تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضداکسایش از هیدرولیز پروتئین کنجاله روغنی دانه کدو توسط پپسین

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

۱- دانشجوی دکتری 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- عضو هیأت علمی مرکز تحقیقات قلب و عروق اصفهان

(تاریخ دریافت: ۹۴/۲/۱۳ تاریخ پذیرش: ۹۴/۴/۱۵)

چکیده

هدف از این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین کنجاله روغنی دانه کدو *(Cucurbita pepo)* توسط آنزیم پپسین به منظور دستیابی به پپتیدهای زیست فعال دارای حداکثر قدرت ضداکسایش بود. به این منظور در این مطالعه از روش سطح پاسخ[1] و طرح مرکب مرکزی[2] با سطوح متغیرهای مستقل: غلظت آنزیم ۲-۱٪، زمان هیدرولیز ۵-۲ ساعت و دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد استفاده شد. نتایج نشان داد که پپتیدهای تولیدی در شرایط غلظت ۱٪ آنزیم، دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و زمان هیدرولیز ۲ ساعت نسبت به سایرین قدرت ضداکسایش بیشتری داشتند. میزان خاصیت ضداکسایش پپتیدهای تولیدی در شرایط بهینه (۸۲/۰۷٪) تا حدود زیادی مشابه با میزان ارائه شده توسط نرم‌افزار (۸۰/۳۱٪) بود. مقدار R^2 و R^2 تعدیل شده برای خاصیت مهار رادیکال ۲و۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)[3] به ترتیب ۰/۹۵۲۲ و ۰/۹۰۹۲ توسط نرم افزار تخمین زده شد. بر اساس نتایج بدست آمده، از طریق بهینه سازی شرایط هیدرولیز پروتئین دانه کدو می‌توان به پپتیدهای زیست فعال با قابلیت بالای مهار رادیکال DPPH دست یافت.

کلید واژگان: هیدرولیز آنزیمی، پپسین، پپتیدهای ضداکسایش، کنجاله روغنی دانه کدو

*مسئول مکاتبات: elham_2191@yahoo.com

1. Response Surface Method
2. Central Composite Design
3. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

۱- مقدمه

پپتیدهای زیست فعال به عنوان بخش‌های پروتئینی خاص در نظر گرفته می‌شوند که تأثیر مثبتی بر عملکرد بدن داشته و در نهایت منجر به حفظ سلامتی مصرف کننده خواهند شد. در تعریفی دیگر، پپتیدهای زیست فعال به پپتیدهایی با فعالیت مشابه با هورمون یا دارو اطلاق می‌گردند که عملکرد فیزیولوژیک بدن را از طریق برقراری پیوند با گیرنده‌های خاص در سلول‌های هدف تنظیم کرده و منجر به تحریک پاسخ‌های فیزیولوژیک بدن می‌شوند [۱]. رایج‌ترین راه تولید پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها می‌باشد. بسیاری از پپتیدهای زیست فعال شناخته شده از طریق هیدرولیز توسط آنزیم‌های هضم کننده که عمدتا پپسین و تریپسین هستند تولید شده‌اند [۲]. با توجه به ویژگی‌های کاربردی، پپتیدهای زیست فعال به انواع ضد باکتری، ضد ترومبوز، ضد فشار خون، تنظیم کننده فعالیت سیستم ایمنی، جذب کننده املاح و پپتیدهای ضد اکسایش تقسیم بندی می‌شوند [۱].

پپتیدهای ضد اکسایش در آینده نزدیک کاربردهای فراوانی را در زمینه‌هایی مانند مواد غذایی، مواد داروئی و آرایشی خواهند یافت. کلمپنگ و همکاران [۳] با مطالعه در مورد هیدرولیز پروتئین ماهی گیش خط زرد (*Selaroides leptolepis*) توسط آلکالاز و فلیورزایم اعلام کردند که هیدرولیزات‌های تولید شده توسط هر دو آنزیم حاوی مقدار زیادی آمینواسید گلوتامیک اسید، گلوتامین، آسپارتیک اسید، آسپارژین، آلانین، لایزین و لوسین بودند. تأثیر فرایند هیدرولیز توسط آلکالاز و فلیورزایم بر قدرت ضداکسایش پروتئین کانولا توسط کومبی و همکاران [٤] بررسی شد. بر طبق گزارشات، 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 حالی‌که پپتیدهای تولیدی از فعالیت همزمان فلیورزایم و آلکالاز تفاوتی از نظر قدرت ضداکسایش با پپتیدهای حاصل از فعالیت آلکالاز به تنهائی نداشتند.

دانه کدو (*cucurbita pepo*) حاوی بیش از ۳۵٪ پروتئین و ۵۰٪ چربی بوده و یک منبع غنی از آمینواسیدهای آرژنین، آسپارتیک اسید و گلوتامیک به شمار می‌رود. ارزش تغذیه‌ای دانه کدو بسیار نزدیک به دانه‌های روغنی مانند سویاست [۵]. این دانه منبع مناسبی از مواد معدنی مانند پتاسیم، منیزیوم، منگنز، روی، سلنیوم، مس و مولیبدن، پروتئین و اسیدهای چرب می‌باشد و به طور کلی می‌توان گفت یک منبع مفید از نظر ترکیبات تغذیه‌ای ضروری برای انسان است [٦]. کاربرد اصلی دانه کدو در صنعت به منظور تولید روغن می‌باشد. کنجاله‌ای که پس از روغن کشی از این ترکیب به جای می‌ماند حاوی درصد بالائی پروتئین است که در حال حاضر با قیمت اندک به مصرف خوراک دام می‌رسد. با توجه به موارد ذکر شده، در این تحقیق تلاش شده است شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین موجود در کنجاله دانه کدو با استفاده از آنزیم پپسین به منظور دستیابی به حداکثر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH[1] مورد ارزیابی قرار گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

این مطالعه در سال ۱۳۹۳ در آزمایشگاه‌های دانشکده علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انجام گرفت. کنجاله دانه کدو *Cucurbita pepo con. Pepo (var. Styriaca)* از شرکت سویا بین گرگان، آنزیم پپسین 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- روغن گیری از کنجاله دانه کدو

پس از حذف مواد خارجی، کنجاله توسط دستگاه آسیاب (Perten,3100 ساخت آلمان) به آرد تبدیل شد. آرد حاصل به مدت ١٦ساعت با حلال هگزان به نسبت ۱:۳ چربی‌گیری، و پس از نگهداری به مدت ٤٨ ساعت در دمای محیط برای خروج کامل بقایای حلال، به یخچال منتقل شد [۷].

۲-۳- استخراج پروتئین دانه کدو

کنجاله دانه کدو چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ در آب پراکنده شد. سپس pH محلول توسط سود ۱ نرمال به ۱۰ رسیده و به

1. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ٢٠ دقیقه با دور g٥٠٠٠ و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در سانتریفوژ یخچال دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) قرار گرفت. سپس pH مایع روئی به منظور رسوب پروتئین‌های دانه کدو توسط اسید کلریدریک ١ نرمال به ٥ رسیده و تحت شرایط مشابه سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده (کنسانتره پروتئین) برای هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت [٨].

٢-٤- هیدرولیز کنسانتره پروتئین دانه کدو

به این منظور کنسانتره به نسبت ٥٪ (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH برابر با ٢ (حد بهینه آنزیم) پراکنده و آنزیم در غلظت ١٪ تا ٢٪ افزوده شد. سپس هیدرولیز در محدوده دمائی و زمانی ٤٠-٣٠ درجه سانتی‌گراد و ٥-٢ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کره جنوبی) با دور ٢٠٠ rpm به انجام رسید. در انتها واکنش آنزیمی در ٨٥ درجه سانتی‌گراد به مدت ١٠ دقیقه متوقف و سانتریفوژ کردن برای حذف ترکیبات اضافه در ٥٠٠٠ g به مدت ٣٠ دقیقه انجام گرفت [٩].

٢-٥- بررسی خصوصیات شیمیائی کنجاله کدو

اندازه گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین کنجاله به ترتیب توسط روش‌های AACC ١٥-٤٤، ٠١-٠٨ و ١٢-٤٦ [١٠] و اندازه-گیری چربی کنجاله به روش سوکسله [١١] انجام گرفت.

٢-٦- اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

برای بررسی قدرت مهار رادیکال DPPH، ١٠٠٠ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ١٠٠٠ میکرولیتر محلول DPPH (٠/١ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ٩٦٪ مخلوط شد، مخلوط حاصل به مدت ٦٠ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری و در نهایت جذب محلول در طول موج ٥١٧ نانومتر اندازه گیری شد [١٢].

در نمونه کنترل به جای نمونه پروتئین هیدرولیز شده از١٠٠٠ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{فعالیت مهارکنندگی رادیکال ٪} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{شاهد}}$$

٢-٧- بهینه سازی فرایند

به منظور بهینه سازی فرایند از نظر خواص ضد اکسایش از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ[1] با طرح مرکب مرکزی[2] برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم (x_1)، دما (x_2) و زمان هیدرولیز (x_3) در سه سطح (١+، ٠، ١-) استفاده شد. پاسخ مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بود. به این منظور ٢٠ تیمار تصادفی با در نظر گرفتن شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم افزار پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ١ و تیمارهای مربوطه در جدول ٢ 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 در مقدار واقعی)، b_0 مقدار ثابت، b_1،b_2 و b_3 اثرات خطی[3]، b_{11}، b_{22} و b_{33} اثرات درجه دوم[4] و b_{12} ، b_{13} و b_{23} اثرات متقابل[5] می‌باشند. ضرایب رگرسیونی، رسم نمودارها و بهینه سازی با استفاده از نرم افزار Design Expert و معنی‌داری آزمون‌ها از طریق محاسبه مقدار F در سطح احتمال معنی داری ٠/٠٥ بررسی شد.

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

فعالیت مهار رادیکال = -٥٢٢/٥٨ + ٩٩/١٠٢ (دما) - ٢١/٨٨ (زمان) + ٥٢/٥٥ (آنزیم × آنزیم) + ٢/٧٣ (زمان × زمان) + ٩/٩ (آنزیم × زمان) + ٠/٩٩ (دما × دما)

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

جدول ۱ سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه سازی فعالیت ضد اکسایش پروتئین دانه کدو

متغیرهای مستقل	حدود تغییرات		
	+۱	۰	−۱
غلظت آنزیم (٪)	٪۲	٪۱/۵	٪۱
دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	۳۰	۳۵	٤۰
زمان هیدرولیز (ساعت)	۵	۳/۵	۲

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

تیمار	غلظت آنزیم (٪)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	زمان هیدرولیز (ساعت)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)
۱	۲	۳۰	۲	٦۸/۱۱
۲	۱	۳۰	۲	۸۲/۰۷
۳	۲	۳۰	۵	۷۲
٤	۱	۳۰	۵	۷۰/۳۱
۵	۱/۵	۳۰	۳/۵	۵۰/۱۸
٦	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۵/۹
۷	۱/۵	۳۵	۲	۷۰/۳٤
۸	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۵/۱۳
۹	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۸
۱۰	۱	۳۵	۳/۵	۷۹/۲٤
۱۱	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۸/٤٤
۱۲	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۲/۳۹
۱۳	۱/۵	۳۵	۳/۵	٦۷/۸٤
۱٤	۱/۵	۳۵	۵	٦۸/۹۳
۱۵	۲	۳۵	۳/۵	۷۹
۱٦	۱	٤۰	۵	٦۲/٦۷
۱۷	۱/۵	٤۰	۳/۵	٤۳/۵۲
۱۸	۲	٤۰	۲	٦۸/۷۲
۱۹	۱	٤۰	۲	۷٦/۸۳
۲۰	۲	٤۰	۵	٦۵/۳۱

۳- نتایج و بحث

ویژگی‌های کنجاله کدو در جدول ۳ آمده است.

ضرایب تبیین[1] و تبیین تعدیل شده[2] برای مدل ارائه شده به ترتیب برابر با ۰/۹۵۲۲ و ۰/۹۰۹۲ و مقدار عدم برازش ۰/۲۷۲۳ بود. بالا بودن این ضرایب تبیین نشاندهنده توزیع و پراکندگی مناسب داده‌ها و معنی‌دار نبودن عدم برازش به این معناست که مدل قادر به پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی بوده است.

1. R Square

2. Adjusted R Square

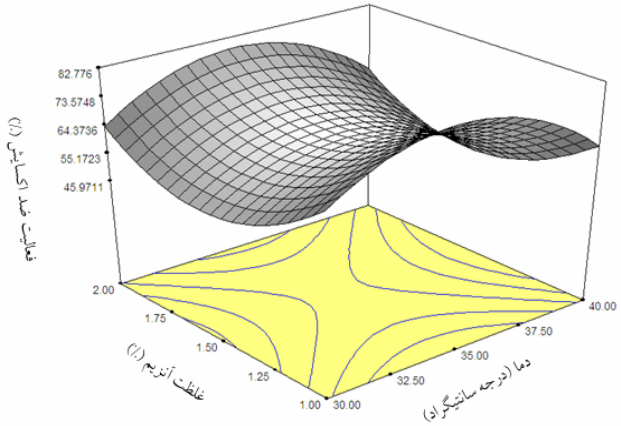
جدول ۳ ویژگی های کنجاله کدو

ویژگی	درصد
پروتئین	٤٨/٥٧ ± ٣/٥١
چربی	٨/٩٣ ± ٠/٥٨
رطوبت	٦/٢٤ ± ٠/٥٢
خاکستر	٧/١١ ± ٠/١٧

۳-۱- تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر مهار رادیکال DPPH

نقش غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر قدرت مهار رادیکال DPPH در زمان بهینه هیدرولیز در شکل ۱ نشان داده شده است. از غلظت ۱٪ تا ۱/۵٪ فعالیت ضداکسایش دچار یک کاهش شدید شد و افزایش بیشتر غلظت آنزیم از ۱/۵٪ تا ۲٪ منجر به افزایش در قابلیت مهار رادیکال با سرعت کمتری گردید. با افزایش دمای هیدرولیز از ۳۰ به ۳۵ درجه سانتی‌گراد فعالیت ضداکسایش پپتیدها افزایش یافت و در ۳۵ درجه سانتیگراد به حداکثر خود رسید، سپس با افزایش دما از ۳۵ به ٤٠ درجه سانتی‌گراد این مقدار مجددا کاهش شدیدی نشان داد.

فعالیت ضد اکسایش پپتیدها به میزان انتخابی بودن پروتئاز مورد استفاده، درجه هیدرولیز، ماهیت پپتیدهای آزاد شده (مانند وزن ملکولی، توالی آمینواسیدی و ساختار پپتید) و سایر ویژگی‌ها از قبیل قابلیت باند کردن رادیکال‌های آزاد، فعالیت شلاته کنندگی یون‌های فلزی و قدرت الکترون دهندگی، توالی آمینواسیدی و وجود آمینواسیدهای خاص در زنجیره پپتیدی آنها وابسته است [١٣]. از سویی قدرت ضد اکسایش هیدرولیز شده‌های تولیدی بستگی زیادی به آرایش ساختاری و توالی‌های خاص آمینواسیدی موجود در زنجیره پپتیدی دارد. برخی محققان معتقدند که هیستیدین، آمینواسیدهای هیدروفوب و پپتیدهائی با توالی پرولین-هیستیدین-هیستیدین دارای قدرت ضد اکسایش می‌باشند [١٤]. با توجه به نتایج گزارش شده می‌توان گفت که احتمالا میزان تشکیل چنین پپتیدهایی در شرایط غلظت ۲٪ آنزیم و دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشتر بوده است. با مطالعه بر هیدرولیز پروتئین ماهی تیلاپیا توسط پروپراز E، پپسین، تریپسین، فلیورزایم، نوتراز و پاپائین به منظور دستیابی به پپتیدهایی با حداکثر خاصیت ضداکسایش فان و همکاران [١٥] اعلام کردند که هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط تریپسین با توالی آمینواسیدی آسپارتیک اسید-گلایسین-گلایسین-تیروزین (با وزن مولکولی ٤٥٦/١٢ دالتون) و آسپارژین-تیروزین-آسپارتیک اسید-گلوتامین-تیروزین (با وزن مولکولی ٧٠٢/٢٦ دالتون) بیشترین قدرت ضداکسایش را به خود اختصاص دادند. در تحقیق مشابهی به منظور تولید پپتیدهای ضداکسایش، هیدرولیز پروتئین ماهی گیش خط زرد (*Selaroides leptolepis*) توسط آنزیم‌های فلیورزایم و آلکالاز انجام گرفت. نتایج نشان داد که هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط فلیورزایم و آلکالاز به ترتیب با وزن مولکولی ١/٧٧ و ٢/٤٤ کیلودالتون دارای بیشترین قدرت ضداکسایش بودند (٣).



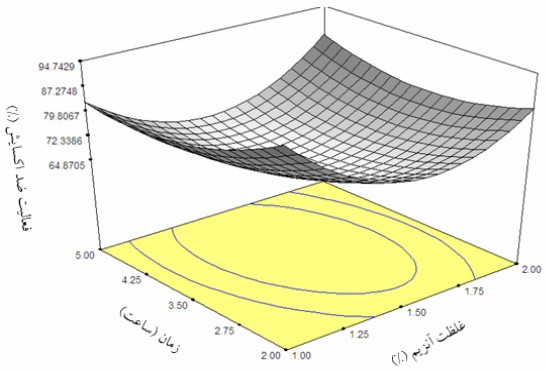
شکل ۱ تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر خاصیت ضداکسایش

۳-۲- اثر غلظت آنزیم و زمان هیدولیز بر قدرت ضداکسایش

افزایش غلظت آنزیم از ۱٪ تا ۱/۵٪ باعث کاهش در قدرت ضداکسایش پپتیدها شد و سپس با افزایش بیشتر غلظت از ۱/۵٪ تا ۲٪ این میزان دچار افزایش گردید. بیشترین قدرت مهار رادیکال در غلظت ۱٪ و کمترین این فعالیت در میانه نمودار (غلظت ۱/۵٪) مشاهده گردید (شکل ۲). در مورد تأثیر تغییرات زمان هیدرولیز بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH مربوط به زمان ۲ ساعت هیدرولیز بود. از زمان ۲ تا ۳/۵ ساعت (قسمت میانی نمودار) این ویژگی دچار افت شدید شده و سپس با افزایش زمان هیدرولیز از ۳/۵ تا ۵ ساعت یک افزایش تدریجی در خاصیت ضداکسایش پپتیدها مشاهده گردید (شکل ۲).

آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای هیدروفوب مانند لوسین و آمینواسیدهای آروماتیک مانند فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر آمینواسیدها می‌گردد و اعتقاد بر این است که گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال می‌باشد [۱٦].

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 ضداکسایش تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز افزایش می‌یابد [۱۷]. در تحقیقی که توسط سون و همکاران [۱٦] بر خواص ضداکسایش پپتیدهای حاصل از هیدرولیز هموگلوبین خوک توسط فلیورزایم، پاپائین، آلکالاز، پپسین و تریپسین انجام گرفت، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH (٦۷٪) مربوط به هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین پس از ٦۰ دقیقه هیدرولیز بود.



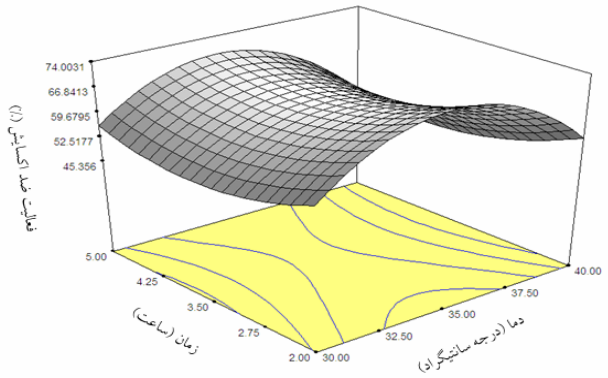
شکل ۲ تغییر در قدرت مهار رادیکال DPPH با تغییر در غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز

۳-۳- نقش دما و زمان هیدرولیز در قدرت مهار رادیکال DPPH

تغییرات در قدرت مهار رادیکال DPPH در اثر زمان و دمای هیدرولیز و با غلظت ثابت آنزیم در حد بهینه در شکل ۳ آمده است. با تغییر دما از ۳۰ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد قابلیت مهار رادیکال DPPH افزایش یافت و در ۳۵ درجه سانتی‌گراد به حداکثر خود رسید. با افزایش دما از ۳۵ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد این قابلیت دچار افت شدید شد و در ٤۰ درجه به حداقل رسید.

کمترین فعالیت ضداکسایش پس از ۳/۵ ساعت هیدرولیز بدست آمد و قدرت مهار رادیکال در دو انتهای منحنی (۲ و ۵ ساعت هیدرولیز) بیشتر از قسمت‌های میانی بود. بیشترین قابلیت ضداکسایش پس از ۲ ساعت هیدرولیز مشاهده گردید.

اعتقاد بر این است که تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به باز شدن ساختار و قرارگیری در معرض گروه‌های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند خواهد شد [۱٦]. این موضوع به اثبات رسیده است که رابطه مستقیمی میان قدرت مهار رادیکال و قابلیت هیدروژن دهندگی آمینواسیدها وجود دارد. تغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر بسزائی در قدرت ضداکسایش دارد. پپتیدهای با وزن مولکولی پائین دارای فعالیت ضداکسایش قوی‌تری هستند [۱۸]. این ویژگی می‌تواند توجیه کننده فعالیت ضداکسایش پپتیدهای تولید شده پس از ۵ ساعت هیدرولیز باشد. ویریافان و همکاران [۱۹] پس از هیدرولیز ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین اعلام کردند که الزاما رابطه مستقیمی میان درجه هیدرولیز و قدرت ضداکسایش پپتیدهای تولیدی وجود ندارد. بنابر گزارش این محققین، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ دارای بالاترین قدرت ضداکسایش بودند، در حالی‌که 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.



شکل ۳ نمودار سه بعدی و کانتور تغییر در قدرت مهار رادیکال در برابر دما و زمان هیدرولیز

٤- نتیجه گیری

افزودن ترکیبات ضداکسایش یکی از راه‌های افزایش زمان ماندگاری، به ویژه در مواد غذایی سرشار از چربی است. در حال حاضر آنتی اکسیدان‌های مصنوعی به علت ماهیت شیمیائی و تصوری که مبنی بر سرطانزائی این ترکیبات وجود دارد مصرف رو به کاهشی در مواد غذایی دارند. پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز از جمله ترکیباتی هستند که می‌توانند به عنوان جایگزین آنتی اکسیدان‌های سنتزی در مواد غذایی مورد توجه قرار گیرند. نتایج تحقیق حاضر نشان داد که از طریق بهینه کردن شرایط هیدرولیز امکان تولید پپتیدهایی با قدرت ضداکسایش بالا و قابل استفاده در مواد غذایی وجود دارد.

٥- منابع

[1] Sharma S, Singh R, Rana S. (2011). Bioactive peptides: a review. International Journal of Bioautomation 15: 223-50.

[2] Korhonen H, Pihlanto A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal 16(9): 945-960.

[3] Klompong V, Benjakul S, Yachai M, Visessanguan W, Shahidi F, Hayes KD. (2009). Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis). Journal of food science 74(2): C126-C133.

[4] Cumby N, Zhong Y, Naczk M, Shahidi F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. Food Chemistry 109(1): 144-148.

[5] Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. (2006). Antioxidative effects of pumpkin seed (Cucurbita pepo) protein isolate in CCl4□Induced liver injury in low□protein fed rats. Phytotherapy Research 20(11): 935-940.

[6] Sali A, Imer R, Shukri F, Salih S, Refki Z. (2012). "Nutritive and Mineral Composition in a Collection of Cucurbita pepo L Grown in Kosova. Food and Nutrition Sciences 2012.

[7] Kaur M, Singh N. (2007). Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (Cicerarietinum L.) cultivars. Food Chemistry 102: 366-374.

[8] Živanović I, Vaštag Z, Popović S, Popović L, Peričin D. (2011). Hydrolysis of Hull-Less Pumpkin Oil Cake Protein Isolate by Pepsin. International Journal of Biological and Life Sciences 7(1): 30-34.

[9] 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(12): 1455-1460.

[10] AACC. 1999. Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Accosiation of Cereal Chemists. Ins.

[11] Parvaneh V. (2004). Quality control and chemical analysis of foods. Tehran Univ. Press, 332p.

[12] 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(4): 1198-1205.

[13] Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz G, Betancur-Ancona D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and Phaseolus vulgaris seeds. LWT-Food Science and Technology 42(10): 1597-1604.

[14] Phelan M, Aherne A, FitzGerald R, O'Brien N. (2009). Casein-derived bioactive peptides: biological effects, industrial uses, safety aspects and regulatory status. International Dairy Journal 19(11): 643-654.

[15] Fan J, He J, Zhuang Y, SunL. (2012). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (Oreochromis niloticus) frame protein. Molecules 17(11): 12836-12850.

[16] 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.

[17] Meshkinfar N, Sadeghi Mahoonak AR, Ziaiifar AM, Ghorbani M, 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.

[18] Mehregan Nikoo AR, Sadeghi Mahoonak AR, Ghorbani M, Taheri A, Alami M. (2013). Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by response surface methodology. Gorgan, Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources 5(1): 95-110.

[19] Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi by products Food Chemistry 132: 104-111.

Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin

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

1. PhD 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. Faculty Member, Isfahan Cardiovascular Research Center

(Received: 94/2/13 Accepted: 94/4/15)

The aim of this research was the enzymatic hydrolysis of pumpkin *(Cucurbita pepo)* oil cake protein with pepsin to achieve bioactive peptides with the maximum anti-oxidative activity (DPPH radical scavenging activity). For this purpose in this study Response Surface Methodology and Central Composite Design with using 1-2% enzyme concentration, 2-5 hours of hydrolysis and 30-40 °c were examined as independent factors. The results showed that the peptides produced by 1% enzyme concentration, 30 °c and 2 hours of hydrolysis possessed the highest anti-oxidative activity based on the DPPH radical scavenging activity. The anti-oxidative activity of peptides at the optimum condition (82.07%) was to a large extent similar to the amount proposed by software (80.31%). R^2 and adjusted R^2 estimated by the software were 0.9522% and 0.9092% respectively. Based on the results, it is possible to produce bioactive peptides with high DPPH radical scavenging activity through the optimization of hydrolysis conditions.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Pepsin, Pumpkin oil cake, Anti-oxidative peptides

* Corresponding Author E-Mail Address: elham_2191@yahoo.com