک ترکیب پروتئین بهیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدها و اسیدهای آمینه‌ای می‌باشد که از انجام عمل هیدرولیز توسط آنزیم از منابع مختلف، اسید یا قلیا حاصل شده است. هسته پرتقال به میزان زیادی از ضایعات صنایع تولید آبمیوه قابل دست‌یابی است و آرد چربی‌گیری شده آن، حدود ۲۶ درصد پروتئین دارد و می‌تواند به عنوان منبع غنی و مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی با منشاء گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. در این پژوهش ابتدا استخراج ایزوله پروتئین با خلوص بالا صورت گرفت، سپس با استفاده از اثر آنزیم هیدرولیز کننده آلکالاز در نسبت‌های مختلف آنزیم (۱ تا ۳٪ حجمی-وزنی آنزیم به سوبسترا) و بازه زمانی (۲ تا ۵ ساعت) در دمای ۴۵-۵۵ درجه سانتیگراد و pH مناسب برای فعالیت آنزیم، پروتئین آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال هیدرولیز شد و شرایط بهینه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای بالاترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهارکنندگی رادیکال OH، قدرت احیاکنندگی Fe^{3+} و ویژگی آنتی‌اکسیدانی کل) انتخاب شد. تیمار بهینه در شرایط دمایی (۵۴/۸ درجه سانتی‌گراد)، زمان (۳/۳۵ ساعت) و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (۱/۷ درصد حجمی-وزنی) با مقادیر ۴۵/۸۵ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۹۱/۸۲ درصد قدرت مهار رادیکال‌های OH، ۸۹/۳۵ درصد قدرت احیاکنندگی Fe^{3+} و ۳۹/۶۸ درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، بر مبنای روش بهینه سازی سطح پاسخ تعیین شد. آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی به منظور تایید مقادیر پیشنهاد شده توسط نرم افزار، بر تیمار بهینه صورت گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هسته پرتقال می‌تواند در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان افزودنی طبیعی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و نیز استفاده به عنوان دارو قابلیت کاربرد داشته باشد.

کلید واژگان: پروتئین، هیدرولیز، پپتید، آنتی‌اکسیدان، هسته پرتقال، دارو.

*مسئول مکاتبات: sadeghiaz@yahoo.com

۱- مقدمه

پروتئین‌ها برای سلامتی بسیار مهم و حیاتی می‌باشند؛ زیرا این ترکیبات نیتروژن، اسیدهای آمینه و انرژی مورد نیاز بدن را تامین می‌کنند. اما کاربردهای پروتئین‌ها به دلیل برخی ویژگی‌های خاص مثل حلالیت کم آن‌ها، بسیار محدود شده است. هیدرولیز پروتئین‌ها با رویکرد بهبود ویژگی‌های شیمیایی، عملکردی و تغذیه‌ای آن‌ها بطور گسترده در تحقیقات مورد توجه محافل علمی قرار گرفته است [۱ و ۲]. در طی فرآیند هیدرولیز، پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچک‌تر و اسیدهای آمینه آزاد شکسته می‌شوند. از آنجایی که هیدرولیز آنزیمی در شرایط نسبتاً ملایمی انجام می‌شوند و هیچ اسید آمینه‌ای در طول فرآیند تخریب نمی‌شود، این نوع هیدرولیز به هیدرولیز اسیدی و قلیایی بیشتر ترجیح داده می‌شود [۳]. نتایج حاصل از آزمایشات و تحقیقات نشان داده است که پپتیدهای زیست فعال در بسیاری از موارد به عنوان جایگزین طبیعی بسیاری از داروهای شیمیایی گران قیمت جهت ارتقای سلامتی انسان و پیشگیری از بیماری‌های مزمن به کار گرفته می‌شوند [۴ و ۵]. پپتیدهای زیست فعال تولید شده از پروتئین‌های گیاهی طی هیدرولیز آنزیمی دارای ویژگی‌های سلامتی بخش بالا نظیر خاصیت آنتی‌اکسیدانی (پپتیدهای مشتق شده از هیدرولیز پروتئین سویا، گندم سیاه، دانه کتان، آفتابگردان، بادام زمینی، کدو) می‌باشند [۶ و ۷] سردی و اسماعیل (۲۰۱۰) گزارش کردند که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز شده‌ها نسبت به پپتیدهای خالص، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری اعمال می‌کنند [۸]. تاکاناکا و همکاران (۲۰۰۳) در بررسی تاثیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین سویا و پپتیدهای حاصل از آن به این نتایج دست یافتند که مصرف یک رژیم غذایی حاوی ۲۰٪ پروتئین سویا و هیدرولیز آن یک اثر بازدارنده‌ی معنی‌دار بر مواد واکنش دهنده با تیوباربتوریک اسید (TBARS) در موش‌های صحرایی دارد و از طرفی گزارش شده است که پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین سویا، سطح کلسترول خون را بیشتر از پروتئین دست نخورده سویا کاهش می‌دهند [۹]. طی مطالعات و پژوهش‌های انجام شده توسط لهارت و همکاران در سال ۲۰۱۱، علت اصلی جلوگیری از فرآیند اکسیداسیون در حضور پپتیدهای زیست فعال، نقش این ترکیبات زیست فعالدر چلاته کردن فلزها

1.Thiobarbituric acid

و نیز وجود گروه‌هایی در زنجیره جانبی اسیدهای آمینه یا هیدرولیز شده‌های تولید شده گزارش شد و نیز این ترکیبات به طور ترجیحی به رادیکال‌های آزاد اسیدهای چرب متصل شده و از این طریق از فرآیند اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند [۱۰]. تاثیر فرآیند هیدرولیز توسط آلکالاز و فلیورزایم بر قدرت ضداکسایش پروتئین کائولا توسط کومبی و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد، پپتیدهای تولیدی دارای قدرت ضد اکسایش به ویژه با خاصیت مهار رادیکال‌های آزاد و فعالیت باند کنندگی فلزات بودند. هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط فلیورزایم دارای قوی‌ترین قدرت ضداکسایش بودند، در حالی که پپتیدهای تولیدی از فعالیت توام فلیورزایم و آلکالاز تفاوتی از نظر قدرت ضداکسایش با پپتیدهای حاصل از فعالیت آلکالاز به تنهایی نداشتند. ویریا فان و همکاران (۲۰۱۲) و خانتافانت و همکاران (۲۰۰۸) نیز گزارش کرده‌اند که پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، تریپسین و آلکالاز دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند [۱۱ و ۱۲]. بوگاتف و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های پروتئین‌های فرآورده‌های جانبی ساردین از آنزیم‌های پروتئازای استفاده کردند. آن‌ها نشان دادند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز شده‌ی پروتئین ضایعات ماهی ساردین با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و نیز پیشنهاد کردند که پپتیدهای کوتاه زنجیر، آنتی‌اکسیدان‌های بهتری در مقایسه با پپتیدهای بلند زنجیر هستند [۱۳]. گنورار و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که با افزایش غلظت آنزیم، میزان تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان افزایش می‌یابد. همچنین آن‌ها بیان داشتند با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و از شدت و سرعت هیدرولیز، به دلیل کاهش باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم، کاهش فعالیت آنزیم و شکل‌گیری ممانعت کننده‌ها کاسته می‌شود [۱۴]. جی و همکاران (۲۰۰۹) که ضایعات ماهی تن را با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز کردند، اعلام داشتند که میزان فعالیت آنزیم آلکالاز، با افزایش مقدار آنزیم افزایش می‌یابد. آن‌ها اعلام کردند که پپتیدهای با وزن مولکولی بین ۱ تا ۳ کیلوالتون بیشترین قدرت مهار رادیکال را دارند. آن‌ها بیشترین میزان قدرت مهار رادیکال DPPH را حدود ۱۰۰ درصد گزارش کردند و نیز اعلام کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده تا حدود

ابتدا کنجاله پس از تهیه تمیز شده و مواد خارجی آن حذف شد، سپس توسط دستگاه آسیاب (Perten, 3100) ساخت کشور آلمان، به آرد تبدیل و از الک با مش ۳۰ عبور داده شد. آرد کامل حاصل به مدت ۴ ساعت (در دو نوبت) با حلال n-هگزان با خلوص بیش از ۹۵٪ با نسبت ۱ به ۱۰ چربی‌گیری و در دمای اتاق به مدت ۴۸ ساعت تا رطوبت (۷/۱۳ درصد) خشک شد و مجدداً از الک با مش ۷۰ عبور داده شد و در نهایت آرد چربی‌گیری شده تا مرحله استخراج پروتئین در دمای فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۱۹ و ۲۰]. اندازه‌گیری ترکیبات تشکیل‌دهنده هسته پرتقال و کنجاله چربی‌گیری شده با استفاده از روش AOAC (روش ۹۸۳/۲۳، سال ۱۹۹۰) انجام گرفته شد [۲۱].

۲-۲- تعیین الگوی حلالیت پروتئین کنجاله هسته

پرتقال به روش برادفورد

حلالیت پروتئین کنجاله هسته پرتقال مطابق روش کینسلابا اندکی تغییرات بررسی شد [۲۲]. به منظور تعیین الگوی حلالیت، سوسپانسیون‌هایی از کنجاله چربی‌گیری شده در آب مقطر با نسبت (۲۰:۱ حجمی/حجمی) تهیه شد. سوسپانسیون حاصل به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط، سپس pH سوسپانسیون توسط سود و اسید کلریدریک یک نرمال در ۱۲ سطح (۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹، ۱۰، ۱۱، ۱۲) توسط pH متر (مدل UB-۱۰ ساخت کشور ایران) تنظیم و به مدت ۶۰ دقیقه در pH ثابت مخلوط شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۲۰۰ rpm توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (Hanil, combi 514R) سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت حاصل جدا شد. سوپرناتانت حاصل از کاغذ صافی (واتمن شماره ۴۱) عبور داده شد و سپس میزان حلالیت پروتئین، به روش برادفورد [۲۳] در طول موج ۵۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت به ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد اضافه شد و جذب آن در طول موج برادفورد ۵۹۵ نانومتر خوانده شد. همچنین ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر نیز به طور جداگانه به ۵ میلی‌لیتر معرف برادفورد افزوده و برای صفر کردن استفاده گردید. برای تهیه منحنی استاندارد از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی BSA شرکت مرک استفاده شد. برای این کار ابتدا محلول غلیظ (یک میکروگرم در میلی‌لیتر) از BSA ساخته، سپس از این محلول غلظت‌های ۱۰

زیادی تحت تاثیر ترکیب آمینواسیدهای تشکیل‌دهنده آن‌ها قرار دارد [۱۵].

میوه پرتقال، از گونه مرکبات (*Citrus*) و خانواده (*Rutaceae*) می‌باشد که در کشورهای مدیترانه‌ای به میزان قابل توجهی تولید می‌گردد [۱۶]. نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که هسته مرکبات منابع غنی و با ارزشی از پروتئین و روغن‌های گیاهی و خوراکی می‌باشد و این میزان پروتئین در مقادیر ۲۶/۵-۱۷/۹٪ بر اساس وزن خشک متغیر می‌باشد [۱۷]. همچنین بر اساس نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که هسته پرتقال دارای مقادیر مناسبی از مواد معدنی، از جمله کلسیم و روی نیز می‌باشد؛ در نتیجه از آرد چربی‌گیری شده حاصل از هسته پرتقال می‌توان به‌عنوان مواد افزودنی موثر در غذاها استفاده کرد؛ همچنین مقادیر اسیدهای آمینه آبریز در این هسته زیاد است، از این رو انتظار می‌رود این گیاه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده منبع مناسبی باشد [۱۸].

تاکنون براساس اطلاعات موجود، تحقیقی در زمینه هیدرولیز پروتئین از آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال توسط آنزیم‌های پروتئاز صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی شده است پروتئین آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با کیفیت مناسب و خاصیت سلامتی بخش بالا (ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا) توسط آنزیم آلکالاز، مورد هیدرولیز قرار گیرد و ویژگی آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز در محیط برون تنی، مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

مواد اولیه تهیه شده این پژوهش (هسته پرتقال (*Siavaraze*) (*Citrus sinensis*) از ضایعات حاصل از شرکت تعاونی کشاورزی باغداران مرکبات رامسر- کارخانجات کشت و صنعت کوثر تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی به کار برده شده این پژوهش از شرکت مرک تهیه شدند و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۱- تهیه آرد بدون چربی از کنجاله هسته

پرتقال

توسط خشک کن انجمادی (مدل FD₄، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی) خشک شدند.

۲-۴- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

هیدرولیز پروتئین حاصل از آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز در دما و pH اپتیمم این آنزیم انجام شد. آنزیم با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی به وزنی (آنزیم به سوبسترا) به محلول پروتئینی افزوده شده و هیدرولیز در مدت زمان‌های ۲ تا ۵ ساعت و دمای ۴۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد و در pH=۸ در انکوباتورهای شیکردار انجام گرفت [۲۵]. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد. در مرحله بعد برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفیوژ کردن در ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و سوپرناتانت حاصل پس از جمع‌آوری جهت انجام آزمون‌های بهینه‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد [۲۷-۲۵].

۲-۵- بهینه‌سازی فرآیند جهت دستیابی به

تیمار با بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی

سطوح مختلف متغیرهای مستقل (دمای هیدرولیز، زمان هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا) در جدول ۱ نشان داده شده است.

Table 1 Levels of independent variables used to optimize the antioxidant activity of the orange seed protein hydrolyzate

Independent variables	Levels		
Enzyme to substrateratio (%)	1	2	3
Temperature (°C)	45	50	55
Time(h)	2	3.5	5

جهت هیدرولیز آنزیمی با آنزیم آلکالاز به صورت جدول در زیر ارائه شده است.

تا ۵۰ میکروگرم در میلی‌لیتر تهیه شد. ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های استاندارد با ۵ میلی‌لیتر از محلول برادفورد (با معادله خط $y=0.001x-0.0068$) ترکیب و کاملاً مخلوط شد و جذب آن‌ها در طول موج ثبت شد. جهت تهیه نمونه شاهد نیز، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر با ۵ میلی‌لیتر از محلول برادفورد ترکیب شد.

۲-۳- تولید ایزوله پروتئین هسته پرتقال

تهیه ایزوله پروتئین هسته پرتقال مطابق روش هرکس و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت [۲۴]. آرد کنجاله به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط شد و در دمای محیط با سدیم هیدروکسید یک نرمال به ماکزیمم pH حلالیت (pH=۱۰) رسانده شد. نمونه حاصل به مدت یک ساعت در دمای محیط مخلوط و در ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس سوپرناتانت حاصل جداسازی شده و با اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نقطه ایزوالکتریک (pH=۳) رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوبات حاصل با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و

مدل‌های رگرسیون (۲-۱ تا ۲-۴) به منظور پیش‌بینی پاسخ‌های مد نظر (قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت مهار رادیکال OH، قدرت احیا کنندگی Fe³⁺ و ظرفیت ضد اکسایش کل

Table 2 Regression coefficients of estimated model, by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in DPPH radical scavenging activity

Variable model	Coefficient	R-Square	Adj R-Square
Intercept	27.62	0.6248	0.8974
X ₁ -time	- 0.72		
X ₂ -tem	5.74		
X ₃ -e/s	3.89		
X ₁ X ₂	- 1.90		
X ₁ X ₃	7.97		
X ₂ X ₃	0.16		
X ₁ ²	0.61		
X ₂ ²	11.29		
X ₃ ²	0.18		

Table 3 Regression coefficients of estimated model, by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in OH radical scavenging activity

Variable model	Coefficient	R-Square	Adj R-Square
Intercept	82.27	0.7777	0.7361
X ₁ -time	0.8		
X ₂ -tem	7.37		
X ₃ -e/s	4.09		
X ₁ X ₂	0		
X ₁ X ₃	0		
X ₂ X ₃	0		
X ₁ ²	0		
X ₂ ²	0		
X ₃ ²	0		

Table 4 Regression coefficients of estimated model, by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in Ferric Reducing activity

Variable model	Coefficient	R-Square	Adj R-Square
Intercept	0.88	0.9023	0.8143
X ₁ -time	0.013		
X ₂ -tem	0.016		
X ₃ -e/s	-4.5		
X ₁ X ₂	-0.083		
X ₁ X ₃	-0.098		
X ₂ X ₃	-0.065		
X ₁ ²	1.90		
X ₂ ²	-0.014		
X ₃ ²	-0.056		

Table 5 Regression coefficients of estimated model, by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in total antioxidant activity

Variable model	Coefficient	R-Square	Adj R-Square
Intercept	0.38	0.6923	0.7258
X ₁ -time	-3.10		
X ₂ -tem	-0.046		
X ₃ -e/s	0.017		
X ₁ X ₂	1.5		
X ₁ X ₃	0.016		
X ₂ X ₃	0.066		
X ₁ ²	0		
X ₂ ²	0		
X ₃ ²	0		

در مقادیر واقعی)، b_0 مقدار ثابت، b_1 ، b_2 ، b_3 اثرات خطی، b_{11} ، b_{22} ، b_{33} اثرات درجه دوم، b_{12} ، b_{23} و b_{13} اثرات متقابل می‌باشند.

باسخ یا متغیر وابسته (فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهار رادیکال OH، قدرت مهار رادیکال Fe^{3+} و ظرفیت ضد اکسایش کل پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز

۲-۶- آزمون‌های بهینه‌سازی جهت دستیابی به پروتئین‌های هیدرولیز شده با بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲-۶-۱- اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

این آزمون بر اساس روش وانگ و همکاران (۲۰۱۳)، انجام شد. بر این اساس، ۲ میلی‌لیتر آب دیونیزه محتوی غلظت‌های مختلفی از نمونه به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۲ میلی مولار) و ۱ میلی‌لیتر اتانول، پس از طی شدن مدت زمان لازم (یک ساعت) در محیط تاریک، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد [۲۸]. درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH از رابطه‌ی زیر محاسبه شد:

لازم به ذکر است که نمونه محتوی آب مقطر و محلول DPPH. به عنوان نمونه کنترل منفی در نظر گرفته شده است.

$100 \times \text{جذب کنترل منفی} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل منفی}) =$
درصد بازدارندگی

۲-۶-۲- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی یون Fe^{3+}

در این آزمون ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد با هم مخلوط شدند و پس از هم زدن به مدت یک دقیقه، مخلوط حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه در انکوباتور (مدل MEMERT ساخت کشور آلمان) انکوبه شد. پس از سپری شدن زمان انکوباتور، به مخلوط فوق، ۲۵۰ میکرولیتر از تری کلریدریک اسید ۱۰ درصد حجمی - وزنی اضافه گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۵۰ در دمای محیط سانتریفیوژ گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت حاصل از مرحله فوق، با ۵۰ میکرولیتر از محلول کلرید آهن (III) ۰/۱ درصد وزنی - حجمی و ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید [۲۹].

۲-۶-۳- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال OH

جهت انجام این آزمون، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فانترویلین ۱/۸۶۵ میلی مولاری و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با هم مخلوط شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سولفات

آهن ۷ به ۱/۸۶۵ میلی مولاری به مخلوط فوق اضافه گردید و پس از مخلوط شدن، ۱۰۰ میکرولیتر از آب اکسیژنه سه درصد حجمی - حجمی نیز به محتویات فوق اضافه شد و سپس بعد از انکوبه شدن محتویات در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۸ نانومتر قرائت گردید و درصد قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل از رابطه زیر محاسبه شد [۳۰].

$100\% \times \frac{(As - An)}{(Ab - An)}$ = قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل

As = جذب نمونه

An = جذب نمونه کنترل منفی که شامل تمام ترکیبات بالا (به جز پروتئین هیدرولیز شده) می‌باشد.

Ab = جذب نمونه بلانک که شامل تمام ترکیبات بالا (به جز نمونه پروتئین هیدرولیز شده و آب اکسیژنه) می‌باشد.

۲-۶-۴- اندازه‌گیری ظرفیت ضد اکسایش کل (Total Antioxidant Capacity)

جهت انجام این آزمون، از روش پرتو و همکاران (۱۹۹۹) با کمی تغییرات انجام شد. برای این روش، ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف مولیبدات (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و مولیبدات آمونیوم ۴ میلی مولار) مخلوط شده و به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید [۳۱].

۳- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر ویژگی ضد اکسایش، از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم به سوستر (X₁)، دما (X₂) و زمان هیدرولیز (X₃) در سه سطح (+۱، ۰، -۱) استفاده گردید. پاسخ‌های مورد بررسی ویژگی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت مهارکنندگی یون Fe^{3+} ، اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال OH و اندازه‌گیری ظرفیت ضد اکسایش کل بود. به این منظور ۲۰ تیمار تصادفی، با در نظر گرفتن ۶ تکرار در

چربی‌گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی کنسانتره پروتئین (میزان ۴۳/۳۸٪ در کنجاله چربی‌گیری نشده به ۵/۴۶٪ در کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال) شد. محتوای پروتئین آرد کنجاله اولیه ۲۲/۴۷٪ بود، در حالی که کنسانتره پروتئین به دست آمده دارای ۷۵/۱۲٪ پروتئین بود. این مقدار بیشتر از مقادیر گزارش شده در سایر پژوهش‌ها برای هسته پرتقال می‌باشد [۱۸]. علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه به کار گرفته شده این پژوهش با پژوهش‌های قبل را، می‌توان به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرایند نسبت داد.

نقطه مرکزی توسط نرم افزار Design Expert (نسخه ۶،۰،۲ سال ۲۰۰۰) پیشنهاد شد.

۴- نتایج و بحث

۴-۱- ترکیب شیمیایی

محتوای رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و کربوهیدرات آرد کنجاله اولیه روغن‌گیری نشده و کنسانتره پروتئین هسته پرتقال در جدول ۶ آورده شده است. نتایج نشان داد که عمل

Table 6 The chemical composition of defatted meal and the orange seed protein concentrate

Oil(%)	Protein(%)	Moisture(%)	Ash(%)	Carbohydrate(%)	Sample
43.38±0.58	22.47±3.51	7.13±0.52	2.66±0.17	24.36	Non defatted meal
0.15±5.46	75.12±1.41	8.79±0.17	1.6±0.23	9.03±0.48	orange seed protein concentrate

*The values are based on dry weight
STDEV±*Mean

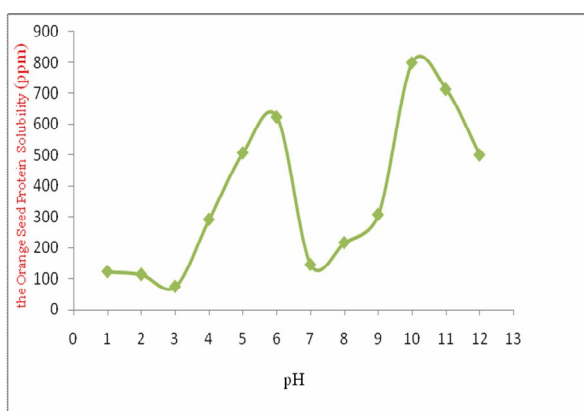


Fig 1 The Solubility profile of orange seed protein concentrate in different pH

در بالای نقطه ایزوالکتریک، بار خالص منفی بوده و به علت افزایش دافعه الکترواستاتیک بین پروتئین‌ها، حلالیت نیز افزایش می‌یابد [۳۳-۳۵]. به طور کلی از محدوده pH ایزوالکتریک، به سمت pHهای بالاتر، میزان حلالیت افزایش می‌یابد. این رفتار، مشابه بسیاری از پژوهش‌های انجام شده در رابطه با حلالیت پروتئین گیاهان مختلف می‌باشد [۳۴].

۴-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز

شده هسته پرتقال

ارزیابی فعالیت ضد اکسیدانی تمام تیمارهای پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز، در جدول ۷ نشان داده شده است. نتایج نشان داده است که اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضد اکسیدانی تیمارهای مختلف در سطح ۵ درصد وجود داشت.

۴-۲- حلالیت پروتئین کنجاله هسته پرتقال

زیاس و همکاران (۲۰۰۶) محدوده pH=۴-۵ را برای اکثر پروتئین‌های گیاهی محدوده ایزوالکتریک دانستند [۳۲]. بر اساس نتایج منحنی حلالیت پروتئین هسته پرتقال (شکل ۱)، بیشترین میزان حلالیت در pH=۱۰ و کمترین میزان آن در pH=۳ (نقطه ایزوالکتریک) مشاهده شد. حلالیت در مقادیر pHهای اسیدی (pHهای ۳، ۲، ۱) تا نقطه ایزوالکتریک (pH=۳) کاهش یافت، سپس در pHهای بالای نقطه ایزوالکتریک، حلالیت ابتدا افزایش و سپس کاهش یافت (دومین نقطه ایزوالکتریک) و حلالیت در pH=۱۰ به حداکثر مقدار خود رسید. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که بین حلالیت در pHهای مختلف، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ($p < 0.05$). به طور کلی بیشترین حلالیت در pH قلیایی و کمترین حلالیت در محدوده pH اسیدی و خنثی مشاهده شد.

علت این پدیده آن است که پروتئین‌ها، زمانی به صورت محلول می‌باشند که دافعه الکترواستاتیک بین آنها بیش از واکنش‌های آبگریزی باشد. در نقطه ایزوالکتریک، پروتئین‌ها بدون بار می‌باشند، نیروهای جاذبه غالب بوده و مولکول‌ها تمایل به تجمع دارند که نتیجه آن عدم حلالیت و رسوب پروتئین می‌باشد.

Table 7 The random treatments and antioxidant activity of hydrolysed-protein of orange seed by alkalaseenzyme

total antioxidant activity	ferric reducing activity	OH-radical scavenging activity(%)	DPPH radical scavenging activity(%)	Time(Hr)	Temperature (°C)	Enzymeto substrate ratio(%)	Treatment
0.396	0.916	88.7	26.15	3.5	50	2	1
0.253	0.828	87.3	14.28	2	50	2	2
0.356	0.853	84.2	36.11	5	45	3	3
0.323	0.929	88.8	24.83	3.5	50	3	4
0.296	0.932	98.9	37.5	5	55	1	5
0.367	0.93	88.5	19.78	3.5	50	2	6
0.536	0.923	78	31.5	2	45	3	7
0.341	0.85	84.22	37.8	3.5	50	2	8
0.31	0.848	87.8	33.33	5	45	1	9
0.274	0.869	86.4	64.13	2	55	1	10
0.367	0.794	79.1	27.91	3.5	50	2	11
0.446	0.557	73.9	29.76	2	45	1	12
0.454	0.574	96.8	63.52	5	55	3	13
0.315	0.916	85.4	30.62	3.5	50	2	14
0.299	0.903	98	33.81	3.5	55	2	15
0.402	0.868	78	38.3	3.5	45	2	16
0.264	0.934	95.5	27.45	2	55	3	17
0.638	0.873	88.3	25.93	3.5	50	1	18
0.53	0.859	94.3	35.6	5	50	2	19
0.384	0.824	83.3	34.87	3.5	50	2	20

به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تعیین^۳ واقعی و تعیین تعدیل شده^۴ و عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۶۲۴۸ و ۰/۸۹۷۴ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکنندگی داده‌ها بود. هم‌چنین جهت مناسب بودن مدل برای داده‌های این پژوهش، از آزمون عدم برازش مدل (Lack of fit) استفاده گردید که با توجه به نتایج، این فرض در $P > 0.05$ معنی‌دار نبود. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۳۶]. بنابراین این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود و این مسئله بیانگر آن است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده هسته پرتقال تطبیق دارد.

۴-۴- بهینه‌سازی فرآیند به منظور دستیابی به تیمار با بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی توسط آنزیم آلکالاز

۴-۴-۱ بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH

معادله زیر با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مدنظر (خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH) ارائه شد:

= فعالیت مهار رادیکال

$$27.62 - 0.72(X_1) + 5.74(X_2) + 3.89(X_3) - 1.90(X_1X_2) + 7.97(X_1X_3) + 0.16(X_2X_3) + 0.61X_1^2 + 11.29X_2^2 + 0.18X_3^2$$

که در این معادله، (X_1) به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا، (X_2) به عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه دوم

3. R Square

4. Adjusted R Square

Table 8 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for DPPH radical scavenging activity

Lack of fit	Adj R- Square	R- Square	F value	Mean square	Sum of squares	Degree of freedom	Source
0.5524	0.8974	0.6248	1.85	190.76	1716.74	9	Model
			0.051	5.24	5.24	1	A-time
			3.20	329.59	329.59	1	B-tem
			1.47	151.63	151.63	1	C-e/s
			0.28	416.36	28.80	1	AB
			4.93	784.09	507.85	1	AC
			1.92	194.79	0.20	1	BC
			0.010	1.04	1.04	1	A ²
			3.40	350.53	350.53	1	B ²
			8.16	0.084	0.084	1	C ²

آنزیم آلکالاز، که توسط جی و همکاران (۲۰۰۹) انجام شده بود، نشان داد که فرآیند هیدرولیز با افزایش مقدار آنزیم و نیز افزایش میزان فعالیت آنزیم، پیشرفت می‌نماید [۴۰].

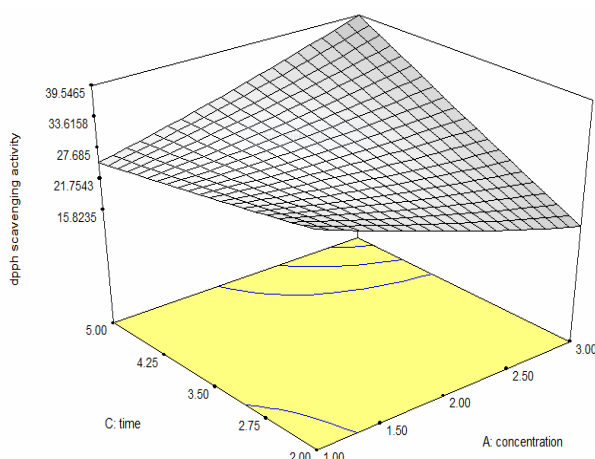


Fig 2 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and the hydrolysis time on the DPPH radical scavenging activity when the hydrolysis temperature was at optimum value (50 °C).

به‌طورکلی با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچکتر با وزن مولکولی کمتر و زنجیره کوتاه‌تر می‌گردد. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، قدرت به دام انداختن رادیکال آزاد در آن‌ها نیز افزایش می‌یابد [۳۸]. نتایج حاصل از آزمایشات یان و همکاران (۲۰۱۵)، نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی پایین و در محدوده ۱-۳ کیلو دالتون بیشترین قدرت مهار رادیکال را دارند [۴۱]. به

۴-۱-۱- بررسی تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH با

تغییر در غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و زمان هیدرولیز نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و دمای هیدرولیز، غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و زمان هیدرولیز و دما و زمان هیدرولیز در شکل‌های ۲ تا ۴ آورده شده است.

نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و زمان هیدرولیز (در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت آنزیم به سوبسترا و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار کنندگی DPPH معنی‌دار بوده و افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا در زمان‌های کم، منجر به کاهش و در غلظت‌های پایین آنزیم به سوبسترا، با افزایش زمان هیدرولیز، افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال DPPH مشاهده شد و افزایش زمان هیدرولیز، به طور مداوم منجر به افزایش فعالیت مهار کنندگی شد و بیشترین فعالیت مهار کنندگی در غلظت ۳ درصد آنزیم به سوبسترا و زمان ۵ ساعت هیدرولیز مشاهده گردید. گئورارد و همکاران (۲۰۰۲) اعلام کردند که بین میزان هیدرولیز و میزان تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با غلظت آنزیم یک رابطه خطی وجود دارد؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت آنزیم، میزان تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد [۳۷]. به‌طورکلی آنزیم آلکالاز در مقایسه با برخی از پروتئازها، دارای بازده بالاتری در پیشرفت هیدرولیز و تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با طول زنجیره کوتاه‌تر و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بهتری می‌باشد [۳۸]. نتایج حاصل از هیدرولیز ضایعات ماهی تن توسط

فعالیت رادیکال‌های آزاد از طریق اسیدهای آمینه خاص در زنجیره جانبی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد [۴۲].

۴-۱-۳- بررسی تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH با

تغییر زمان و دمای هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر زمان و دمای هیدرولیز (در غلظت آنزیم آلکالاز به سوستر بهینه ۲ درصد) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (شکل ۴) نشان می‌دهد که افزایش زمان تاثیر معنیداری بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نداشت؛ اما افزایش دمای هیدرولیز، ابتدا منجر به کاهش و سپس افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH شد و دماهای بالاتر تاثیر بیشتری بر فعالیت مهارکنندگی DPPH داشت بطوری که بیشترین فعالیت مهارکنندگی در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. بنابراین بهتر است برای دستیابی به بیشترین میزان قدرت مهار رادیکال DPPH، از دمای هیدرولیز بالا و زمان متوسط (۳/۵ ساعت) استفاده کرد. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی پایین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از خود نشان می‌دهند [۴۳]. نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین بادام توسط آنزیم آلکالاز نشان داده است که با افزایش درجه‌ی هیدرولیز از ۱۰ درصد به ۲۰ درصد، فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH نیز افزایش می‌یابد [۴۴].

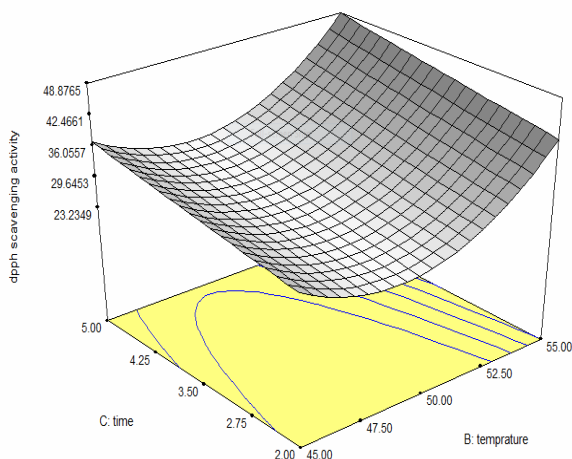


Fig 3 3D graph for the effect of hydrolysis time and temperature on the DPPH radical scavenging activity when the concentration of alkalase enzyme was at its optimum value (2 %).

طور کلی پپتیدهای حاوی اسید آمینه هیستیدین با دادن هیدروژن و یا به دام انداختن رادیکال‌های پروکسیل، باعث ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی شده و نیز حضور اسیدآمینه‌های محتوی گروه SH نظیر اسیدآمینه‌ی سیستین، باعث ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار مناسب از طریق واکنش مستقیم با رادیکال‌های آزاد می‌شود [۳۹].

۴-۱-۲- بررسی تغییرات قدرت مهار رادیکال DPPH با

تغییر در نسبت آنزیم به سوستر و دمای هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلکالاز به سوستر و دمای هیدرولیز (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (شکل ۳) نشان می‌دهد که افزایش غلظت آنزیم به سوستر تاثیر معنیداری بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نداشت؛ اما افزایش دمای هیدرولیز، ابتدا منجر به کاهش و سپس افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH شد و بیشترین فعالیت مهارکنندگی DPPH در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید. بنابراین بهتر است برای دستیابی به بیشترین میزان قدرت مهار رادیکال DPPH، از دمای هیدرولیز بالا و غلظت‌های متوسط آنزیم استفاده کرد.

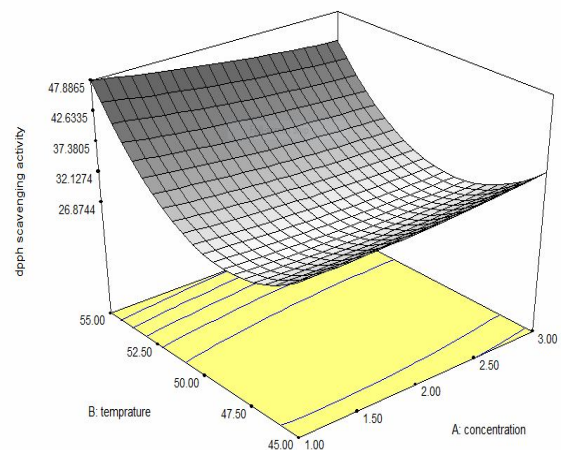


Fig 3 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and the hydrolysis temperature on the DPPH radical scavenging activity when the hydrolysis time was at its optimum value (3.5 Hr).

نتایج حاصل از تحقیقات نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از هیدرولیز آنزیمی، مربوط به چلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و پایان دادن به

که در این معادله، (X_1) به عنوان غلظت آنزیم به سوستر، (X_2) به عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است. آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه اول به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تعیین واقعی و تعیین تعدیل شده عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۷۷۷۷ و ۰/۷۳۶۱ به دست آمده که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تعیین برابر ۰/۷۷۷۷ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۷۷ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

Table 9 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for OH radical scavenging activity

Lack of fit	Adj R- Square	R- Square	F value	Mean square	Sum of squares	Degree of freedom	Source
0.5419	0.7361	0.7777	18.66	238.95	716.85	3	Model
-	-	-	-	-	-	1	A-time
-	-	-	-	-	-	1	B-tem
-	-	-	-	-	-	1	C-e/s
-	-	-	-	-	-	-	AB
-	-	-	-	-	-	-	AC
-	-	-	-	-	-	-	BC
-	-	-	-	-	-	-	A ²
-	-	-	-	-	-	-	B ²
-	-	-	-	-	-	-	C ²

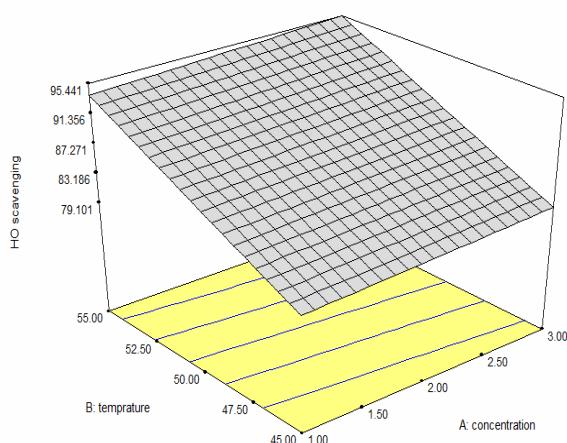


Fig 5 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis temperature on the OH radical scavenging activity when the hydrolysis time was at its optimum value (3.5 hr).

نتایج حاصل از بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین نشان داده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا زمانی که سه فاکتور زمان، دما و نسبت آنزیم به سوستر به نقطه اپتیمم خود رسید، افزایش یافت و سپس با افزایش بیشتر زمان و نسبت آنزیم به سوستر، کاهش یافت که این امر رابۀ تاثیر زمان و دما بر روی فعالیت آنزیمی نسبت دادند [۱۱].

۴-۲-۴ بررسی قدرت مهار کنندگی رادیکال OH

معادله زیر با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مدنظر (قدرت مهار کنندگی رادیکال OH) ارائه شد:

$$\text{فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH} = 87.27 + 0.8 (X_1) + 7.37 (X_2) + 4.09 (X_3)$$

۴-۲-۴-۱ بررسی تغییرات قدرت مهار رادیکال OH با تغییر

در غلظت آنزیم آلكالاز به سوستر و دمای هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلكالاز به سوستر و دمای هیدرولیز (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH (شکل ۵) نشان می‌دهد که تغییرات افزایش غلظت آنزیم به سوستر در ارتباط با فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH از شیب ملایمی برخوردار بود؛ اما افزایش دمای هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH شد و بیشترین فعالیت مهار کنندگی OH در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

$0.88 + 0.013(X_1) + 0.016(X_2) - 4.5(X_3) - 0.083(X_1X_2) - 0.098(X_1X_3) - 0.065(X_2X_3) + 1.90X_1^2 - 0.014X_2^2 - 0.056X_3^2$
 که در این معادله، (X_1) به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا، (X_2) به عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تعیین واقعی و تعیین تعدیل شده و عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۹۰۲۳ و ۰/۸۱۴۳ به دست آمده است. ضریب تعیین توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تعیین برابر ۰/۹۰۲۳ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۹۰ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

به طور کلی رادیکال هیدروکسیل قوی‌ترین رادیکال آزاد مشتق شده از اکسیژن می‌باشد که به راحتی می‌تواند با مولکول‌های بیولوژیک نظیر اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و DNA واکنش نشان دهد؛ بنابراین حذف رادیکال هیدروکسیل می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین دفاع‌های سلولزنده در برابر بیماری‌های مختلف باشد [۴۵]. تفاوت در میزان مهار کنندگی رادیکال OH بین تیمارهای مختلف را می‌توان به تفاوت در نوع اسیدهای آمینه و نیز پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از هیدرولیز آنزیم آلكالاز نسبت داد. نتایج حاصل نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی هسته پرتقال، می‌توانند به عنوان اهدا کننده‌ی موثر الکترون جهت کاهش رادیکال هیدروکسیل در نظر گرفته شوند [۴۶].

۴-۳-۴ بررسی قدرت احیا کنندگی Fe^{3+}

معادله زیر باتوجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مدنظر (قدرت احیا کنندگی Fe^{3+}) ارائه شد:

= قدرت احیا کنندگی Fe^{3+}

Table 10 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for Ferric reducing activity

Lack of fit	Adj R- Square	R- Square	F value	Mean square	Sum of squares	Degree of freedom	Source
0.5142	0.8143	0.9023	10.26	0.021	0.19	9	Model
			0.87	1.796	1.796	1	A-time
			1.29	2.657	2.657	1	B-tem
			0.098	2.025	2.025	1	C-e/s
			26.75	0.055	0.055	1	AB
			37.29	0.077	0.077	1	AC
			16.28	0.034	0.034	1	BC
			4.864	1.002	1.002	1	A ²
			0.25	5.080	5.080	1	B ²
			4.12	8.498	8.498	1	C ²

رادیکال Fe^{3+} معنی‌دار بوده و در غلظت‌های کم با افزایش دمای هیدرولیز، سبب افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} شد و در غلظت‌های بالا با کاهش دمای هیدرولیز، منجر به کاهش فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} گردید و بیشترین فعالیت مهار کنندگی Fe^{3+} در غلظت ۱ درصد آنزیم به سوبسترا و دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

۴-۳-۴-۱- بررسی تغییرات قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} با تغییر در غلظت آنزیم آلكالاز به سوبسترا و دمای هیدرولیز
 نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلكالاز به سوبسترا و دمای هیدرولیز (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} (شکل ۶) نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت آنزیم به سوبسترا و دمای هیدرولیز بر فعالیت مهار کنندگی

۴-۳-۳- بررسی تغییرات قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} با تغییر

در دما و زمان هیدرولیز

نمودار سه بعدی تأثیر دما و زمان هیدرولیز (در غلظت بهینه نسبت آنزیم آلکالاز به سوبسترا ۳ درصد) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} (شکل ۸) نشان می‌دهد که اثر متقابل دما و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} معنی‌دار بوده و در زمان‌های پایین با افزایش دمای هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} شد. با افزایش زمان و دمای هیدرولیز، فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} افزایش یافت؛ اگر چه بیشینه زمان و دمای به کار رفته، با کاهش قدرت مهار کنندگی همراه بود. هم‌چنین بیشترین فعالیت مهار کنندگی Fe^{3+} در دمای ۵۳ درجه سانتی‌گراد و زمان ۵ ساعت هیدرولیز مشاهده گردید.

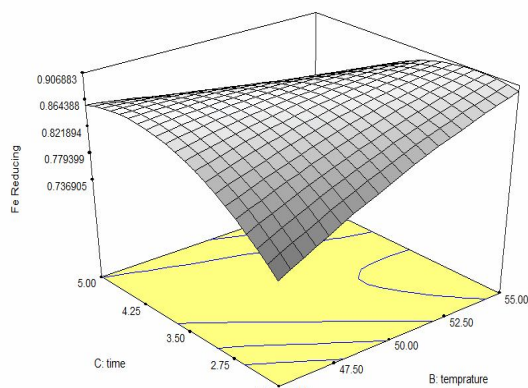


Fig 8 3D graph for the effect of temperature and hydrolysis time on the ferric reducing activity when the concentration of alkalase enzyme was at its optimum value (2%).

با توجه به نتایج حاصل از شکل‌های ۵، ۶ و ۷، به‌طور کلی روند افزایشی و کاهش قدرت احیا کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی هسته پرتقال، را می‌توان به نوع و ماهیت آنزیم پروتئنازی آلکالاز و شرایط انجام واکنش، اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال آنزیم و نوع آنزیم به کار گرفته شده جهت انجام هیدرولیز (از نظر اندوپپتیداز یا اگزوپپتیداز بودن) نسبت داد؛ که این ویژگی‌ها در نوع پپتیدهای تولید شده و اهدای الکترون جهت احیای یون آهن بسیار موثر می‌باشد [۳۸]. نتایج حاصل از آزمایشات لی و همکاران (۲۰۱۰)، نشان داد که فعالیت آنتی-اکسیدانی پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و در محدوده ۱۵۰۰-

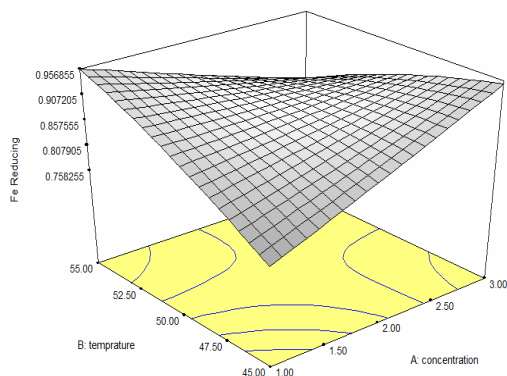


Fig 6 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis temperature on the ferric reducing activity when the hydrolysis time was at optimum value (3.5 hr).

۴-۳-۲- بررسی تغییرات قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} با تغییر

در غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و زمان هیدرولیز

نمودار سه بعدی تأثیر غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا و زمان هیدرولیز (در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} (شکل ۷) نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت آنزیم به سوبسترا و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} معنی‌دار بوده و در غلظت‌های کم با افزایش زمان هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} شد و در غلظت‌های بالا با افزایش دمای هیدرولیز، منجر به کاهش فعالیت مهار کنندگی رادیکال Fe^{3+} گردید و بیشترین فعالیت مهار کنندگی Fe^{3+} در غلظت ۱ درصد آنزیم به سوبسترا و زمان ۵ ساعت هیدرولیز مشاهده گردید.

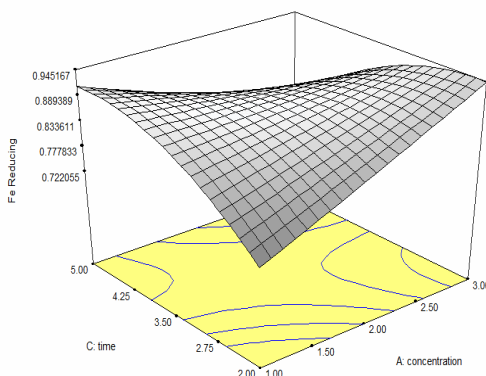


Fig 7 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis time on the ferric reducing activity when the hydrolysis temperature was at its optimum value (50 °C).

پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل، نشان داد که بیشترین قدرت احیای یون آهن در طول موج ۷۰۰ نانومتر، در جذب ۰٫۴۵ صورت می‌گیرد [۴۰].

۴-۴-۴ بررسی قدرت آنتی اکسیدانی کل

معادله زیر با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی داری ضرایب برای پاسخ مدنظر (قدرت آنتی اکسیدانی کل) ارائه شد:

$$0.38 - 3.10 (X_1) - 0.046 (X_2) + 0.017 (X_3) + 1.5 (X_1 X_2) + 0.016 (X_1 X_3) + 0.066 (X_2 X_3)$$

که در این معادله، (X_1) به عنوان غلظت آنزیم به سوستر، (X_2) به عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چندجمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تعیین واقعی و تعیین تعدیل شده و عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۶۹۲۳ و ۰/۷۲۵۸ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود.

۵۰۰ دالتون بسیار قوی‌تر از پپتیدهای با وزن مولکولی پایین‌تر یا بالاتر از این محدوده می‌باشد [۴۷]. لاسود و همکاران (۲۰۱۵)، اعلام کردند علاوه بر اختلاف در شرایط آزمایشگاهی و نوع آنزیم بکار برده شده در فرآیند هیدرولیز، نوع سوسترای بکار گرفته شده، توالی اسیدهای آمینه در پپتیدهای تولید شده، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی پپتیدها، در عملکرد پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها در احیای یون آهن بسیار موثر می‌باشد [۴۸]. نتایج حاصل از آزمایشات نشان داده است که با افزایش غلظت آنزیم، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز افزایش می‌یابد [۳۷] و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده تا حد زیادی تحت تاثیر ترکیب اسیدهای آمینه تشکیل دهنده پپتیدها قرار دارد. اسیدهای آمینه آروماتیک دار می‌توانند با دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد، باعث تبدیل آن‌ها به فرم پایدار شوند [۴۰]. تفاوت در میزان فعالیت احیا کنندگی یون آهن بین تیمارهای مختلف را می‌توان به حضور پپتیدهای خاص و نیز تفاوت در نوع اسیدهای آمینه‌ی تشکیل دهنده‌ی آن‌ها نسبت داد که می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند و فرم پایدار آن‌ها را تولید کنند. نتایج حاصل از هیدرولیز پروتئین جگر ماهی تن توسط پروتئازهای مختلف و بررسی خاصیت احیا کنندگی

Table 11 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for totaloxidation activity

Lack of fit	Adj R- Square	R- Square	F value	Mean square	Sum of squares	Degree of freedom	Source
0.5268	0.7258	0.6923	1.01	0.010	0.061	6	Model
			9.479	9.610	9.610	1	A-time
			2.11	0.021	0.021	1	B-tem
			0.3	2.993	2.993	1	C-e/s
			1.775	1.800	1.800	1	AB
			0.19	1.922	1.922	1	AC
			3.44	0.035	0.035	1	BC
			-	-	-	-	A ²
			-	-	-	-	B ²
			-	-	-	-	C ²

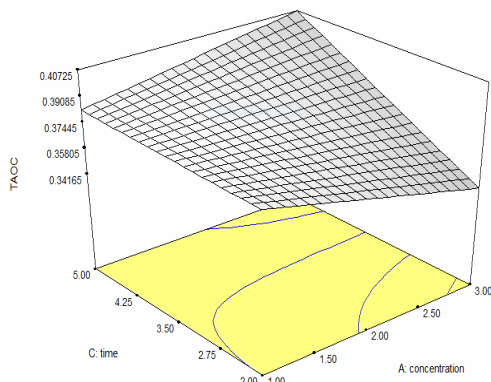


Fig 9 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis time on the total antioxidant activity when the hydrolysis temperature was at its optimum value (50 °C).

۴-۴-۳- بررسی تغییرات قدرت آنتی اکسیدانی کل با تغییر

در زمان و دمای هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر دما و زمان هیدرولیز (شکل ۹-۱۰)، (در غلظت آنزیم آلكالاز به سوپسترا بهینه ۲ درصد) بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل نشان می‌دهد که افزایش دما منجر به کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی کل و افزایش زمان منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل می‌گردد.

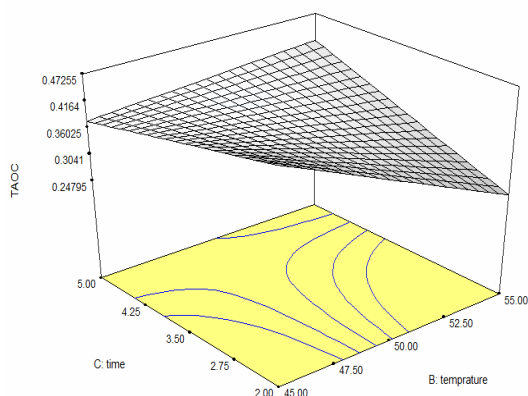


Fig 10 3D graph for the effect of temperature and the hydrolysis time on the total antioxidant activity when the concentration of the alkalase enzyme was at its optimum value (2%).

با توجه به نتایج به دست آمده از شکل‌های ۸، ۹ و ۱۰، به طور کلی ظرفیت ضد اکسایش کل بر اساس احیاء مولیبدات

۴-۴-۱- بررسی تغییرات قدرت آنتی اکسیدانی کل با تغییر

در نسبت آنزیم آلكالاز به سوپسترا و دمای هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلكالاز به سوپسترا و دمای هیدرولیز (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل، در شکل ۴-۸ نشان می‌دهد که اثر متقابل غلظت آنزیم به سوپسترا و دمای هیدرولیز بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل معنی‌دار نبوده و افزایش دمای هیدرولیز منجر به کاهش و افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوپسترا، منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل گردید. بیشترین آنتی اکسیدانی کل در غلظت ۲/۸۶ درصد حجمی- وزنی آنزیم به سوپسترا و دمای ۴۶/۴۷ درجه سانتی‌گراد مشاهده گردید.

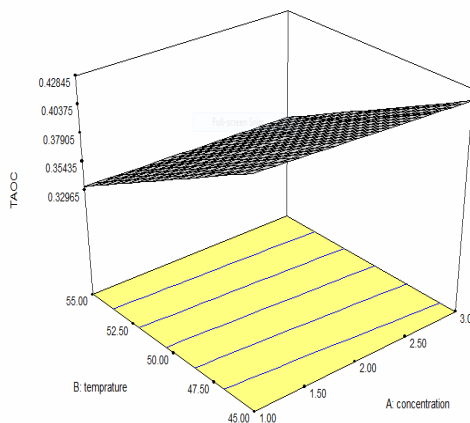


Fig 8 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis temperature on the total antioxidant activity when the hydrolysis time was at its optimum value (3.5hr).

۴-۴-۲- بررسی تغییرات قدرت آنتی اکسیدانی کل با تغییر

نسبت آنزیم آلكالاز به سوپسترا و زمان هیدرولیز

نمودار سه بعدی تاثیر غلظت آنزیم آلكالاز به سوپسترا و زمان هیدرولیز (در دمای بهینه ۵۰ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل در شکل ۹ نشان می‌دهد که افزایش زمان هیدرولیز، منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل شد و افزایش غلظت آنزیم تا حدودی منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل گردید و بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی کل در غلظت ۰/۲۳۹/۰ نسبت آنزیم به سوپسترا و زمان ۴/۸۰ ساعت هیدرولیز مشاهده گردید.

۵- نتیجه گیری

شرایط بهینه توسط نرم افزار Design Expert به دست آمد. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت بهینه (قدرت مهار کنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهار کنندگی رادیکال OH، قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل) توسط آنزیم آلکالاز، تیمار تهیه شده در دمای $54/8$ درجه سانتی گراد، زمان $3/35$ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا $1/7$ درصد حجمی - وزنی بود که با درجه مقبولیت 100° درصد منطبق با $44/44$ درصد قدرت مهار رادیکالهای آزاد DPPH، $93/72$ درصد قدرت مهار رادیکالهای OH، $90/99$ درصد قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} و $32/5$ درصد ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بود. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایشهای اضافی (در سه تکرار) در شرایط پیش بینی شده (دمای $54/8$ درجه سانتی گراد، زمان $3/35$ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا $1/7$ درصد حجمی - وزنی) توسط مدل اجرا گردید که مقادیر $45/85$ درصد برای قدرت مهار رادیکالهای آزاد DPPH، $91/82$ درصد برای قدرت مهار رادیکالهای OH، $89/35$ درصد برای قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} و $39/38$ درصد برای ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به دست آمد. مقادیر آزمایشی تا حد بالایی مطابق با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی آنتی اکسیدانی از آرد چربی گیری شده هسته پرتقال بود. تحقیق حاضر نشان داد که از طریق بهینه کردن شرایط هیدرولیز امکان تولید پپتیدهایی با قدرت آنتی اکسیدانی بالا و قابل استفاده در مواد غذایی وجود دارد و بنابراین ضایعات صنعت تولید آب میوه پرتقال می تواند به عنوان یک محصول در دسترس، به صورت یک منبع پروتئینی جدید جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد و با در نظر گرفتن فعالیت آنتی اکسیدانی بالقوه در هسته پرتقال می توان از آن به جای آنتی اکسیدانهای سنتزی و سایر نگهدارنده های شیمیایی جهت به تاخیر انداختن اکسیداسیون استفاده نمود.

توسط نمونه و تولید کمپلکس مولیبدات/فسفات سبز رنگ در شرایط اسیدی است [۴۹]. به طور کلی آنزیم آلکالاز یک نوع آنزیم اندوپپتیداز است که می تواند پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره بشکند و منجر به رها سازی الیگوپپتید و یا پلی پپتیدهای با طول زنجیره متوسط تا کوتاه و نیز پپتیدهایی حاوی اسیدهای آمینه آبرگیر گردد [۵۰]. نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که حضور اسیدهای آمینه آبرگیر نظیر اسید آمینه والین، فنیل آلانین، ایزولوسین و لوسین در پروتئین های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز نقش بسیار مهمی در فعالیت آنتی اکسیدانی کل دارند [۵۰]. در بررسی پروتئین هیدرولیز شده نوعی کوسه ماهی (*Mustelus mustelus*) با استفاده از آنزیم های پروتئاز قلیایی، پیسین و تریپسین، نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم و درجه هیدرولیز، ویژگی آنتی اکسیدانی کل در نمونه های هیدرولیز شده نیز افزایش می یابد و بیشترین میزان فعالیت در غلظت 3 mg/ml آنزیم آلکالاز گزارش شد [۵۱].

بر اساس نتایج به دست آمده این پژوهش و سایر پژوهش های انجام شده، می توان به این نتیجه رسید که آنزیم آلکالاز منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبرگیر مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می گردد و اعتقاد بر این است گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال و خاصیت آنتی اکسیدانی می باشد [۵۲]. هم چنین اعتقاد بر این است که تخریب ساختار طبیعی پروتئین ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به باز شدن ساختار و قرارگیری در معرض گروه های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال های آزاد می باشند، خواهد شد [۵۲]. این موضوع به اثبات رسیده است که رابطه مستقیمی میان قدرت مهار رادیکال و آنتی اکسیدانی و قابلیت هیدروژن دهنده گی آمینواسیدها وجود دارد. تغییر در طول زنجیره های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تاثیر بسزایی در قدرت ضد اکسایش دارد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضد اکسایش قوی تری هستند [۵۲].

Table 12 Theselection of the proposed optimal treatment with the appropriate antioxidant activityfor the hydrolysed orange seed proteins derived from the enzymatic hydrolysis usingalcalaseenzyme

Desirability	Total Oxidation	Fe reducing	OH Scavenging	DPPH Scavenging	Time	Temperature	Concentration
1	0.325076	0.909951	93.7213	44.4498	3.34	54.84	1.69

Evaluation using the human Jurkat T cell line.
Int Dairy J. 21, 777-782.

۶- منابع

- [10] Cumby N, Zhong Y, Nacz M, Shahidi F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry* 109(1): 144-148.
- [11] Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B., Yongsawadigu, J. (2012). Antioxidant activity of proteinhydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *FoodChemistry*. 132:104-111.
- [12] Khantaphant, S., Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caecaand the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity.*ComparativeBiochemistry and Physiology*. 151, 110-115.
- [13] Bougatif. A., Hajji. M., Balti.R. (2010). Antioxidant and free radical – scavenging activities ofsmooth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases. *Food Chemistry*.1198-1255.
- [14] Guerar, F., Guimas, I., Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*.19, 489-498.
- [15] Je, J. Y., Lee, M. H., Lee, K. h. Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and hypertensive proteinhydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food ResIntern*.42, 1266-1272.
- [16] FAO UNCTAD (2004). From FAO data sited from: UNCTAD from FAO data (2004).
- [17] Mohamed, B., El-Shenawi, M. (2013). Functional properties and In-vitro digestibility of bitter orange (*Citrus aurantium*) seed flour. *Merit Research Journal of Agricultural Science and Soil Sciences*. 1(3): 042- 047.
- [18] Samia El-Safy, F., Rabab, H., Abd El-Ghany, M.E. (2012). Chemical and Nutritional Evaluation of Different Seed Flours as Novel Sources of Protein. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 7 (1): 59-65.
- [1] Jamdar. S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem*. 121, 178-184.
- [2] Penas, E., Prestamo, G., Gomez, R. (2004). High pressure and the enzymatic hydrolysis of soybean whey proteins. *Food Chem*. 85, 641-648.
- [3] Taha, S. F., Mohamed, S. S., Wagdy M. S., Mohamed, F. G. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World ApplSci J*. 21, 651-658.
- [4] Sharma, S., Singh, R., Rana, S. (2011). Bioactive Peptides: A Review. *Int J Bioautomation*. 15, 223-250.
- [5] Korhonen, H., Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *Int Dairy J*. 16, 945-960.
- [6] Samaranyaka, G. P. A., Li-Chan, C. Y. E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *J Fun Foods*. 3, 229-254.
- [7] Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martı́nez-Ayala, A., Da'vila-Ortı́z, G., Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein.*LWT - Food Sci Technol*. 42, 1597-1604.
- [8] Sarmadi, B. H., Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*. 31:1949-1956.
- [9] Takenaka, A., Annaka, H., Kimura, Y., Aoki, H., Igarashi, K. (2003). Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide.*BiosciBiotechnolBiochem*. 67, 278-283.
- [10] Lahart, N., O'Callaghan, Y., Aherne, S. A., O'Sullivan, D. (2011). Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity:

- hydrolysate. *Food Chemistry*. 138(2): 1713-1719.
- [29] Umayaparvathia, S., Meenakshia, S., Vimalraj, V., Arumugama, M., Sivagami, G., Balasubramaniana, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostreacucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*. 4: 343-353.
- [30] Chang-Feng, Ch., Fa-Yuan, H., Bin, W., Tao, L., Guo-Fang, D. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarcagranosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*. 15: 301-313.
- [31] Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269: 337-341.
- [32] Zhu, K.X., Zhou, H.M., Qian, H.F. (2006b). Proteins Extracted from Defatted Wheat Germ: Nutritional and Structural Properties. *Cereal Chemistry*, 83: 1. 69-75.
- [33] Nasri, N. A., Tinay, A. H. E. (2007). Functional properties of fenugreek (*Trigonellafoenumgreacum*) protein concentrate. *Food Chemistry*, 103:582-589.
- [34] Adebowale, K. O., Lawal, O. S. 2004. Comparative study of the functional properties of bambarra groundnut (*Voandzeia subterranean*), jack bean (*Canavaliaensiformis*) and mucuna bean (*Mucunapruriens*) flour. *Food Research International*, 37:355-365.
- [35] Chau, C. F., Cheung, P. C. K. 1998. Functional properties of flours prepared from three Chinese indigenous legume seeds. *Food Chemistry*, 61:429-433.
- [36] 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.
- [37] Guerar, F., Guimas, I., Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular catalysis B: Enzymatic*. 19, 489-498.
- [19] Kaur, M., Singh, N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicerarietinum L.*) cultivars. *Food Chemistry*, 102:366-374.
- [20] Papalamprou, E.M., Doxastakis, G.I., Biliaderis C.G., Kiosseoglou, V. (2009). Influence of preparation methods on physiochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food hydrocolloid*, 23: 337-43.
- [21] AOAC Method 983.23. (1990). Fat in foods, chloroform-methanol extraction. *In Official methods of analysis (15th ed., pp. 101-111). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.*
- [22] Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 7: 219-280.
- [23] Bradford, MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248- 54.
- [24] Horax, R., Hettiarachchy, N., Over, K., Chen, P., Gbur, E. (2010). Extraction, fractionation and characterization of Bitter Melon seed proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1892-1897.
- [25] Villanueva, A., Vioque, J., Sánchez-Vioque, R., Clemente, A., Pedroche, J., Bautista, J., Millán, F. (1999). Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 76: 1455-1460.
- [26] Guo, H., Kozuma, Y., & Yonekura, M. (2005). Isolation and properties of antioxidative peptides from water-soluble royal jelly protein hydrolysate. *Food Science Technology Research*. 11. 222-230.
- [27] Matsuoka, T., Kawashima, T., Nakamura, T., Kanamaru, Y., Yabe, T. (2012). Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 43: 685-697.
- [28] Wang, B., Li, L., Chi, C. F., Ma, J. H., Luo, H. Y., Xu, Y. F. (2013). Purification and characterization of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel *Mytilus edulis* protein

- [46] Shuguo, S., Meihu, M., Qinlu, L., Tao, Y., Huihui, N. (2013). Systematic Investigation of Antioxidant Activity of Egg White Protein Hydrolysates Obtained by Pepsin. *Advance Journal of Food Science and Technology*. 5(1): 57-62.
- [47] Lee, S. H., Qian, Z. J., Kim, S. K. (2010). A novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from tuna frame protein hydrolysate and its antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *Food Chemistry*. 118, 96-102.
- [48] Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M., C., Barkia, A., Nasri, M. (2015). Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics*. 115, 28-37.
- [49] Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*. 124: 551-555.
- [50] Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Da'vila-Ortiz, G., Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein. *LWT - Food Sci Technol*. 42: 1597-1604.
- [51] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114: 1198-1205.
- [52] Sun, Q., Shen, H., Leu, Y. 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 21: 6646-6652.
- [38] Oveisi pour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 115, 238-242.
- [39] Jin, D.X., Liu, X., Zheng, X., Wang, X., He, J. (2016). Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chemistry*. 204, 427-436.
- [40] Je, J. Y., Lee, M. H., Lee, K. h. Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42, 1266-1272.
- [41] Yan, Q. J., Huang, L. H., Sun, Q., Jiang, Z. Q., Wu, X. (2015). Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolysed by multiple proteases. *Food Chemistry*. 179, 290-295.
- [42] Taha, S. F., Mohamed, S. S., Wagdy M. S., Mohamed, F. G. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal*. 21: 651-658.
- [43] Sogi, D. S. (2001). Functional properties and characterization of tomato waste seed proteins. PHD Thesis. Amritsar, India: Guru Nanak Dev Univ. 69-95.
- [44] Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*. 121, 178-184.
- [45] Qian, Z.J., Jung, W. K., Byun, H. G., Kim, S. K. (2008). Protective effect of an antioxidant peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technol*. 99: 3365-3371.

Determination of optimum conditions for production of antioxidant peptides derived from hydrolysis of orange seed protein with alkalase enzyme

Mazloomi, S. N.¹, SadeghiMahoonaak, A.^{2*}, Ghorbani, M.³, Houshmand, Gh.⁴

1. PhD Student of food chemistry., Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Associate Professor, Department of Food Science & TechnologyGorgan University of Agricultural Sciences & Natural ResourcesGorgan, I.R. Iran.
3. Associate Professor,Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, I.R. Iran.
4. Department of Pharmacology, School of medicine, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

(Received: 2019/01/12 Accepted:2019/04/20)

The use of enzymes for hydrolysis of protein sources is one of the common methods in the food processing. A hydrolysed protein is a complex mixture of peptides and amino acids that are obtained from hydrolysis by various enzymes, acids or alkali. The orange seed is largely available from the orange juice industrieswastes, and its defatted flour contains about 26% protein and can be used as a rich and cost-effective source for production of proteins and peptides of plant sources. In the present study, a protein isolate with high purity was extracted from defatted orange seed flour and then the protein was hydrolysed by using Alcalase enzyme in concentrations of 1, 1.5 and 3% and the hydrolysis time of 2-5 hours at temperature of 45-55 °C at suitable pH for enzyme activity. Then the optimal conditions for the production of hydrolysed proteins with the highest antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, radical OH scavenging activity, ferric reducing activity and total antioxidant) were determined. Optimum treatment at determined conditions (temperature 54.8 °C, time 3.35 hr and ration of the enzyme to the substrate 1.7 % v/w) with antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity (45.85%), radical OH scavenging activity (91.82%), ferric reducing activity (89.35%) and total antioxidant (39.68%), Based on the optimization of response surface method, was obtained and antioxidant tests were performed on the optimal treatment for confirmation of the proposed values by software. The results showed that the hydrolysed protein derived from orange seed could be used in the foods formulation as a natural additive and also it can be used as a nutraceutical with high antioxidant ability.

Key words: Orange Seed Protein, Hydrolysed protein, Peptide, Antioxidant,

* Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@yahoo.com