

تعیین شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیز شده با قابلیت آنتی اکسیدانی و کاهندگی نیتریک اکسید از ضایعات گوجه فرنگی توسط آلکالاز

محیا شریعت علوی^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۲، مهران اعلمی^۲،

جلال محمدزاده^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار بخش فنی و مهندسی، مرکز تحقیقات کشاورزی و منابع طبیعی استان گلستان

(تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۲۴ تاریخ پذیرش: ۹۷/۰۶/۰۸)

چکیده

ضایعات گوجه فرنگی می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئینی جدید جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد. رادیکال‌های آزاد از جمله عوامل مهم در ایجاد سرطان و جهش‌های ژنتیکی هستند که به یکی از بزرگترین خطرهای پیش روی بشریت در چند قرن اخیر تبدیل شده‌اند. در این تحقیق شرایط هیدرولیز پروتئین دانه گوجه‌فرنگی (دما، زمان و میزان آنزیم آلکالاز) جهت تولید محصولی با حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی و مهارکنندگی نیتریک اکسید مورد بررسی قرار گرفت. مقادیر بدست آمده توسط نرم افزار Design Expert با استفاده از روش سطح پاسخ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. نتایج این مطالعه نشان داد که با ایجاد شرایط بهینه با استفاده از آنزیم آلکالاز می‌توان به طور قابل توجهی به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و رادیکال نیتریک اکسید در محصول تولیدی دست یافت. نتایج حاکی از آن است که شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و رادیکال نیتریک اکسید، دمای ۵۰ درجه‌ی سانتیگراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و میزان آنزیم ۱/۸۵ درصد برای دانه گوجه فرنگی بود. در این شرایط قابلیت آنتی اکسیدانی و میزان مهار رادیکال نیتریک اکسید به ترتیب ۸۵/۵۳ و ۶۱/۱۷ بود. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از دانه‌ی گوجه‌فرنگی می‌تواند در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان افزودنی طبیعی با قابلیت آنتی اکسیدانی و کاهندگی نیترات و نیز استفاده به عنوان دارو قابلیت کاربرد داشته باشد.

کلید واژگان: آنزیم آلکالاز، پروتئین هیدرولیز شده، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی اکسیدانی، مهارکنندگی نیتریک اکسید

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@gau.ac.ir

۱- مقدمه

آنتی اکسیدان‌ها نقش حیاتی در سیستم‌های غذایی دارند و همچنین در بدن انسان جهت کاهش فرآیندهای اکسیداتیو حائز اهمیت می‌باشند. آنتی اکسیدان‌ها سبب کاهش اکسیداسیون پروتئین و همچنین کاهش واکنش میان کربونیل‌های مشتق شده از لیپیدها با پروتئین‌ها می‌شوند که نتیجه آن تغییر در ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌ها است [۱].

در سال‌های اخیر توجه به استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، پروتئین ماهی و ... شده است [۲]. پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط روش‌های آنزیمی، شیمیایی و یا تخمیری، تولید می‌شوند. در این بین استفاده از آنزیم جهت هیدرولیز منابع پروتئینی، به دلیل شرایط مساعد و مناسب‌تر تولید و فرآورده‌های جانبی کمتر، بیشتر مورد توجه است [۳]. هیدرولیز پروتئین‌ها شامل شکستن آن‌ها به پپتیدهای کوچک‌تر و آمینو اسیدهای آزاد است. آنزیم‌های مورد استفاده برای هیدرولیز پروتئین‌ها ممکن است منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی داشته باشند. از طریق اثر همزمان اندوپپتیدازها و اگزوپروتئازها می‌توان به طور مؤثرتری به پپتیدهایی با درجه هیدرولیز بالا و ویژگی مورد نظر رسید [۴]. درمقایسه با آنزیم‌های با منشأ گیاهی و جانوری، آنزیم‌های میکروبی دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به تنوع خواص پروتئولیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف اشاره نمود [۵]. به طور کلی آنزیم آلکالاز به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه‌ی هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره‌ی پپتیدی کوتاه‌تر، بیش‌ترین توجه را به خود اختصاص داده است [۶]. این ترکیبات هیدرولیز شده در تغذیه بیماران خاص مانند افراد مبتلا به فیل کتونوری، حساسیت غذایی و بیماری‌های کبدی، تغذیه سالمندان، رژیم غذایی ورزشکاران و رژیم‌های غذایی برای کنترل وزن به کار می‌روند. علاوه بر ارزش غذایی، پروتئین‌های هیدرولیز شده واجد ویژگی‌های بیولوژیک متعدد مانند خاصیت ضد اکسایشی [۷]، مهارکنندگی نیتریک اکسید [۸]، ضد میکروبی [۹]، ضد فشار خون [۱۰]، ضد سرطان [۱۱] و کنترل کننده‌ی فعالیت سیستم ایمنی بدن [۱۲] نیز می‌باشند.

گوجه‌فرنگی و محصولات تبدیلی آن یکی از مهمترین تولیدات صنایع تبدیلی در جهان می‌باشند به طوری که سالانه حدود ۳۵-۳۱ میلیون تن گوجه‌فرنگی تازه در کارخانجات فراوری می‌گردد. از این مقدار گوجه‌فرنگی تولیدی حدود ۴/۷٪ به ایران اختصاص دارد. تفاله گوجه‌فرنگی محصول فرعی کارخانجات رب گوجه‌فرنگی و سس گوجه‌فرنگی می‌باشد. در ایران سالانه حدود ۸۱۰۰ تن تفاله گوجه‌فرنگی مرطوب توسط کارخانجات ایجاد می‌شود که در بسیاری از مواقع بدون در نظر گرفتن موارد کاربردی از زنجیره مصرف حذف می‌گردند [۱۳]. جزء اصلی تفاله‌ی گوجه‌فرنگی دانه‌های آن می‌باشد که ۵۰-۲۰ گرم بر کیلوگرم وزن اولیه گوجه‌فرنگی را شامل می‌شود. دانه‌ی گوجه‌فرنگی حدوداً شامل ۲۰ درصد پروتئین و ۲۸ درصد روغن بوده بنابراین منبع بسیار خوبی برای روغن‌های خوراکی و پروتئین می‌باشد [۱۴]. از این رو با توجه به مقدار پروتئین مناسب و ارزش تغذیه‌ای بالا می‌توان از ضایعات گوجه‌فرنگی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص بیولوژیکی مناسب استفاده کرد. پیاکینا و همکاران (۱۹۹۸)، بازده کل پروتئین آرد دانه گوجه‌فرنگی را ۳۹/۴ درصد و میزان پروتئین قابل استخراج را ۳۴ درصد و بازده پروتئین استخراج شده در نقطه ایزوالکتریک را حدود ۱۶ درصد گزارش نمودند [۱۵]. لیاداکس و همکاران (۱۹۹۸) با روش رسوب پروتئین در نقطه ایزوالکتریک و با استفاده از نمک، پروتئین دانه گوجه‌فرنگی را با بازده ۳۱/۳ درصد استخراج نمودند. همچنین بیشترین میزان استخراج پروتئین را در بالاترین غلظت نمک و کمترین میزان pH به دست آوردند [۱۶]. مؤیدی و همکاران (۲۰۱۶) اثر آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از دانه‌ی گوجه‌فرنگی را مورد بررسی قرار دادند. در این تحقیق جهت هیدرولیز از تخمیر میکروبی به جای آنزیم استفاده شد. نتایج نشان‌دهنده قابلیت بالای پروتئین‌های هیدرولیز شده در ممانعت از اکسیداسیون و افزایش پایداری اکسیداتیو بود [۱۷]. امیری و همکاران (۲۰۱۵) با استفاده از روش‌های قلیایی و آنزیمی پروتئین دانه گوجه‌فرنگی را استخراج کردند. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به صورت معنی‌داری از لحاظ راندمان استخراج پروتئین (۷۸/۸ درصد) بالاتر از سایر پروتئین‌های استحصال شده بود [۱۸]. بهینه‌سازی فرآیندهای شیمیایی از طریق به کارگیری روش‌های آماری چند متغیری،

سپس سوسپانسیون حاصل با دور ۲۶۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی گراد، با استفاده از سانتریفیوژ یخچال-دار سانتریفیوژ گردید. سپس مایع رویی جمع‌آوری و جهت ترسیب پروتئین pH آن توسط اسیدکلریدریک در محدوده‌ی اسیدی تنظیم (pH=4) و به مدت ۲۵ دقیقه با دور ۲۶۰۰ g سانتریفیوژ شد و پروتئین ترسیب یافته پس از جداسازی، توسط خشک کن انجمادی خشک گردید و سرانجام پودر تولیدی در یخچال نگهداری شد [۲۲].

۲-۴- هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه

گوجه‌فرنگی

به این منظور کنسانتره‌ی پروتئینی به‌دست آمده، به نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر پتاسیم فسفات با pH برابر با ۸ (حد ایتیم برای آنزیم الکالاز) پراکنده و آنزیم در غلظت ۱٪ تا ۲٪ افزوده شد. سپس هیدرولیز در محدوده دمایی و زمانی ۵۵-۴۵ درجه سانتی گراد و ۵-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار با دور ۲۰۰ rpm به انجام رسید. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفیوژ کردن برای حذف ترکیبات اضافه در ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت [۲۳].

۲-۵- بررسی خصوصیات شیمیایی دانه

گوجه‌فرنگی

اندازه‌گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین به ترتیب توسط روش‌های AACC ۴۴-۱۵، ۰۸-۰۱ و ۶۶-۱۲ (۲۱) و اندازه‌گیری چربی کنجاله به روش سوکسله [۲۳] انجام گرفت.

۲-۶- اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به روش ستیول و همکاران اندازه‌گیری شد [۲۴]. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۷۵۰ دور بر دقیقه طی ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان درجه هیدرولیز (DH) با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد.

$100 \times$ (کل نیتروژن در نمونه‌ی هیدرولیز شده / نیتروژن محلول در TCA ۱۰٪) = درجه هیدرولیز٪

صورت می‌پذیرد که رایج ترین روش چند متغیری برای این منظور روش سطح پاسخ می‌باشد [۱۹]. روش سطح پاسخ، روشی مفید است که جهت بهینه‌سازی فرآیندهای غذایی به کار گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید، به علاوه این روش می‌تواند مدل رگرسیونی که دقیقاً کل فرآیند را توصیف می‌کند را ایجاد نماید [۲۰]. تاکنون تحقیقی بر روی خصوصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و بازدارندگی نیتریک‌اکسید پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از دانه گوجه‌فرنگی صورت نگرفته است، لذا در این تحقیق تلاش شده است شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین موجود در ضایعات گوجه‌فرنگی با استفاده از آنزیم الکالاز به منظور دستیابی به حداکثر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و کاهش رادیکال نیتریک‌اکسید مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه مواد اولیه

تفاله گوجه‌فرنگی حاصل از فرآیند تهیه‌ی رب، از از کارخانه‌ی رب گوجه‌فرنگی زشک مشهد تهیه گردید. آنزیم الکالاز و رادیکال DPPH از شرکت سیگما و سود، اسید کلریدریک و اتانول از شرکت مرک تهیه شدند. تمام مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- روغن‌گیری از دانه گوجه‌فرنگی

ابتدا پوست و مقادیر باقی مانده‌ی پالپ از تفاله گوجه‌فرنگی جدا شد سپس بذر گوجه‌فرنگی پس از خشک کردن در برابر تابش نور آفتاب توسط دستگاه آسیاب به آرد تبدیل شد. آرد حاصل به مدت ۱۶ ساعت با حلال هگزان به نسبت ۱:۵ چربی‌گیری، و پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط برای خروج کامل بقایای حلال، به یخچال منتقل شد [۲۱].

۲-۳- استخراج پروتئین دانه گوجه‌فرنگی

پودر چربی‌گیری‌شده به دست آمده با روش فوق با آب دیونیزه به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) مخلوط شد، pH مخلوط در محدوده حداکثر حلالیت پروتئین (pH=11.5) تنظیم گردید و به مخلوط حاصل مدت ۳۰ دقیقه همزده شد،

۷-۲- اندازه‌گیری ترکیب اسیدهای آمینه

نمونه‌ی هیدرولیز‌شده

ابتدا نمونه توسط اسید کلریدریک ۶ نرمال هیدرولیز و پس از مشتق سازی، میزان اسیدهای آمینه توسط HPLC فاز معکوس نوع واترز در سازمان انرژی اتمی کشور در تهران تعیین گردید. نوع ستون مورد استفاده شده C-18 و فاز متحرک دستگاه ترکیبی از محلول A (بافراستات سدیم) و محلول B (آب و استونیتریل) و میزان جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه بود. اسیدهای آمینه در دمای ۳۸ درجه سانتی‌گراد با استفاده از دکتور UV در طول موج ۲۵۸ نانومتر اندازه‌گیری شدند [۲۵].

۸-۲- اندازه‌گیری فعالیت مهار کنندگی

رادیکال DPPH

برای بررسی قدرت مهار رادیکال DPPH، ۱۰۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶ درصد مخلوط شد، مخلوط حاصل به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱]. در نمونه کنترل به جای نمونه پروتئین هیدرولیز شده از اتانول استفاده شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

رادیکال %

۹-۲- اندازه‌گیری فعالیت مهار کنندگی

رادیکال نیتریک اکسید

برای انجام این آزمایش ۶۰ میکرولیتر سدیم‌نیترو پروسید در بافر فسفات‌سالیین با ۶۰ میکرولیتر نمونه موردنظر مخلوط شد سپس در ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن حجم برابر (۱۲۰ میکرولیتر) از معرف گریس (Griess reagent) اضافه شد و در ۵۴۶ نانومتر جذب این محلول اندازه‌گیری شد [۲۶]. درصد مهار از فرمول زیر بدست آمد:

$$\text{درصد مهار} = \frac{A_{\text{Blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{sample}}} \times 100$$

1. Response Surface Method
2. Central Composite Designs
3. Linear Effects
4. Quadratic Effects
5. Interaction Effects

۱۰-۲- بهینه سازی فرایند جهت دستیابی به

تیمار با بیش‌ترین قدرت آنتی‌اکسیدانی

به منظور بهینه سازی فرایند از نظر خواص ضد اکسایش از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ^۱ با طرح مرکب مرکزی^۲ برای سه متغیر مستقل زمان هیدرولیز (X_1)، دما (X_2) و غلظت آنزیم (X_3) در سه سطح (+۱، ۰، -۱) استفاده شد. پاسخ مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و نیتریک‌اکسید بود. به این منظور ۱۵ تیمار تصادفی توسط نرم افزار پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است. مدل رگرسیونی به منظور پیش بینی پاسخ مد نظر به صورت معادله زیر ارائه شد:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{11}X_1^2 + b_{22}X_2^2 + b_{33}X_3^2$$

Y پاسخ یا متغیر وابسته (فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و رادیکال نیتریک‌اکسید)، b_0 مقدار ثابت، b_1 ، b_2 و b_3 اثرات خطی^۳، b_{11} ، b_{22} و b_{33} اثرات درجه دوم^۴ و b_{12} ، b_{13} و b_{23} اثرات متقابل^۵ می‌باشند. X_1 ، X_2 و X_3 نیز متغیرهای مستقل را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی به تعیین معنی داری آزمون های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسط نرم افزار Design Expert صورت پذیرفت.

Table 1 Independent variables and levels used to optimize degree of hydrolysis of Tomato seed protein hydrolysate

Levels			independent variables
-1	0	+1	
1	2	3	Enzyme ratio to (%) substrate
35	45	55	(° C) Temperature
30	150	270	(min) Time

۳- نتایج و بحث

۱-۳- ویژگی‌های شیمیایی دانه گوجه‌فرنگی

پروتئین آرد روغن‌گیری شده $34/07$ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج حاصل، با اعمال فرایند روغن‌گیری، میزان پروتئین بیشتری به‌دست آمد. کارلسون و همکاران میزان پروتئین آرد کامل دانه‌ی گوجه‌فرنگی را $33/9$ درصد و میزان چربی را 29 درصد گزارش کردند که این میزان با محتوی پروتئینی نمونه‌ی مورد آزمایش در این تحقیق متفاوت بود [27]. این تفاوت می‌تواند به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرایند باشد.

خصوصیات شیمیایی آرد دانه گوجه‌فرنگی در جدول ۲ آورده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت دانه‌ی گوجه‌فرنگی روغن‌گیری شده حدوداً $5/7$ درصد بود. این مقدار کمتر از مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشد [14]. میزان چربی دانه‌ی گوجه‌فرنگی روغن‌گیری شده $9/95$ درصد به‌دست آمد. مقادیر چربی و خاکستر که بر اساس وزن خشک گزارش شده‌است، مشابه با مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشد [14]. میزان پروتئین آرد کامل $25/74$ درصد و میزان

Table 2 Chemical properties of tomato seeds

(%)Moisture	(%) Oil	(%)Ash	(%)Protein	Sample
6.23 ± 0.35	26 ± 0.17	5.23 ± 0.2	27.25 ± 0.14	whole
5.7 ± 0.04	9.95 ± 0.2	3.7 ± 0.5	34.07 ± 0.03	de-oiled

*All data were expressed as a mean of 3 replications $\pm$ standard deviations.

* The meanings of the same letters in each column indicate no significant difference at the level of ($P < 0.05$).

مطالعات خود بر ماهی خاویاری، بالاترین میزان درجه هیدرولیز را در زمان ۲۰۵ دقیقه $46/13$ درصد گزارش کردند (Souissi, 2007) و همکاران (2007) نیز اثر آنزیم آلکالاز را بر درجه هیدرولیز پروتئین‌های امعاء و احشاء ماهی ساردین مورد بررسی قرار دادند و بیشترین میزان درجه هیدرولیز را در زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده نمودند [30].

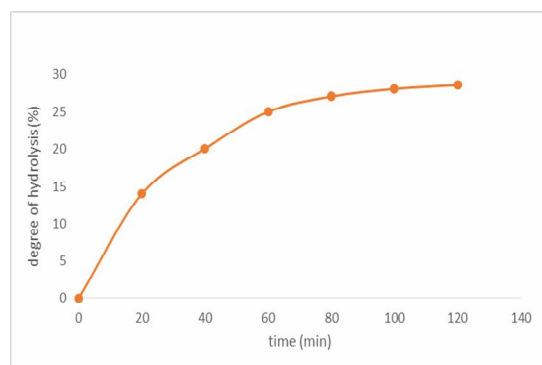


Fig 1 The effect of reaction time on the degree of hydrolysis

۳-۳- ترکیبات اسید آمینه نمونه‌ی هیدرولیز شده‌ی دانه گوجه‌فرنگی

در جدول (۳) مقادیر به‌دست آمده از اسیدآمینه بر حسب گرم اسیدآمینه، در ۱۰۰ گرم پروتئین بیان شده است. با آنالیز پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه گوجه‌فرنگی، ۱۸ نوع اسیدآمینه مشاهده گردید. پروتئین دانه گوجه‌فرنگی ترکیبی مناسب از اسیدهای آمینه ضروری و غیر ضروری می‌باشد. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌گردد، گلوتامیک اسید و به دنبال آن

۳-۲- درجه هیدرولیز

نتایج مربوط به تغییرات درجه هیدرولیز در طول زمان واکنش در شکل ۱ ارائه شده است. نتایج نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند. این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می‌شود، به‌طوری که بیشترین میزان هیدرولیزاسیون در ۶۰ دقیقه اول رخ داده است. همان‌طور که مشاهده می‌گردد بالاترین درجه هیدرولیز در دقیقه‌ی ۱۰۰ و معادل ۲۸ درصد است و پس از آن درجه هیدرولیز ثابت می‌شود. بر اساس نتایج بدست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز، واکنش هیدرولیز آنزیمی با یک فاز سریع آغاز می‌شود و طی این مرحله تعداد زیادی از باندهای پپتیدی شکسته می‌شود [28]. در ادامه واکنش نرخ رشد هیدرولیز کاهش پیدا می‌کند و با طولانی‌تر شدن زمان، درجه هیدرولیز کاهش می‌یابد و وارد مرحله فاز سکون می‌شود. علت این حالت را می‌توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان آبکافت، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می‌کند، در واقع سرعت بالای مرحله اول مربوط به شکست آسان پیوند پپتیدی است و در مرحله دوم سرعت واکنش به علت دشواری هیدرولیز باندهای پپتیدی فشرده‌تر کاهش می‌یابد، همچنین از میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم کاسته می‌شود. از طرف دیگر، اکسیداسیون چربی‌ها یا ناخالصی‌های غیرپروتئینی و شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت‌کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر موثر باشد [28]. اوویسی‌پور و همکاران (2009) در

نتایج به دست آمده مشابه نتایج گد و همکاران (۱۹۶۸) بود [۳۱]. همچنین ترکیب آمینواسیدی به دست آمده با نتایج گزارش شده توسط لیچ و همکاران (۱۹۶۹) تطابق داشت (۳۲). پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه گوجه‌فرنگی حاوی ۴/۲۳ درصد لیزین می‌باشد از این رو به دلیل کمبود اسید آمینه لیزین در آرد غلات و به خصوص گندم می‌توان با جایگزینی هیدرولیز شده‌ی دانه گوجه‌فرنگی کیفیت تغذیه‌ای و ارزش بیولوژیکی نودل و نان را افزایش داد [۸]. مشخص شده است که وجود برخی اسیدهای آمینه نظیر ترپتوفان، هیستیدین، متیونین، سیستئین، گلیسین و آلانین در پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه گوجه‌فرنگی می‌تواند در فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن موثر باشد [۳۳]. همچنین علاوه بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ی هیدرولیز شده‌ی دانه‌ی گوجه‌فرنگی، وجود ویژگی‌های ضد سرطانی و سلامتی‌بخش نیز برای آن گزارش شده است [۳۴].

۳-۴- آنالیز سطح پاسخ

با توجه به نقاط تعریف شده توسط RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و نیتریک‌اکسید مربوط به هر تیمار در جدول ۴ نشان داده شده است.

آسپارتیک اسید بیشترین میزان اسید آمینه غیرضروری و متیونین و به دنبال آن ترپتوفان کم‌ترین میزان اسید آمینه ضروری در نمونه‌ی هیدرولیز شده‌ی گوجه‌فرنگی بودند.

Table 3 Amino acid content of tomato seeds g/100g of protein

Amino acids	Seeds
Lysine*	4.23 ± 0.18
Histidine	2.12 ± 0.09
Arginine	8.24 ± 0.19
Aspartic acid	10.04 ± 0.22
Threonine*	2.97 ± 0.07
Serine	4.56 ± 0.3
Glutamic acid	18.35 ± 0.42
Proline	5.06 ± 0.12
Glycine	4.87 ± 0.22
Alanine	3.27 ± 0.15
Cysteine	0.48 ± 0.04
Valine*	3.69 ± 0.13
Methionine*	0.56 ± 0.05
Isoleucine*	3.62 ± 0.09
Leucine*	6.04 ± 0.16
Tyrosine	3.97 ± 0.13
Phenyl alanine*	3.46 ± 0.08
Tryptophan*	1.08 ± 0.04

*Essential amino acid

All data were expressed as a mean of 2 replications

*± standard deviations.

Table 4 Experiments set up for antioxidant activity (DPPH free radical scavenging) and Nitric oxide reducing power in the Central composite design

Nitric oxide Reducing power (%)	DPPH free radical scavenging activity (%)	Enzyme to substrate ratio (%)	Temperature (°C)	Time (min)	Treatment
68.13	55.40	1.5	40	210	1
59.84	84.50	1.5	50	210	2
61.74	65.08	2	45	270	3
64.42	79.01	2.5	50	210	4
59.49	40.66	1.5	40	90	5
58.54	52.90	2	35	150	6
62.08	69.95	2	55	150	7
54.23	36.28	2.5	40	210	8
52.33	55.02	2.5	40	90	9
45.85	34.79	1.5	50	90	10
44.55	35.47	3	45	150	11
53.36	75.01	2.5	50	90	12
44.30	57.21	2	45	30	13
53.28	51.46	1	45	150	14
45.33	73.45	2	45	150	15

Table 5 Regression coefficients of estimated model by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in DPPH free radical scavenging activity

Variable model	Coefficient
Intercept	71.42
X ₁ -time	4.09
X ₂ -tem	7.50
X ₃ -c/s	-0.12
X ₁ X ₂	7.21
X ₁ X ₃	-9.90
X ₂ X ₃	4.93
X ₁ ²	-2.82
X ₂ ²	-2.85
X ₃ ²	-7.24

۳-۵-۱- اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت مهار

رادیکال آزاد DPPH

در این قسمت به بررسی تاثیر دما، زمان هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم بر قدرت مهارکنندگی رادیکالهای آزاد DPPH پرداخته شد. از این رو با استفاده از نمودارهای سه بعدی خروجی از نرم افزار Design Expert، تاثیر متقابل پارامترهای مذکور بر خاصیت قدرت آنتی اکسیدانی مورد بررسی و تفسیر واقع گردید و نتایج حاصله با نتایج مطالعات پیشین مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. با توجه به شکل 2a مشاهده می شود در غلظت های آنزیمی پایین با افزایش زمان هیدرولیز میزان خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH افزایش یافته است، اما در غلظت های بالا عکس این اتفاق رخ داده است و روند کاهشی را دنبال می کند. به گونه ای که در غلظت های آنزیمی بالا با افزایش زمان هیدرولیز خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH کاهش یافته است. افزایش غلظت آنزیم در زمان های ابتدایی هیدرولیز (کمتر از ۱۰۰ دقیقه) باعث افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و در زمان های هیدرولیز بالا (بیش از ۱۵۰ دقیقه) باعث کاهش این خاصیت شده است. همانطور که شکل 2a نشان می دهد در زمان های میانی (بین ۱۰۰ تا ۱۵۰ دقیقه) تغییرات غلظت آنزیم آلکالاز، تاثیر چندانی بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نداشته است.

۳-۵-۲- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

معادله زیر با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی داری ضرایب (جدول ۵) برای پاسخ مدنظر (خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH) ارائه شد:

$$-71.43 + 4.09(X_1) + 7.5(X_2) - 0.12(X_3) + 7.21(X_1X_2) - 9.90(X_1X_3) + 4.93(X_2X_3) - 2.82X_1^2 - 2.75X_2^2 - 7.24X_3^2$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می باشد. ضرایب تعیین واقعی و تعیین تعدیل شده^۱ و عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش بینی پاسخ ها به کار می رود. ضریب تعیین یا R² معیاری است برای اینکه مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و هرچه مقدار آن به ۱ نزدیک تر باشد مدل بهتر می تواند پاسخ را پیش بینی کند [۳۵]. در این مطالعه میزان ضریب تعیین و ضریب تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۸۶۲۷ و ۰/۶۱۵۵ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده ها بود. ضریب تعیین برابر ۰/۸۶۲۷ نشان دهنده این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۸۶ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

با توجه به جدول ۶، مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که برای $P > 0.05$ معنی دار نبود. از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی دار نبود ($P > 0.05$) مدل بر اساس مهار رادیکال های آزاد DPPH برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۳۶]. بنابراین این مدل جهت پیش بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

1. R Square

2. Adjusted R Square

Table 6 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for DPPH free radical scavenging activity

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P
Model	9	325.14	361.13	3.49	0.0911
A-time	1	276.81	276.81	2.59	0.1686
B-tem	1	900.75	900.75	8.70	0.0319
C-e/s	1	0.25	0.25	2.413	0.9672
AB	1	416.36	416.36	4.02	0.1012
AC	1	784.09	784.09	7.58	0.0402
BC	1	194.79	194.79	1.81	0.2284
A ²	1	88.22	88.22	0.85	0.3982
B ²	1	83.88	83.88	0.81	0.4092
C ²	1	580.81	580.81	5.61	0.0640

(۶۷٪) مربوط به هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پیپسین پس از ۶۰ دقیقه هیدرولیز بود [۳۸]. باتوجه به آنچه در شکل 2b قابل مشاهده است، در دماهای پایین با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت ضد اکسایشی در ابتدا با شیب بسیار ملایم افزایش یافته و از زمان هیدرولیز حدود ۱۵۰ دقیقه به بعد شروع به کاهش نمود. تغییرات پارامتر مذکور نسبت به زمان در دماهای بالاتر کاملاً صعودی بوده و با افزایش زمان هیدرولیز، افزایش فعالیت ضد اکسایش به وضوح قابل مشاهده است. با توجه به آنچه از نمودار قابل استنباط است تأثیرات تغییرات دما بر قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نیز، رویه‌ای مشابه تغییرات زمان را دنبال می‌کند. بدین ترتیب که در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز (بازه زمانی هیدرولیز کمتر از ۱۱۰ دقیقه) با افزایش دما خاصیت ضد اکسایش، به صورت سهمی وار ابتدا روند افزایشی و در ادامه (از دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) روندی کاهشی را دنبال می‌کند. باتوجه به شکل 2b اگر بخواهیم تأثیر هم‌زمان دو پارامتر دما و زمان بر مهار رادیکال‌های آزاد را مورد بررسی قرار دهیم، می‌توان این نتیجه را گرفت که این دو پارامتر در تقابل با یکدیگر اثر فزاینده‌ای در قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشت. بیشترین مقدار قدرت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمان هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه اتفاق افتاد، که این میزان قدرت مهار ۸۴٫۵۱ درصد از رادیکال‌های DPPH را نشان داد. توجه تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی با گذشت زمان در اثر تغییر طول زنجیره‌های پپتیدی حاصل با افزایش هیدرولیز می‌باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر از خود نشان می‌دهند [۳۹]. جامدار و همکاران با بررسی اثر

در تأثیر هم‌زمان دو عامل غلظت آنزیم آلکالاز و زمان بر خاصیت مهارکنندگی مشاهده می‌گردد که افزایش این دو پارامتر در ابتدا رابطه مستقیم با افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH داشته، سپس این رابطه عکس شده است. بدین ترتیب که بیشترین مقدار خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به میزان ۷۷ درصد، در زمان ۲۱۰ دقیقه و نسبت غلظت آنزیم مصرفی ۱/۵ درصد اتفاق افتاد. تغییر در اندازه، میزان و ساختار آمینو اسیدها و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۸]. حسینی و همکاران تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بافت از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ را مورد بررسی قرار دادند. این تحقیق که در حضور آنزیم‌های آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بعد از زمان ۲ و ۴ ساعت انجام‌گرفت نشان داد که میزان پروتئین تولیدشده و درجه هیدرولیز آنزیم آلکالاز به طور معنی‌داری بیشتر از آنزیم داخلی بود. نتایج حاکی از آن بود که با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش و شدت و نرخ هیدرولیز کاهش می‌یابد، به طوری که بیشترین میزان هیدرولیز در ۱۲۰ دقیقه اول رخ می‌دهد (۳۷). کاهش قدرت مهار رادیکال با افزایش زمان هیدرولیز را می‌توان به اثر آنزیم بر پپتیدهای ضد اکسایش مرتبط دانست. به این صورت که با پیش رفتن هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم، احتمال شکستن برخی از پپتیدهای ضد اکسایش تولیدشده در مراحل اولیه هیدرولیز افزایش می‌یابد [۳۶]. در تحقیقی که توسط سون و همکاران بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای حاصل از هیدرولیز هموگلوبین خوک توسط فلیورزایم، پاپائین، آلکالاز، پیپسین و تریپسین انجام گرفت، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH

غلظت آنزیمی بین ۱/۷۵ تا ۲ درصد اتفاق افتاد. غلظت آنزیم بهینه جهت حداکثر نمودن خاصیت ضد اکسایش در دماهای پایین نزدیکتر به ۱/۷ درصد و در دماهای بالا نزدیک به ۲ درصد است. شکل 1c در شرایط بهینه تاثیر همزمان دو پارامتر دما و نسبت غلظت آنزیمی، مهار حدود ۷۷ درصدی رادیکالهای آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

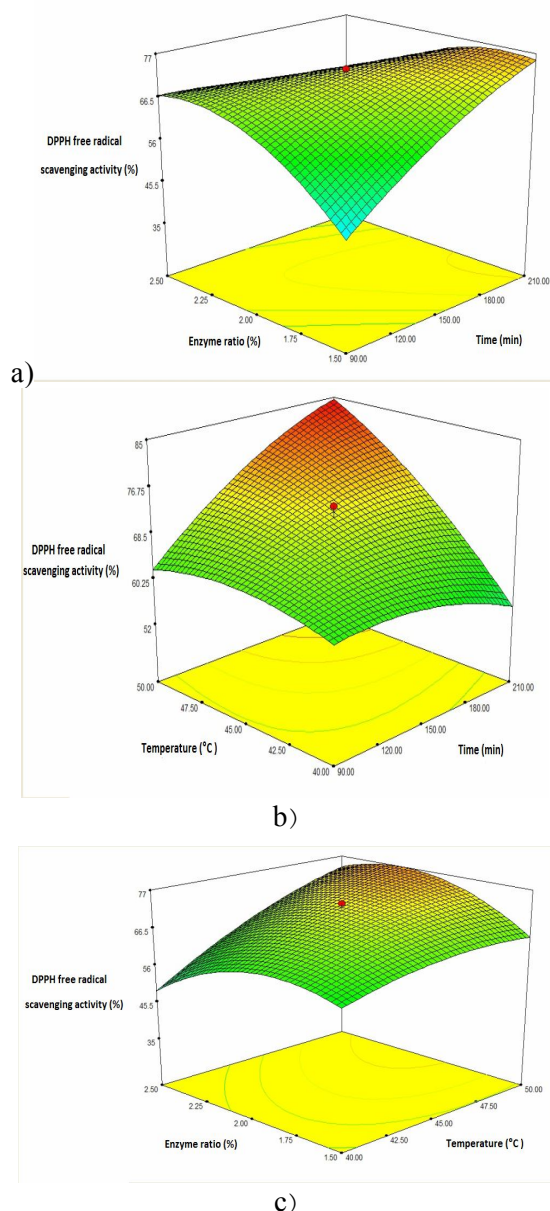


Fig 2 Contour plots for the effect of variables on DPPH free radical scavenging activity (%) as a function of different hydrolyzing conditions: time (min) and enzyme ratio (%) (a). time (min) and temperature (°C) (b). Enzyme ratio (%) and temperature (°C) (c).

درجه‌ی هیدرولیز بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین هیدرولیز شده‌ی بادام دریافتند که با افزایش درجه‌ی هیدرولیز پروتئین‌ها (از ۱۰ تا ۲۰ درصد) توسط آنزیم آلکالاز فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH افزایش می‌یابد [۲۴]. طاهری و همکاران با بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی ساردین رنگین کمان نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا زمانی که زمان، دما و نسبت آنزیم به سوپسترا به نقطه اپتیمم خود می‌رسد افزایش یافته، سپس با افزایش بیشتر زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا، کاهش می‌یابد که این امر به دلیل اثر زمان و دما بر روی فعالیت آنزیمی می‌باشد [۳۵].

اعتقاد بر این است که تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به باز شدن ساختار و معرض‌گیری گروه‌های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند خواهد شد [۳۸]. این موضوع به اثبات رسیده است که رابطه مستقیمی میان قدرت مهار رادیکال و قابلیت هیدروژن دهنده‌ی آمینواسیدها وجود دارد. تغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر بسزایی در قدرت ضد اکسایش دارد. پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضد اکسایش قوی‌تری هستند [۴۰]. این ویژگی می‌تواند توجیه کننده فعالیت ضد اکسایش پپتیدهای تولید شده پس از ۵ ساعت هیدرولیز باشد. ویرافان و همکاران پس از اعلام کردند که الزاما رابطه مستقیمی میان درجه هیدرولیز و قدرت ضد اکسایش پپتیدهای تولیدی وجود ندارد. بنابر گزارش این محققین، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ دارای بالاترین قدرت ضد اکسایش بودند، در حالی که پپتیدهای تولیدی توسط آلکالاز و تریپسین به ترتیب با درجات هیدرولیز ۲۷٪ و ۱۱٪ دارای اثر قابل مقایسه و کمتر از هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین بودند [۴۱]. باتوجه به آنچه در شکل شماره 2c مشخص است، افزایش دما باعث افزایش خاصیت مهارکنندگی در تمامی غلظت‌های آنزیم شده است. اما رابطه بین خاصیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH و غلظت آنزیمی به صورت سهمی وار بود. به این صورت که با افزایش نسبت غلظت آنزیمی، خاصیت مهارکنندگی ابتدا افزایش سپس با شیبی نسبتا ملایم کاهش می‌یابد. باتوجه به شکل 2c حداکثر میزان خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در دمای ۵۰ درجه و نسبت

گرفته شده می‌باشد. برازش مناسب نشان‌دهنده این است که مدل ارائه شده توانائی توضیح در تغییرات داده‌ها را دارد [۴۱].

Table 7 Regression coefficients of estimated model by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in Nitric oxide reducing power

Variable model	Coefficient
Intercept	50.06
X ₁ -time	4.40
X ₂ -tem	-0.23
X ₃ -c/s	-1.65
X ₁ X ₂	1.81
X ₁ X ₃	-1.21
X ₂ X ₃	4.15
X ₁ ²	1.33
X ₂ ²	3.16
X ₃ ²	0.31

۳-۶- قدرت کاهندگی رادیکال نیتریک‌اکسید

با توجه به جدول ۷، آنالیز سطح پاسخ نشان داد که رابطه قدرت کاهندگی نیتریک‌اکسید با پارامترهای واکنش به صورت معادله زیر می‌باشد:

$$= 50.06 + 4.40 (X_1) - 0.23 (X_2) - 1.65 (X_3) + 1.81 (X_1 X_2) - 1.21 (X_1 X_3) + 4.15 (X_2 X_3) + 1.33 X_1^2 + 3.16 X_2^2 + 0.31 X_3^2$$

ضرایب تعیین و تعیین تعدیل شده برای مدل ارائه شده به ترتیب برابر با ۰/۸۴۷۱ و ۰/۷۷۲۰ بود. بالا بودن این ضرایب تعیین نشان‌دهنده توزیع و پراکندگی مناسب داده‌ها بوده است به این معنی که مدل توانسته است ۸۴/۷۱ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند. بالاتر بودن میزان عدم برازش از سطح احتمال معنی‌داری (۰/۰۵) یا به عبارت دیگر بی معنی بودن این فاکتور نشان‌دهنده مناسب بودن مدل پیشنهاد شده و برازش مدل بر اساس پاسخ‌های در نظر

Table 8 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for Nitric oxide reducing power

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	F value	P
Model	9	700.36	77.82	3.08	0.1142
A-time	1	310.34	310.34	12.28	0.0172
B-tem	1	0.82	0.82	0.033	0.8640
C-c/s	1	43.64	43.64	1.73	0.2459
AB	1	26.31	26.31	1.04	0.3544
AC	1	11.69	11.69	0.46	0.5266
BC	1	137.45	137.45	5.44	0.0670
A ²	1	19.63	19.63	0.78	0.4185
B ²	1	110.30	110.30	4.36	0.0910
C ²	1	1.04	1.04	0.041	0.8475

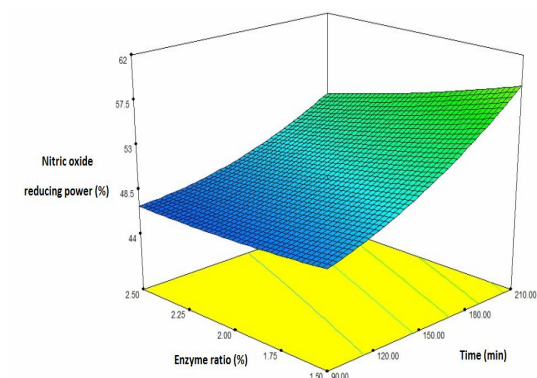
می‌شود که در تمامی غلظت‌ها با افزایش زمان هیدرولیز قدرت کاهندگی رادیکال نیتریک‌اکسید نیز افزایش می‌یابد. در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز، تغییرات غلظت آنزیم آلکالاز تاثیر چندانی بر قدرت کاهندگی رادیکال مذکور نداشت، اما با افزایش زمان هیدرولیز همانطور که در شکل شماره 3a مشخص است، با افزایش غلظت آنزیم کاهندگی رادیکال نیتریک‌اکسید کاهش می‌یابد. بالاترین درصد کاهندگی رادیکال در این قسمت در زمان هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه و نسبت غلظت آنزیم مصرفی ۱/۵ درصد اتفاق افتاده است. در شکل 3b مشاهده می‌شود که با گذشت زمان در تمامی دماها قابلیت

۳-۶-۱- اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت

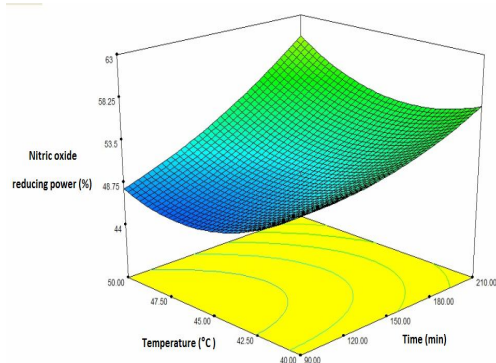
کاهندگی رادیکال نیتریک‌اکسید

در این قسمت، همانند بخش قبل به بررسی تاثیر دما، زمان هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم بر قابلیت کاهندگی رادیکال نیتریک‌اکسید پرداخته شد از این رو به همان ترتیب که قبلاً گفته شد، با استفاده از نمودارهای سه بعدی خروجی از نرم افزار Design Expert، تاثیر متقابل پارامترهای مذکور بر خاصیت قدرت مهارکنندگی رادیکال نیتریک‌اکسید مورد بررسی و تفسیر قرار گرفت. در بررسی تاثیرات همزمان غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز، با توجه به شکل شماره 3a مشاهده

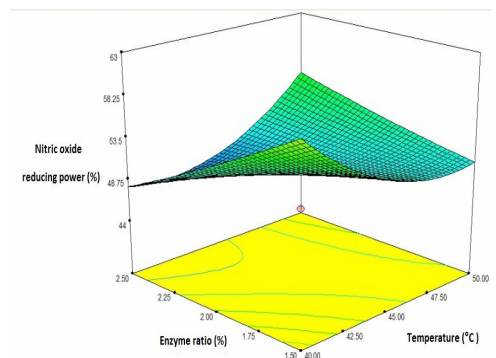
یک رفتار وابسته به دوز از خود نشان داد [۴۲]. مناگا و همکاران فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد نیتریک اکسید عصاره‌ی متانولی نوعی قارچ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاکی از آن بود که عصاره اثر قابل توجهی در بازدارندگی رادیکال نیتریک اکسید (۸۱/۸ درصد) از خود نشان می‌دهد [۴۳].



a)



b)



c)

Fig 3. Contour plots for the effect of variables on Nitric oxide reducing power (%) as a function of different hydrolyzing conditions: time (min) and enzyme ratio (%) (a). time (min) and temperature (°C) (b). Enzyme ratio (%) and temperature (°C) (c).

کاهندگی رادیکال آزاد نیتریک اکسید افزایش یافته است. تغییرات کاهندگی نیتریک اکسید نسبت به دما، در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز با زمان‌های انتهایی متفاوت است. به گونه‌ای که در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز (در محدوده کمتر از ۱۵۰ دقیقه)، با افزایش دما ابتدا قدرت کاهندگی رادیکال مذکور کاهش یافته و از دماهای میانی (حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد) به بعد افزایش یافته است. تغییرات قدرت کاهندگی رادیکال مذکور در زمان‌های هیدرولیز بالا (حدودا بیش از ۱۵۰ دقیقه) در ابتدا با تغییرات دمای هیدرولیز، تغییر چندانی نداشته و از دمای ۴۵ درجه به بعد روند افزایشی محسوسی دارد، بدین ترتیب که همانطور که در شکل مشاهده می‌شود بیشترین مقدار کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید در دمای ۵۰ درجه و زمان هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه اتفاق افتاده است. شکل شماره 3c تاثیر دو پارامتر دما و غلظت بر قدرت کاهندگی رادیکال‌های نیتریک اکسید را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است، در دماهای پایین (محدوده دمایی بین ۴۰ تا ۴۵ درجه)، افزایش غلظت آنزیم منجر به کاهش حذف رادیکال‌ها شده است. این در حالی است که در محدوده دمایی بالاتر (بین ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد) با افزایش غلظت آنزیم، قدرت کاهندگی نیتریک اکسید افزایش می‌یابد. شکل شماره 3c نشان می‌دهد که حداکثر میزان کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید در دمای ۴۰ درجه و غلظت آنزیم ۱/۵ درصد اتفاق افتاده است. با توجه به آنچه که از نمودارها و آزمایشات بدست آمده منتج شده است می‌توان گفت که در حالت کلی افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش و افزایش غلظت آنزیم آلکالاز باعث کاهش قدرت کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید در هیدرولیز پروتئین دانه گوجه‌فرنگی شده است. دمای هیدرولیز در محدوده ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد تاثیر قابل چشم‌گیری در کاهندگی رادیکال آزاد نیتریک اکسید نشان نداد. با توجه به یافته‌های مذکور برای کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید می‌توان سه مقدار ۲۱۰ دقیقه، ۴۰ درجه سانتی‌گراد و ۱/۵ درصد را به ترتیب برای زمان هیدرولیز، دمای هیدرولیز و غلظت آنزیم آلکالاز، به عنوان مقادیر بهینه معرفی نمود. ژونگا و همکاران ظرفیت کاهندگی رادیکال‌های نیتریک را در عصاره شاه‌توت بررسی کردند و نشان دادند که ظرفیت به دام اندازی رادیکال‌های نیتریک در غلظت‌های پایین ناچیز بوده و بتدریج با افزایش غلظت عصاره، قدرت آن بیشتر شده و

نیتریک اکسید اقدام نمود. روش سطح پاسخ، به عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گرفت. 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. نتایج تحقیق حاکی از آن است که شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و رادیکال نیتریک اکسید، دمای ۵۰ درجه سانتی گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و میزان آنزیم ۱/۸۵ درصد برای دانه گوجه فرنگی بود. با در نظر گرفتن فعالیت آنتی اکسیدانی بالقوه در دانه‌ی گوجه فرنگی می‌توان از آن به جای آنتی اکسیدان‌های سنتزی و سایر نگهدارنده‌های شیمیایی جهت به تاخیر انداختن اکسیداسیون استفاده نمود.

۵- منابع

- [1] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radicalscavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114:1198–1205.
- [2] Tang, C.H. and Ma, C.Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. *LWT Food Science Technology*, 42:606-611.
- [3] Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P. and Tupasela T. (1998). Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 9: 307-319.
- [4] 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.
- [5] Clement, A., Vioque, J. and Millan, F. (1999). Vegetable Protein Hydrolysate in Nutricion y Obesidad. *Food Science*, 2:289-296.
- [6] Ovissipour, M.R., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M. (2010). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food and Bioprocess Technology*, 5(2): 696-705.
- [7] Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, SK. (2005). Antioxidant properties of a radicals

یو و همکاران فعالیت سنجش به دام اندازی رادیکال‌های نیتريت را در مورد عصاره فنلی پوست نوعی کاج انجام دادند و مشاهده کردند که عصاره میزان فعالیت بالایی دارد و مقدار آن با افزایش غلظت افزایش می‌یابد [۴۴]. نیکخواه و همکاران نیز میزان سنجش فعالیت مهاري آنتوسیانین‌های سه گونه توت در برابر رادیکال‌های نیتريت را مورد بررسی قرار دادند. در کل نمونه‌ها مشاهده شد که ظرفیت مهار نیتريت توسط عصاره آنتوسیانینی توت همزمان با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد [۴۵].

۳-۷- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی^۱ مدل

شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به دست آمد. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت بهینه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید مطابق با شرایط زمان ۲۱۰ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنزیمی ۱/۸۵ درصد به دست آمد که با درجه مقبولیت^۲ ۸۱/۶۹ درصد منطبق با ۸۵/۵۳ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ۶۱/۱۷ درصد قدرت مهار رادیکال‌های نیتریک اکسید بود. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیشبینی شده توسط مدل اجرا گردید (در سه تکرار) که قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و کاهندگی رادیکال نیتریک اکسید به ترتیب ۸۴/۳۳ و ۶۰/۳۴ درصد بود. مقادیر آزمایشی تا حد بالایی مطابق با مقادیر پیشبینی شده توسط مدل بود که بیان‌گر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی اکسیدانی از ضایعات گوجه فرنگی بود.

۴- نتیجه گیری

هیدرولیز پروتئین ضایعات گیاهی می‌تواند نقطه عطفی در تولید محصولات غذایی با پروتئین و کیفیت بالا و در عین حال ارزان قیمت، جهت عرضه به بازار باشد. ضایعات گوجه فرنگی به عنوان یک محصول در دسترس می‌تواند به صورت یک منبع پروتئینی جدید جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد. مطالعه پیش رو نشان داد که با ایجاد شرایط بهینه با استفاده از آنزیم آلکالاز می‌توان به طور قابل توجهی نسبت به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و کاهندگی رادیکال

1 Validation
2. Desirability

- [18] Amiri, M., Motamed zadegan, A., Hosseini parvar, H. (2015). Comparison of Alkali and Enzymatic Methods of Extraction in Characteristics and Efficiency of Hydrolysis of Tomato Seed Protein. *Food Industry Research*. 26 (2): 333-343.
- [19] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escalera, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76: 965-977.
- [20] Sumaya-Martinezl, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa1, S. and Prado-Barragan, L.A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 98-104.
- [21] AACCC. (1999). Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Accosiation of Cereal Chemists. Ins.
- [22] Liadakis, G.N., Tzia, C., Oreopoulou, V., and Thomopoulos, C.H. (1995). Protein Isolation from Tomato Seed Meal, Extraction Optimization. *Food Science*. 3, 477-482.
- [23] Parvaneh V. (2004). Quality control and chemical analysis of foods. Tehran Univ. Press, 332p.
- [24] Jamdar. S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V., and 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.
- [25] Volkman, H., Imianovsky, U., Oliveira, J. L. B., Sant Anna, E. S. (2008). Cultivation of *Arthrospira platensis* in desalinator wastewater and salinated synthetic medium: protein content and amino acid profile. *Journal of Microbiology*. 39:1-4.
- [26] Tsai, P.J., Tsai, T.H., Yu, C.H., and Ho, S.C. (2007). Comparison of No-scavenging and NO-suppressing activity of different herbal teas with those of green tea. *Food Chemistry*, 103:181-187.
- [27] Carlson, B. L., knorr, D., and Watkins, T. R. (1981). Influence of tomato seed addition on the quality of wheat flour breads. *J. Food Science*. 46: 1031-1042.
- [28] Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 53, 581-7.
- [8] Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.
- [9] Mccann, K.B., Shiell, B.J., Michalski, WP., Lee, A., Wan, J., Roginski, H. (2006). Isolation and characterization of a novel antibacterial peptide from bovine As1-casein. *International Dairy Journal*, 16, 316-23.
- [10] Jia, J., Maa, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119, 336-42.
- [11] Meisel, H., FitzGerald, RJ. (2003). BiofunCtional peptides from milk proteins, mineral binding and cytomodulatory effects. *Current PHarmaceutical design*, 9, 1289-95.
- [12] Gauthier, SF., Pouliot, Y., Saint-Sauveur D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 11, 1315-23.
- [13] Nourani, M. and Sharifi, A. (2015). Investigating the sensory properties and color changes of the acne cake made with tomato peel fiber during storage. Twenty-third National Congress of Iranian Food Science and Technology. Islamic Azad University, Quchan Branch.
- [14] Sogi, D. S. (2001). Functional properties and characterization of tomato waste seed proteins. PhD Thesis. Amritsar, India: Guru Nanak Dev Univ. 69-95.
- [15] Piyakina, G.A., Maksimov, V.V., and Yunusov, T.S. (1998). Some properties pf the protein fraction of tomato seeds. . *Chemistry of natural compounds*. 34(4): 492-497.
- [16] Liadakis, G.N., Tzia, C., Oreopoulou, V., and Thomopoulos, C.H. (1998). Protein Isolation from isolation of Tomato Seed Meal protein with salt solution. *Food Science*. 63, 450-4453.
- [17] Moayedi, A., Hashemi, M., Safari, M. (2016). Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antibacterial hydrolysates by proteolytic *Bacillus subtilis*: optimization of fermentation conditions. 53(1):391-400.

- [38]Sun Q, Shen H, Luo Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of food science and technology*, 48(1): 53-60.
- [39]Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., and Kim, S.K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Nutritional Biochemistry*, 16: 562-569.
- [40]Mehrgan nikoo, A., Sadeghi mahoona, A.R., Ghorbani, M., Taheri, A., & Aalami, M. (2014). Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by response surface methodology. *Food Processing and Preservation Journal*, 1, 95-110.
- [41]WiriyaPhan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry* 132: 104-111.
- [42]Zhonggao, C., Felgines, O., Texier, C., Besson, D.J., Liu, J. and Wang, S. (2005). Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries. *Food Technology and Biotechnology*, 43(1): 97-102.
- [43]Menaga, A., Rajakumar, S. and Ayyasamy P.M. (2013). Free radical scavenging activity of methanolic extract of pleurotus Florida mushroom. *Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 5: 975-1491.
- [44]Yu, L., Zhao, M., Wang, J.S., Cui, C.h., Yang, B., Jiang, Y. and Zhao, Q. (2007). Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of phenolic extract from pine (*Pinus massoniana* Lamb.) bark. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9: 122-125.
- [45]Nikkhah, A., Khayami, M., Heidari, R. (2010). Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins from black berry (*Morus nigra* L.), strawberry (*Fragaria vesca* L.) and berry (*Morus alba* L. Var. *nigra*) extracts. *Scientific and Research Journal of Iranian Medicinal and Aromatic Plants*. 25(1): 120-128.
- 28.
- Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43-81.
- [29]Ovissipour, 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 persiansturgeon (*Acipenser Persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 115: 238-242.
- [30]Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of Sardinella By- Product hydrolysate. *Food Technology. Biotechnol.* 45 (2): 187-194.
- [31]Gad, A. M., El-Khalafy, H. M. ; Hassan, M. M.; Shoeb, Z. E. (1968). *Grasas Aceites*. 19, 139.
- [32]Lech, W.; Muszkato, B., Kakowska-Lipinska, I. Trzebska-Jeske, I. (1969). *Przem. Spozyw.* 23, 161.
- [33]Bhagya, B., Sridhar, K.R., Seen, s., and Bhat, R. (2007). Nutritional qualities of ripened beans of mangrove wild legume *Canavalia cathartica* Thouars. *Agricultural Technology*. 3(2): 255-274.
- [34]Klump, S.P., and Allred, M.C. (2001). Determination of isoflavones in soy and selected foods containing soy. *AOAC international*. 48: 1865-1883.
- [35]Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Habibi-Rezaei, M. (2011). Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L. *International Journal of Food Engineering*, 7(5): 1556-3758.
- [36]Meshkinfar, N., Sadeghi Mahoonak, AR., Ziaifar, AM. Ghorbani, M., and Kashani Nejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Tabriz, Journal of Food Researches* 24(2): 215-225.
- [37]Hosseini, SH., Garghi, A., Jamalzadeh, H., and Safari, R. (2012). Comparison of produced fish protein hydrolysate from viscera and head of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using Alcalase enzyme and internal tissue enzymes. *Fisheries Science*. 21(3): 55-62.

Determination of Optimum Conditions for Production of Hydrolyzed Protein with Antioxidant Capability and Decrease of Nitric Oxide from Tomato Wastes by Alcalas

Shariat alavi, M.¹, Sadeghi Mahoonak, A. R.^{2*}, Ghorbani, M.², Alami, M.³
Mohamadzade, J.³

1. Msc student, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Associate Professors, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3. Assistant Professor, Agricultural and Natural Resource Research Centre of Golestan

(Received: 2018/02/13 Accepted:2018/08/30)

Tomato waste can be used as a new protein source for the production of hydrolyzed protein. Free radicals are among the most important factors in the development of cancer and genetic mutations, which have become one of the greatest threats for human health in recent centuries. In this research, enzymatic hydrolysis condition of tomato seed protein (temperature, time and amount of alcalase enzyme) to achieve maximum antioxidant activity and nitric oxide reducing power in hydrolysed product were investigated. The values were evaluated using Design Expert software and analyzed by the response surface methodology. Results showed that with the optimizing hydrolysis conditions using the alcalase enzyme, it is possible to achieve a products with high DPPH radical scavenging activity and nitric oxide reducing power. The results indicate that optimum conditions for achieving the maximum DPPH free radical inhibition activity and nitric oxide reducing power is temperature of 50 ° C, hydrolysis time 210 min, and the amount of enzyme 1.85%. Under these condition the amount of DPPH free radical inhibition activity and nitric oxide reducing power was 85.53 and 61.17, respectively. The results showed that the hydrolyzed protein produced from tomato seed could be used as a natural additive in the foods formulation and pharmaceutical uses with high antioxidants and nitric oxide reducing activity.

Keywords: Alcalase enzyme, protein hydrolysate, Response Surface Methodology, Antioxidant activity, Nitric oxide inhibitory

* Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@gau.ac.ir