



بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima L.*) توسط پانکراتین با استفاده از پیش تیمار

مایکروویو

زینب نوشی منجیلی<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک\*<sup>۲</sup>، وحید عرفانی مقدم<sup>۳</sup>، محمد قربانی<sup>۴</sup>، هدی شهیری طبرستانی<sup>۵</sup>

- ۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۳- استادیار گروه نانوتکنولوژی پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.
- ۴- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
- ۵- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

#### چکیده

#### اطلاعات مقاله

دانه‌های گیاهان *Cucurbitaceae* (کدو، خربزه و غیره) یکی از منابع غنی پروتئین، بشمار می‌آیند. پروتئین‌ها از جمله منابع تغذیه‌ای مهم انسان هستند. هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو با استفاده از پیش تیمار مایکروویو منجر به تولید هیدرولیز شده‌هایی با خواص زیست فعالی، از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. استفاده از پیش تیمار مایکروویو باعث ایجاد تغییراتی در ساختمان ۳ بعدی پروتئین‌ها می‌شود، ساختار ۳ بعدی پروتئین را باز کرده و دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی را تسریع می‌کند. بنابراین، استفاده از پیش تیمار مایکروویو، روشی مناسب برای صرفه‌جویی در زمان و غلظت آنزیم مورد استفاده در هیدرولیز آنزیمی می‌باشد. در این پژوهش محلول محتوی کنسانتره پروتئین دانه کدو در معرض انرژی مایکروویو با توان ۴۵۰-۹۰۰ وات طی ۳۰-۹۰ ثانیه قرار گرفت و به‌عنوان محلول سوپسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی استفاده شد. هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم پانکراتین، با غلظت ۰/۵ تا ۲/۵ درصد نسبت به سوپسترای پروتئینی در بازه زمانی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه، دما و pH اپتیمم پانکراتین، به‌منظور تولید هیدرولیز شده‌هایی با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی انجام شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن، اندازه‌گیری شد. بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از پیش تیمار مایکروویو در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد بود و شرایط بهینه ارائه شده توسط نرم‌افزار برای دستیابی به بیشینه فعالیت شلاته‌کنندگی آهن (۰/۹۵/۵)، مهار رادیکال آزاد DPPH (۵/۱/۵) و آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) (۰/۹۷۶)، زمان ۱۰۲ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد بود که ۸۹/۵٪ با نتایج بدست آمده مطابقت داشت.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۳/۲۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۶/۱۱

کلمات کلیدی:

پانکراتین،

پیش تیمار مایکروویو،

دانه کدو،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.22034/FSCT.20.143. 78

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.143.6.8

\* مسئول مکاتبات:

sadeghiaz@yahoo.com

## ۱- مقدمه

اکسیدانی پروتئین دانه کدو [۱۳] و تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدانی از هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه کدو [۷]. در سال‌های اخیر، بسیاری از روش‌های فیزیکی، مانند فراصوت [۱۴، ۱۵]، فشار بسیار بالا [۱۶]، مایکروویو [۱۷، ۱۸] و غیره برای کمک به هیدرولیز، جهت دستیابی به مقادیر بالاتری از پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع پروتئین‌های غذایی استفاده شده است. برخی از تجهیزات مانند فشار هیدرواستاتیک بالا و تابش بسیار گران‌قیمت هستند و برای استفاده در مقیاس خانگی به آسانی در دسترس نیستند [۱۹]. مایکروویو به امواج الکترومغناطیس با فرکانس ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز و طول موج‌های بین ۱ میلی‌متر تا ۱ متر اطلاق می‌شود. مایکروویو معمولاً سه ویژگی را نشان می‌دهد: نفوذ، بازتاب و جذب. پروتئین مواد غذایی می‌تواند امواج مایکروویو را جذب کند و باعث تغییر ساختار پروتئین شود. تحقیقات نشان می‌دهد که هیدرولیز آنزیمی به کمک مایکروویو می‌تواند زمان هیدرولیز آنزیمی را کوتاه کند، سرعت واکنش را بهبود بخشد و بازده تولید پپتید را افزایش دهد [۲۰، ۲۱]. هدف از این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو با استفاده از پیش‌ تیمار مایکروویو توسط آنزیم پانکراتین و بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH، آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و فعالیت شلاته‌کنندگی آهن می‌باشد.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- تهیه مواد اولیه

ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima L.*) از بازار محلی آستانه اشرفیه در استان گیلان تهیه شد و پس از جداسازی دانه‌ها به صورت دستی، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به

پروتئین‌ها از منابع تغذیه‌ای مهم انسان بشمار می‌آیند. این ترکیبات نیتروژن، اسیدهای آمینه و انرژی مورد نیاز برای عملکرد طبیعی سیستم‌های بدن را فراهم می‌کنند. رایج‌ترین راه برای تولید پپتید، هیدرولیز پروتئین‌ها به کمک آنزیم-هاست [۱]. امروزه پپتیدهای زیست‌فعال مشتق شده از هیدرولیز پروتئین‌های مختلف رژیم غذایی دارای نقش‌های بیولوژیکی مختلفی مانند کاهش فشار خون [۲]، آرامش-بخش [۳]، ضد کلسترول [۴]، آنتی‌اکسیدان [۵] و ضد سرطان [۶] می‌باشند. دانه کدو می‌تواند به‌عنوان یک ماده خام برای تولید محصولات پروتئینی با کیفیت بالا جهت فرمولاسیون مواد غذایی و همچنین خواص عملکردی، استفاده شود [۷]. مهمتر اینکه دانه کدو به دلیل محتوای پروتئین بالا، دسترسی آسان و هزینه کم، یک ماده خام با ارزش برای تهیه پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی است. ذاکری و همکاران (۲۰۱۹)، گزارش کردند هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و بازدارندگی اکسید نیتریک بالایی هستند و می‌توانند به‌عنوان یک ماده مناسب در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند [۸]. هیدرولیز شده‌های کنجاله دانه کدو با خواص عملکردی مناسب، می‌توانند در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف برای بهبود خواص فیزیکی، شیمیایی، افزایش ماندگاری و به‌عنوان عوامل ضد فشار خون و آنتی‌اکسیدان در پیشگیری از بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده شوند [۹]. برخی دیگر از مطالعات انجام شده بر روی دانه کدو به شرح ذیل می‌باشند: اثر هیدرولیز آنزیمی پپتیدهای مشتق شده از دانه کدو (*Cucurbita pepo L.*) بر ظرفیت اتصال روی و پایداری دستگاه گوارش در شرایط آزمایشگاهی [۱۰]، خواص عملکردی ایزوله و هیدرولیز شده‌های پروتئین دانه کدو (*Cucurbita pepo*) [۱۱]، تولید پپتیدهای ضد اکسایشی از کنجاله دانه کدو [۱۲]، خواص آنتی-

مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شد [۱۳]. آنزیم پانکراتین به همراه سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش‌ها از شرکت‌های معتبر (مجللی و مرک) تهیه شدند.

## ۲-۲- تولید کنسانتره پروتئینی

دانه‌های کدو خشک‌شده، بدون پوست‌گیری توسط پرس سرد روغن‌کشی شده و کنجاله حاصل با آسیاب، کاملاً پودرو از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی-وزنی) به پودر اضافه‌شده و توسط شیکر با سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت مخلوط شد. عمل حذف روغن تا کاهش آن به حدود ۵ درصد ادامه یافت. حلال باقیمانده در کنجاله در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت توسط آون تحت خلأ جدا شد. کنجاله عاری از روغن به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) در آب مقطر پخش شد و pH محلول به منظور باز شدن ساختمان پروتئین، توسط سود ۱ نرمال به ۱۱ رسانیده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه توسط همزن مکانیکی مخلوط شد. پس‌از آن، عمل سانتریفیوژ به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار انجام شد و با جمع‌آوری محلول رویی یا سوپرناتانت، باقی‌مانده در آب-مقطر مجدداً حل شد و استخراج سوپرناتانت دوباره تکرار شد. سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط شدند و با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ نرمال pH آن روی ۴ تنظیم شد، عمل سانتریفیوژ مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل توسط خشک‌کن انجمادی خشک‌شد و در ظروف دربسته و محیط خشک و خنک نگهداری شد [۹].

## ۲-۳- آزمون‌های شیمیایی

### ۱-۳-۲- محتوای پروتئین نمونه

۲ گرم از نمونه به‌همراه ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کلدال (کاتالیزور) به درون لوله هضم افزوده شد و بعنوان شاهد از یک لوله هضم بدون نمونه و فقط حاوی اسید و کاتالیزور استفاده شد. عملیات هضم با توان ۸۰ دستگاه به مدت ۱۲۰ دقیقه تا شفاف شدن محتویات دستگاه انجام شد. بعد از خنک شدن و خارج شدن بخارات اسیدی با استفاده از دستگاه تقطیر، توسط سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد، تقطیر انجام شد و سپس تیتراسیون نمونه به‌کمک اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی شدن نمونه در حضور معرف متیل‌رد ادامه یافت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد [۲۲].

معادله ۱

$$\text{درصد ازت نمونه} = 1.4 \times N \times (V_1 - V_2) / m \times 100$$

N نرمالیتیه اسیدکلریدریک،  $V_1$  حجم اسید مصرفی برای نمونه،  $V_2$  حجم اسید مصرفی برای شاهد و m وزن نمونه، بر حسب گرم می‌باشد. برای محاسبه درصد پروتئین نمونه، ازت کل را در فاکتور پروتئینی (۶/۲۵) ضرب می‌کنیم.

### ۲-۳-۲- محتوای رطوبت نمونه

مقدار ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و در داخل آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه سرد شدن در داخل دیسکاتور، توزین انجام شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا محتوای رطوبت نمونه به مقدار ثابتی رسید. سپس مقدار رطوبت طبق معادله ۲ محاسبه شد [۲۲].

معادله ۲:

$$\text{درصد رطوبت} = (W_1 - W_2) / m \times 100$$

$W_1$  وزن ظرف و نمونه قبل خشک کردن،  $W_2$  وزن ظرف

و نمونه بعد از خشک کردن و m وزن نمونه می‌باشد.

**۳-۳-۲- محتوای خاکستر نمونه**

در بوته‌چینی با وزن مشخص مقدار ۲ گرم نمونه توزین شد. ابتدا روی هیتر سوزانده شد و پس از آن بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی با دمای ۶۰۰-۵۵۰ درجه سانتی-گراد، به مدت ۶ ساعت انتقال یافت و حرارت‌دهی تا سفید شدن رنگ خاکستر ادامه یافت. در نهایت بعد از ۱۵ دقیقه خنک شدن بوته در دیسکاتور، توزین انجام شد. میزان خاکستر از طریق معادله ۳ محاسبه شد [۲۲].

معادله ۳:

$$\text{درصد خاکستر} = (W_1 - W_2) / m \times 100$$

$W_1$  وزن بوته و خاکستر،  $W_2$  وزن بوته و  $m$  وزن نمونه می‌باشد.

**۴-۳-۲- محتوای چربی نمونه**

۳ گرم از نمونه روی کاغذ صافی توزین و در داخل کارتوش گذاشته شد. کارتوش به قسمت استخراج دستگاه سوکسله انتقال یافت. بالن با وزن مشخص تا نیمه با حلال هگزان پر شد و سپس به دستگاه متصل شد. عملیات استخراج به مدت ۴ ساعت انجام شد. در نهایت برای خارج کردن حلال باقیمانده، بالن محتوی نمونه به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت سپس بالن مجدداً توزین شد. درصد چربی با معادله ۴ محاسبه شد [۲۲].

معادله ۴:

$$\text{درصد چربی} = (W_1 - W_2) / m \times 100$$

$W_1$  وزن بالن و نمونه،  $W_2$  وزن بالن و  $m$  وزن نمونه می‌باشد.

**۴-۲- پیش تیمار مایکروویو**

محلول کنسانتره پروتئین دانه کدو با نسبت ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ ) (۱۰۰ gr/L) (pH 7.4، تهیه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه هم زده شد و در معرض انرژی مایکروویو با توان ویژه ۴۵۰-۹۰۰ وات به مدت ۳۰-۹۰ ثانیه برای هر تیمار قرار گرفت. محلول

پروتئینی پیش تیمار شده با مایکروویو به عنوان محلول سوپسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده قرار گرفت [۲۳]. لازم به ذکر است پس از اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در توان‌ها و زمان‌های مختلف مایکروویو، توان ۶۰۰ وات بمدت ۳۰ ثانیه انتخاب و قبل از هیدرولیز آنزیمی اعمال شد.

**۵-۲- هیدرولیز آنزیمی**

به منظور بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی، از روش سطح پاسخ استفاده شد. آنزیم پانکراتین در غلظت‌های ۰/۵ تا ۲/۵ درصد نسبت به سوپسترای پروتئینی اضافه شد و زمان هیدرولیز به عنوان یک فاکتور مستقل برای هر یک، طی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. دما و pH هیدرولیز، مطابق دمای اپتیمم (۴۰ درجه سانتی‌گراد) و pH اپتیمم (pH=7.4) در نظر گرفته شد. به منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس هیدرولیز شده‌ها (مایع رویی) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی برای بدست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده، خشک شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی-گراد نگه‌داری شد [۱۳، ۲۴]. هیدرولیز آنزیمی مطابق جدول ۱ انجام شد.

**۶-۲- اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی****۱-۶-۲- مهار رادیکال آزاد DPPH**

هیدرولیز شده‌ها، در آب مقطر با غلظت بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۶۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار در متانول) مخلوط شد. به مدت ۲ دقیقه به شدت

گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بالاتر است [۲۶].

### ۲-۷- بهینه‌سازی فرایند

شرایط هیدرولیز با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۱ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. متغیرهای مستقل، نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا ( $X_1$ ) و زمان هیدرولیز ( $X_2$ ) در پنج سطح ( $\alpha$ ،  $\alpha+$ ،  $+$ ،  $-$ ،  $-1$ ،  $-1-\alpha$ ) و سه نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ مورد بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH بود. اثر متغیرهای مستقل بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ ارزیابی شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۲ ارائه شده است.

**Table 2: Levels of independent variables used to optimize the antioxidant activities of pumpkin seed protein**

$\alpha$ -	-1	0	+1	$\alpha$ +	independent variables
0.5	0.8	1.5	2.2	2.5	E/S
20	45	105	165	190	time

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- ترکیبات شیمیایی

میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی در جدول ۳ نشان داده شده است.

تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، در دمای اتاق نگهداری شد. جذب، در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد. شاهد، حاوی ۸۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار) است. توانایی مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد [۲۵].

معادله ۵  $100 \times \text{جذب شاهد} / \text{جذب}$

(نمونه - جذب شاهد) = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

#### ۲-۶-۲- فعالیت شلاته‌کنندگی آهن

۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بهینه، با ۱۰ میکرولیتر  $\text{FeCl}_2$  (۲ میلی‌مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین<sup>۱</sup> (۵ میلی‌مولار) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه به شدت مخلوط شد. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. کاهش رنگ، به دلیل شلاته‌شدن آهن، با اندازه‌گیری جذب در ۵۶۲ نانومتر ثبت شد. نمونه شاهد حاوی ۸۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر  $\text{FeCl}_2$  و ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) است. درصد شلاته‌کنندگی با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد [۲۵].

معادله ۶  $100 \times \text{جذب شاهد} /$

(جذب نمونه - جذب شاهد) = درصد شلاته‌کنندگی

#### ۲-۶-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر)

در این روش ۰/۱ ml از نمونه بهینه با ۱ ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار

1 -ferrozine

[ DOI: 10.22034/FSCT.20.143.90 ]

[ DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.143.5.7 ]

[ Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-09-27 ]

**Table 3: Chemical compounds present in whole grain, defatted flour and pumpkin seed protein concentrate**

moisture	ash	fat	protein	sample
8.46%	6.9%	31.57%	33.92%	whole grain
7.65%	4.65%	5.12%	59.5%	defatted flour
5.45%	1.45%	2.29%	65.62%	pumpkin seed protein concentrate

نتایج میانگین‌ها ۳ تکرار هستند.

هگزان باقیمانده پس از فرایند چربی‌زدایی و استفاده از خشک‌کن انجمادی بمنظور خشک کردن رسوب پروتئینی بعد از فرایند استخراج می‌باشد [۲۷]. مقدار پروتئین و چربی در دانه کامل کمی متفاوت از یافته‌های اردبیلی و همکاران (۲۰۱۱) است که این اختلافات ناشی از تفاوت درگونه‌های مورد استفاده می‌باشد [۲۸]. با توجه به جدول، کمترین میزان خاکستر مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن فرایند استخراج پروتئین و حذف مقادیر زیادی ترکیبات غیرپروتئینی است.

همانطور که در جدول ۳ ملاحظه می‌شود، عمل چربی‌گیری سبب کاهش میزان چربی کنسانتره پروتئینی نسبت به دانه کامل شده است. در ابتدا این کاهش به دلیل انجام عملیات پرس سرد از دانه کامل می‌باشد که میزان چربی را در کنجاله حاصل (از ۳۱٪/۵۷ به ۵٪/۱۲) کاهش داده است و کاهش نهایی چربی در کنسانتره به دلیل استفاده از حلال هگزان، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و رسوب پروتئین در نقطه ایزوالکتریک آن می‌باشد [۲۴]. کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن استفاده از آن با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت حذف

**Table 1: random treatments and antioxidant activity of hydrolyzed pumpkin seed protein with using microwave pretreatment**

Total Oxidant	DPPH%	Chilating Activity%	E/S %	time	treatment
0.835	45.2	83.3	1.5	20	1
0.87	49.5	89	0.8	45	2
0.825	44.1	83.5	2.2	45	3
0.825	47.3	86.9	0.5	105	4
0.955	51.5	90.3	1.5	105	5
0.975	50.4	91.1	1.5	105	6
1	52.6	90.2	1.5	105	7
0.835	48.6	87.4	2.5	105	8
0.81	45	83.5	0.8	165	9
0.895	48	85.5	2.2	165	10
0.825	43.6	83.2	1.5	190	11

به سایر متغیرها تاثیرگذارتر است. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ( $p < 0.05$ )، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه شلاته-کنندگی یون آهن با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی  $R^2 = 0.9566$  توانایی خوب مدل در

## ۲-۳- تاثیر زمان هیدرولیز و نسبت E/S بر فعالیت شلاته‌کنندگی با استفاده از پیش‌تیمار MW

با توجه به مقادیر عدد P در جدول ۴ استنباط می‌شود، مقادیر  $A^2$ ،  $B^2$  و AB تاثیر معنی‌داری بر روی فعالیت شلاته‌کنندگی آهن می‌گذارند ( $p < 0.05$ ). متغیر  $A^2$  نسبت

$$90.53 + 1.87AB - 3.60A^2 - 1.65B^2$$

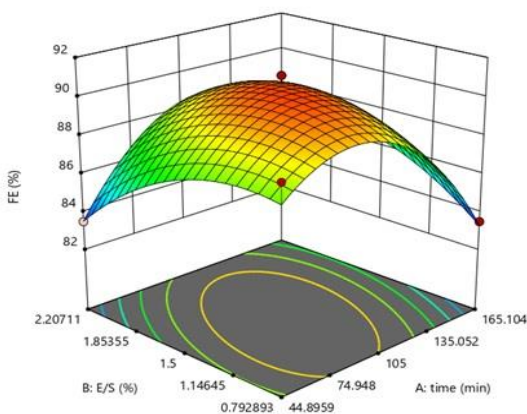
پیش‌بینی‌کننده‌های مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد که از معادله ۷ پیروی می‌کند.

**Table 4: Effect of time and E/S ratio on iron ion chelating activity**

df	P <sub>Value</sub>	Regression coefficient	
5	0.0020	90.53	model
1	0.2177	-0.4552	A
1	0.3290	-0.3491	B
1	0.0093	1.87	AB
1	0.0002	-3.60	A <sup>2</sup>
1	0.0078	-1.65	B <sup>2</sup>
		0.7161	Pred-R <sup>2</sup>
		0.9132	adj-R <sup>2</sup>
3	0.1698		Lack of fit

A: زمان، B: E/S

جهت بهبود آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین‌های مختلف عمل می‌کند. MW سبب باز شدن ساختار ۳ بعدی پروتئین شده و به افزایش دسترسی آنزیم‌ها به پیوندهای پپتیدی کمک می‌کند [۳۱]. اولوکو و همکاران (۲۰۱۵) اشاره کردند که استفاده از انرژی میکروویو باعث افزایش درجه هیدرولیز و پایداری هیدرولیز شده‌های پروتئین آب‌پنیر می‌شود [۳۱]. گازی‌کالوویچ و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند در مقایسه با عملیات حرارتی، به نظر می‌رسد که تیمار میکروویو بر ساختار گلوتن و آلرژیک‌زایی تأثیر می‌گذارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، در نهایت پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی مناسب تولید می‌کند [۳۲].



**Figure 1: Investigating the effect of hydrolysis time and E/S ratio on iron chelating activity by using microwave pretreatment**

در واکنش شلاته‌کنندگی، فروزین یک کمپلکس بنفش‌رنگ با یون آهن ایجاد می‌کند. زمانیکه ترکیب شلاته‌کننده‌ای در محیط وجود داشته باشد، غلظت یون آهن کاهش یافته و از شدت رنگ این کمپلکس کاسته خواهد شد. بنابراین با افزایش قابلیت شلاته‌کنندگی یون آهن، شدت رنگ کمپلکس ایجاد شده و در نتیجه شدت جذب در ۵۶۲ نانومتر کاهش خواهد یافت [۱۲]. مطابق شکل ۱، بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی با استفاده از پیش‌تیمار، مربوط به زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S می‌باشد و کمترین میزان آن متعلق به زمان ۱۹۰ دقیقه بود. گزارش شده است که برخی از اسیدهای آمینه و مشتقات آنها مانند سیستئین، هیستیدین، تریپتوفان، لیزین، آرژنین، لوسین، تیروزین و والین دارای فعالیت ضداکسایشی هستند [۲۹]. به‌علاوه تری‌پپتیدهایی که حاوی اسیدهای آمینه تریپتوفان یا تیروزین در انتهای C خود هستند فعالیت ضداکسایشی قابل ملاحظه‌ای از خود نشان می‌دهند [۳۰]. نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی هیدرولیز شده-های دانه کدو طی زمان ۲ ساعت و غلظت ۲٪ آنزیم بود [۱۲]. تفاوت در گزارشات مختلف احتمالاً به دلیل تفاوت در شرایط هیدرولیز، گونه‌های مورد استفاده، نوع آنزیم و غیره می‌باشد. پیش‌تیمار پروتئین‌ها قبل از هیدرولیز آنزیمی



آزاد DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی  $R^2=0.9414$  می‌باشد که نشان می‌دهد مدل توانسته ۹۴/۱۴ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۸ روابط بین متغیرهای واکنش و مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

$$51.50+2.10AB-3.43A^2-1.66B^2$$

Table 5: Effect of time and E/S ratio on DPPH radical scavenging activity

df	P <sub>Value</sub>	Regression coefficient	
5	0.0042	51.50	model
1	0.3773	-0.3578	A
1	0.8568	-0.0702	B
1	0.0101	2.10	AB
1	0.0006	-3.43	A <sup>2</sup>
1	0.0131	-1.66	B <sup>2</sup>
		0.7096	Pred-R <sup>2</sup>
		0.8828	adj-R <sup>2</sup>
3	0.5843		Lack of fit

E/S :B, زمان: A

نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای مؤثر بر فعالیت ضداکسایشی به شمار می‌روند [۳۳]. کاهش قابلیت مهارکنندگی رادیکال با افزایش غلظت آنزیم می‌تواند به علت اثر هضم‌کنندگی آنزیم بر پپتیدهای تولیدی باشد. با افزایش غلظت آنزیم، امکان اثر بر ماده پروتئینی افزایش یافته و این امر منجر به شکسته شدن تعدادی از پپتیدهای ضداکسایشی تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد [۳۴]. یانگ و همکاران (۲۰۲۲) اثر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند تمام پیش‌تیمارهای مایکروویو هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر با توان‌های مختلف، فعالیت مهاری DPPH بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند و قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، به-کمک مایکروویو با توان ۳۰۰ وات بالاترین مقدار بود [۳۵].

۳-۳- تاثیر زمان هیدرولیز و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از پیش‌تیمار MW با توجه به مقادیر عدد P جدول ۵، مقادیر A<sup>2</sup>، B<sup>2</sup> و AB بر مهار رادیکال آزاد DPPH تاثیرگذار می‌باشند ( $p<0.05$ ). A<sup>2</sup> نسبت به سایر متغیرها تاثیرگذارتر است. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ( $0.05<p$ )، بیانگر این است که معادله<sup>۸</sup> مدل به خوبی با داده‌های مربوط به مهار رادیکال

با توجه به شکل ۲، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S می‌باشد و کمترین میزان آن متعلق به زمان ۱۹۰ دقیقه است. همانطور که از نتایج پیداست با افزایش زمان هیدرولیز و نسبت E/S، از میزان مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته شده است. از خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH برای بررسی قابلیت هیدروژن‌دهندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده می‌شود. حذف رادیکال آزاد مکانیسمی است که توسط آن ترکیبات ضداکسایشی قادر هستند از واکنش‌های اکسایشی جلوگیری نمایند. رادیکال آزاد DPPH یکی از معدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانیکه این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن‌دهنده مانند یک ضداکساینده قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به یک ترکیب پایدار تبدیل می‌شود و در نتیجه‌ی مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و کاهش میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد.

### ۳-۴- تاثیر زمان هیدرولیز و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) تحت پیش‌تیمار MW

با توجه به مقادیر عدد P جدول ۶، مقادیر  $A^2$ ،  $B^2$  و  $AB$  بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) تاثیرگذار می‌باشند ( $p < 0.05$ ). معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ( $0.05 < p$ )، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مطابقت دارد. رابطه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی  $R^2 = 0.9583$  می‌باشد. که نشان می‌دهد مدل توانسته ۹۵/۸۳ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۹ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان می‌دهد.

$$0.9767 + 0.0325AB - 0.0683A^2 - 0.0683B^2$$

دنگ و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند پیش‌تیمار مایکروویو با توان ۴۰۰ وات سبب بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هیدرولیز شده‌های کنجاله آفتابگردان می‌شود [۳۶]. تفاوت در توان‌های مورد استفاده در مطالعات مختلف ممکن است به میزان حلالیت مواد پروتئینی، مرتبط باشد. هیدرولیز شده‌های پروتئین شیر در مقایسه با پروتئین‌های نامحلول با توان مایکروویو کمتری تحت تاثیر قرار می‌گیرند [۳۵].

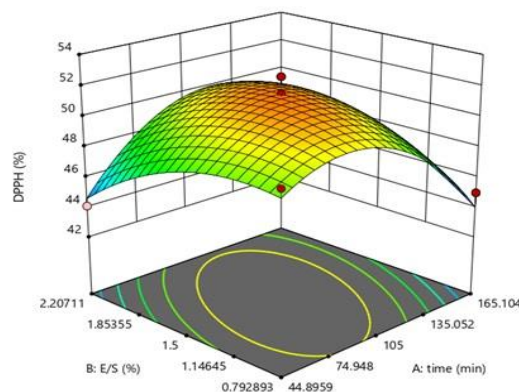


Figure 2: The effect of hydrolysis time and E/S on DPPH radical scavenging activity by using microwave pretreatment

Table 6: Effect of hydrolysis time and E/S ratio on total antioxidant activity (absorbance at 695 nm)

df	P <sub>Value</sub>	Regression coefficient	
5	0.0018	0.9767	model
1	0.9441	-0.0005	A
1	0.3795	0.0068	B
1	0.0221	0.0325	AB
1	0.0004	-0.0683	A <sup>2</sup>
1	0.0004	-0.0683	B <sup>2</sup>
		0.8079	Pred-R <sup>2</sup>
		0.9166	adj-R <sup>2</sup>
3	0.6625		Lack of fit

E/S :B، زمان: A

کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی است و روشی کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی (فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل) می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبزرنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه

شکل ۳، بیانگر بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد بود. طبق داده‌ها با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش غلظت آنزیم، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) کاهش یافت. ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

### ۳-۵- انتخاب تیمار بهینه و اعتبارسنجی مدل

شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار، زمان ۱۰۲ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S بود که با درجه مقبولیت ۰/۸۹/۵ جهت دست‌یابی به بیشینه فعالیت شلاته‌کنندگی آهن (۰/۹۰/۵)، مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۱٪/۵) و آنتی-اکسیدانی کل (۰/۹۷۶) مطابقت داشت. جهت اعتبارسنجی مدل در زمان و نسبت E/S پیشنهادی، مجدداً آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شد و نتایج بیانگر میزان ۰/۸۶/۴ فعالیت شلاته‌کنندگی آهن، ۰/۴۶/۵ مهار رادیکال آزاد DPPH و ۰/۹۱۵ فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. این نتایج حاکی از توانایی خوب مدل در بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئین دانه کدو را نشان می‌دهد.

### ۴- نتیجه‌گیری

نتایج نشان می‌دهد که شرایط بهینه برای دست‌یابی به بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی آهن (۰/۹۵/۵)، مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۱٪/۵) و آنتی‌اکسیدانی کل (۰/۹۷۶)، زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S می‌باشد. نتایج تحقیق حاکی از آن است که پروتئین هیدرولیزشده‌ی دانه کدو با استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است و توانایی بالایی در غنی‌سازی و فرمولاسیون مواد غذایی بمنظور ارتقا سطح سلامت جامعه دارد.

### ۵- منابع

- [1] Korhonen, H., and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(9), 945-960. doi: <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2005.10.012>.  
[2] Li, G.H., Qu, M.R., Wan, J.Z., and You, J.M. 2007. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in

است. یانگ و همکاران (۲۰۲۲) تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پایداری محصولات آنزیمی پروتئین شیر را مورد بررسی قرار دادند و بیان کردند که توان ۳۰۰ وات باعث بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) می‌شود [۳۵]. داروزا و همکاران (۲۰۱۹) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی برگ زیتون با پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت پرداختند و گزارش کردند که بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با پیش‌تیمار مایکروویو در دمای ۸۶ درجه سانتی‌گراد و زمان ۳ دقیقه بدست می‌آید [۳۷]. تفاوت در توان و زمان مورد استفاده در مطالعات مختلف ممکن است با میزان حلالیت مواد پروتئینی، مرتبط باشد [۳۵]. نگوین و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که هیدرولیز آنزیمی به‌همراه پیش-تیمار مایکروویو یک روش مناسب برای تولید هیدرولیزشده‌های پروتئین ماهی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌باشد [۳۸].

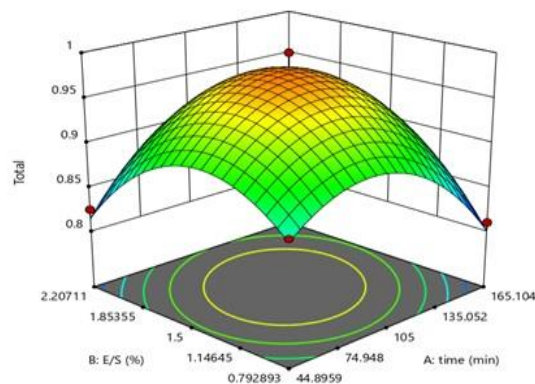


Figure 3: Effect of hydrolysis time and E/S ratio on total antioxidant activity (absorbance at 695 nm) by using microwave pretreatment.

- spontaneously hypertensive rats. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*, 16(S1), 275-280.  
[3] Ohinata, K., Agui, S., and Yoshikawa, M. 2007. Soymorphins, novel  $\mu$  opioid peptides derived from soy  $\beta$ conglycinin  $\beta$ -subunit, have anxiolytic activities. *BioScientific, Biotechnology and Biochemistry*, 71(10):2618-2621. doi: <https://doi.org/10.1271/bbb.70516>.

- [4] Cho, S.-J., Juillerat, M.A., and Lee, C.H. 2008. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(12), 4372-4376. doi: <https://doi.org/10.1021/jf800676a>.
- [5] Kou, X., Gao, J., Xue, Z., Zhang, Z., Wang, H., and Wang, X. 2013. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (*cicer arietinum* L.) albumin hydrolysates. *LWT-Food Science and Technology*, 50(2), 591-598. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2012.08.002>.
- [6] Meisel, H., and FitzGerald, R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins, mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9(16), 1289-1296. doi: <https://doi.org/10.2174/1381612033454847>.
- [7] Fan, S., Hu, Y., Li, C., and Liu, Y. 2014. Optimization of Preparation of Antioxidative Peptides from Pumpkin Seeds Using Response Surface Method. *PLoS ONE* 9(3): e92335. doi:10.1371/journal.pone.0092335.
- [8] Zakeri, K., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M., Moayedi, A., and Maghsodlou, Y. 2019. Optimization of Hydrolysis Condition of Pumpkin Seeds with Alcalase Enzyme to Achieve Maximum Antioxidant and Nitric Oxide Inhibition Activity. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology* 7 (2019) 4, 445-458 Doi: 10.22101/JRIFST.2019.02.23.748.
- [9] Mazloomi-Kiyapey, S.N., Mahoonak, A.S., Ranjbar-Nedamani, E., and Nourmohammadi, E. 2019. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atheroscler* 2019; 15(5): 218-27.
- [10] Lu, D., Peng, M., Yu, M., Jiang, B., Wu, H., and Chen, J. 2021. Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Zinc Binding Capacity and in vitro Gastrointestinal Stability of Peptides Derived From Pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) Seeds. *Front. Nutr.* 8:647782. doi: 10.3389/fnut.2021.647782.
- [12] Noor Mohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A.R., Sadeghi, M., Alami, M., and Ghorbani, M. 2017. Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin, *Food Science and Technology*, 13(12), 135-142.
- [13] Sitohy, M.Z., and El-Sayed, M. 2020. Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2020.109495>.
- [14] Hayta, M., Benli, B., Imen, E., and Kaya, A. 2020. Optimization of antihypertensive and antioxidant hydrolysate extraction from rice bran proteins using ultrasound assisted enzymatic hydrolysis. *J. Food Meas. Charact.* 2020, 14, 2578-2589.
- [15] Yang, X., Li, Y., Li, S., Ren, X., Oladejo, A.O., Lu, F., and Ma, H. 2020. Effects and mechanism of ultrasound pretreatment of protein on the Maillard reaction of protein-hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Ultrason. Sonochem.* 2020, 64, 104964.
- [16] Zhu, W., Yang, W., Ying, B., Li, X., Li, J., and Li, Y. 2019. Optimization of ultra high pressure coupled with enzymatic hydrolysis technology and its effect on the taste of hydrolysate of pollock bone. *Sci. Technol. Food Ind.* 2019, 40, 214-219.
- [17] Irmak, S., Meryemoglu, B., Sandip, A., Subbiah, J., Mitchell, R., and Sarath, G. 2018. Microwave pretreatment effects on switchgrass and miscanthus solubilization in subcritical water and hydrolysate utilization for hydrogen production. *Biomass Bioenerg.* 2018, 108, 48-54.
- [18] Li, M., Xia, S., Zhang, Y., and Li, X. 2018. Optimization of ACE inhibitory peptides from black soybean by microwave-assisted enzymatic method and study on its stability. *LWT* 2018, 98, 358-365.
- [19] Jin, J., Okagu, O.D., and Udenigwe, C.C. 2022. Differential Influence of Microwave and Conventional Thermal Treatments on Digestibility and Molecular Structure of Buckwheat Protein Isolates. *Food Biophys.* 2022, 17, 198-208.
- [20] Hall, F., and Liceaga, A. 2020. Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllobates sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding. *J. Funct. Foods* 2020, 64, 103634.
- [21] Falade, E.O., Mu, T.H., and Zhang, M. 2021. Improvement of ultrasound microwave-assisted enzymatic production and high hydrostatic pressure on emulsifying, rheological and interfacial characteristics of sweet potato protein hydrolysates. *Food Hydrocolloid.* 2021, 117, 106684.
- [22] AOAC, 2000. Official Methods of Analysis. 17th Edition, the Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD, USA. Methods 925.10, 65.17, 974.24, 992.16.

- [23] Gohi, B. F. C. A., Du, J., Zeng, H-Y., Cao, X-j. and Kai Zou, m. 2019. Microwave Pretreatment and Enzymolysis Optimization of the Lotus Seed Protein. <https://doi.org/10.3390/bioengineering6020028>.
- [24] Alvand, M., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H., and kaveh, Sh. (2023). Effect of Enzyme Type and Hydrolysis Time on Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein, *Journal of Innovation in food science and technology*, 15(57), 99-112.
- [25] Kanbargi, K.D., Sonawane, S.K., and Arya, S.S. 2017. Encapsulation characteristics of protein hydrolysate extracted from Ziziphusjube seed, *International Journal of Food Properties*, 20:12, 3215-3224, DOI: 10.1080/10942912.2017.1282516.
- [26] Prieto, P., Pineda, M., and 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(2), 337-341.
- [27] Kaveh, Sh., Sadeghimahoonak, A.R., Ghorbani, M., Jafari, M., and Sarabandi, Kh. 2019. Optimization of Factors Affecting the Antioxidant Activity of Fenugreek Seed's Protein Hydrolysate by Response Surface Methodology, *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(1), 77-88.
- [28] Gohari Ardabili, R.F., and Haddad Khodaparast, M.H. 2011. Chemical Composition and Physicochemical Properties of Pumpkin Seeds (*Cucurbita pepo* Subsp. *pepo* Var. *Styriaca*) Grown in Iran. *J. Agr. Sci. Tech.* (2011) Vol. 13: 1053-1063.
- [29] Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2): 370-376.
- [30] Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry* 109(1): 144-148.
- [31] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., and Jiaping, Lv. 2015. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of functional foods* 18 1138–1146.
- [32] Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljića, N., Jakovetić Tanasković, S., Đukić Vuković, A., Mojović, L., and Knežević-Jugović, Z. 2021. Synergistic Effect of Enzyme Hydrolysis and Microwave Reactor Pretreatment as an Efficient Procedure for Gluten Content Reduction. *Foods*, 10, 2214. <https://doi.org/10.3390/foods10092214>.
- [33] Mehregan Nikoo, A., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M., Taheri, A., Alami, M., and Kamali, F. 2014. Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius*), *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2(4), 351-364. [magiran.com/p1251024](http://magiran.com/p1251024).
- [34] Meshkinfar, N., Mahoonak, A.S., Ziaifar, A.M., Ghorbani, M., and Kashani Nejad, M. 2014. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Tabriz, Journal of Food Researches*. 2014; 24(2): 215-225. [in Persian].
- [35] Yang, X., Ren, X., and Ma, H. 2022. Effect of Microwave Pretreatment on the Antioxidant Activity and Stability of Enzymatic Products from Milk Protein. *Foods* 2022, 11, 1759. <https://doi.org/10.3390/foods11121759>.
- [36] Dong, C., Li, F., Wang, L., Ma, X., Xu, J., and Kong, L. 2015. Microwave pretreatment of sunflower meal protein preparation of antioxidant peptides. *Sci. Technol. Food Ind.* 2015, 36, 308–311.
- [37] da Rosa, G.S., Vanga, S.K., and Garipey, Y. 2019. Comparison of microwave, ultrasonic and conventional techniques for extraction of bioactive compounds from olive leaves (*Olea europaea* L.), *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2019.102234>.
- [38] Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y.H.B., San Martin-Gonzalez, F., and Liceaga, A.M. 2017. Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries Science*, 83, 317–331. <https://doi.org/10.1007/s12562-017-1067-3>.





## Optimizing enzymatic hydrolysis of pumpkin seeds protein (*Cucurbita maxima L.*) by pancreatin with using microwave pretreatment

Zainab Nooshi Manjili <sup>1</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak <sup>\*2</sup>, Vahid Erfani Moghadam <sup>3</sup>, Mohammad Ghorbani <sup>4</sup>, Hoda Shahri Tabarestani <sup>5</sup>

- 1- Ph.D. student of food chemistry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
- 2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
- 3- Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Modern Technologies, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.
- 4- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
- 5- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

### ABSTRACT

The seeds of *Cucurbitaceae* plants (*pumpkin, melon, etc.*) are one of the rich sources of protein. Proteins are one of the most important nutritional sources for humans. Enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein by using microwave pretreatment leads to the production of hydrolyzates with bioactive properties, including antioxidant activity. The use of microwave pretreatment causes changes in the 3D structure of proteins, It opens the 3-dimensional structure of the protein and accelerates the access of the enzyme to the peptide bonds. Therefore, the use of microwave pretreatment is a suitable method to save time and enzyme concentration which are used in enzymatic hydrolysis. In this study, The solution of pumpkin seed protein concentrate was exposed to microwave energy with a power of 450-900 W for 30-90 seconds and it was used as a substrate solution in enzymatic hydrolysis experiments. Enzymatic hydrolysis by pancreatin, with the concentration of 0.5 to 2.5% compared to the protein substrate, was performed in the time from 20 to 190 minutes, at the optimum temperature and pH of pancreatin, in order to produce hydrolysates with antioxidant potential. Antioxidant power was measured by using DPPH radical scavenging activity methods, total antioxidant activity (Absorbance at 695 nm) and iron chelating activity. The highest amount of antioxidant activity by using microwave pretreatment was in 105 minutes and the ratio of 1.5% E/S and the optimal conditions that provided by the software to achieve the maximum iron chelating activity (95.5%), DPPH radical scavenging activity (51.5%) and total antioxidant (Absorbance at 695 nm) (0.976), was in 102 minutes and the ratio of 1.5% E/S of which 89.5% corresponded with the obtained results.

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: 2023/6/19

Accepted: 2023/9/2

#### Keywords:

pancreatin,  
microwave pretreatment,  
pumpkin seeds,  
antioxidant activity

**DOI:** 10.22034/FSCT.20.143.78

**DOR:** 20.1001.1.20088787.1402.20.143.6.8

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