

Antioxidant evaluation of hydrolyzed pumpkin seed protein under the influence of simple and sequential enzymatic hydrolysis using pepsin and trypsin

Roya Bazi¹, Seyed Hossein Hosseini Ghaboos², Abolfazl Fadavi²

¹ MSc graduate, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University of Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran.

² Assistant Professor, Food Science and Technology Research Center of east Golestan, Islamic Azad University of Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran, Email: hosseinighaboos@yahoo.com

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:

Received: 2024-10-14
Revised: 2024-12-24
Accepted: 2025-01-11

Keywords:

Simple hydrolysis
Sequential hydrolysis
Pumpkin seed protein
Protein hydrolysate
Trypsin and Pepsin
enzymes

ABSTRACT

Background and objectives: The use of synthetic antioxidants in the food industry is subject to strict laws due to the potential negative effects of these compounds on human health. As a result, replacing synthetic chemical antioxidants with various natural antioxidant compounds has become an important field of study. Numerous researches have shown that the addition of hydrolyzed proteins or peptides with antioxidant properties can effectively prevent the oxidation of fats during transportation and storage, which preserves the taste and quality of nutrition. Due to the fact that different enzymes have different effects on the same substrate and due to the fact that it has been claimed that the combination of enzymes improves the bioactivity characteristics of the product, the aim of this research was to compare the effect of simple enzymatic hydrolysis versus sequential hydrolysis on the antioxidant properties of hydrolyzed pumpkin seed protein.

Materials and Methods: Pumpkin seed protein was first extracted and then hydrolyzed by two enzymes, trypsin and pepsin, in a simple and sequential hydrolysis condition. At first, in order to achieve the appropriate time of simple hydrolysis, the two mentioned enzymes were used separately in the condition of an enzyme-to-substrate ratio of 2%, optimum temperature (37°C), and optimum pH for each enzyme and during the times of 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 210 minutes. In the next step, using the optimal time of 180 minutes, four sequential hydrolysis treatments were performed.

Results: The results of the first step showed that the hydrolysates produced in 180 minutes have a high antioxidant capacity based on DPPH free radical scavenging activity, iron ion reduction power, total antioxidant capacity, and iron ion chelating activity. In the next step, using optimal time 180 minutes, four sequential hydrolysis condition were used as follows: 90 minutes of hydrolysis with trypsin and then 90 minutes with pepsin enzyme (treatment 1), 90 minutes of hydrolysis with pepsin and then 90 minutes with trypsin enzyme (treatment 2), 120 minutes of hydrolysis with trypsin and then 60 minutes with pepsin enzyme (treatment 3), 120 minutes of

hydrolysis with pepsin and then 60 minutes with trypsin enzyme (treatment 4) and were compared with two simple hydrolysis treatments including: 180 minutes of hydrolysis with Trypsin (treatment 5) and 180 minutes of treatment with pepsin (treatment 6) in terms of the four above mentioned antioxidant tests. The results showed that the sample under sequential hydrolysis treatments showed higher antioxidant capacity compared to simple hydrolysis.

Conclusion: Due to the difference in the composition and sequence and different size as a result of the different degree of hydrolysis of the peptides, the sample resulting from the sequential hydrolysis of the two enzymes showed higher antioxidant activity.

Cite this article: Bazi, R., Hosseini Ghaboos, S.H., Fadavi, A. 2025. Antioxidant evaluation of hydrolyzed pumpkin seed protein under the influence of simple and sequential enzymatic hydrolysis using pepsin and trypsin. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(4), 1-20.



“Authors retain the copyright and full publishing rights”

DOI: 10.22069/fppj.2025.22865.1843

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ارزیابی قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر

هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پپسین و تریپسین

رویا بزی^۱، سیدحسین حسینی قابوس^{۲*}، ابوالفضل فدوی^۲

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران

^۲ استادیار مرکز تحقیقات صنایع غذایی شرق گلستان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران، رایانامه: hosseinighaboos@yahoo.com

اطلاعات مقاله چکیده

نوع مقاله:

مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۳

تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۰/۰۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۲

سابقه و هدف: کاربرد آنتی اکسیدان های سنتزی در صنعت مواد غذایی به دلیل اثرات بالقوه منفی این ترکیبات بر سلامت انسان تحت قوانین سخت گیرانه قرار دارد؛ در نتیجه جایگزینی آنتی اکسیدان های شیمیایی سنتزی با انواع ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی به یک زمینه مطالعاتی مهم تبدیل شده است. تحقیقات متعدد نشان داده است که افزودن پروتئین های هیدرولیز شده یا پپتیدها با ویژگی آنتی اکسیدانی می تواند به طور موثری از اکسیداسیون چربی ها در طی حمل و نقل و نگهداری ممانعت نماید که این امر باعث حفظ طعم و کیفیت تغذیه ای مواد غذایی می گردد. با توجه به این که آنزیم های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی های زیست فعالی محصول حاصل می گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی بر روی ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو می باشد.

واژه های کلیدی:

آنزیم پپسین و تریپسین

پروتئین دانه کدو

پروتئین هیدرولیز شده

هیدرولیز ساده

هیدرولیز ترکیبی

مواد و روش ها: ابتدا پروتئین دانه کدو استخراج و سپس جهت انجام هیدرولیز از دو آنزیم تریپسین و پپسین به صورت ساده و ترکیبی استفاده شد. جهت دستیابی به زمان مناسب هیدرولیز ساده از دو آنزیم مذکور به صورت جداگانه در شرایط نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪، دما (۳۷ درجه سانتی گراد) و pH مناسب هر آنزیم (پپسین ۲ و تریپسین ۸) و در طی زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از این زمان بهینه چهار تیمار هیدرولیز ترکیبی انتخاب و از نظر چهار آزمون آنتی اکسیدانی شامل قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن با دو تیمار هیدرولیز ساده شامل: ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین (تیمار ۵) و ۱۸۰ دقیقه تیمار با پپسین (تیمار ۶) مقایسه انجام گرفت.

یافته ها: نتایج نشان داد که هیدرولیز شده های تولیدی در زمان ۱۸۰ دقیقه دارای قابلیت آنتی اکسیدانی بالایی بر اساس قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (۶۸/۹ و ۶۳/۲۵٪)، قدرت احیاء یون آهن (۰/۹۹ و ۰/۸۶)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۱/۴۲ و ۱/۲۴) و فعالیت شلاته

کنندگی یون آهن (۶۹ و ۶۴٪) به ترتیب برای تریپسین و پپسین می‌باشند. در مرحله بعد، با استفاده از این زمان بهینه چهار تیمار هیدرولیز ترکیبی به صورت: ۹۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین و سپس ۹۰ دقیقه با آنزیم پپسین (تیمار ۱)، ۹۰ دقیقه هیدرولیز با پپسین و سپس ۹۰ دقیقه با آنزیم تریپسین (تیمار ۲)، ۱۲۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین و سپس ۶۰ دقیقه با آنزیم پپسین (تیمار ۳)، ۱۲۰ دقیقه هیدرولیز با پپسین و سپس ۶۰ دقیقه با آنزیم تریپسین (تیمار ۴) انتخاب و از نظر چهار آزمون آنتی اکسیدانی فوق با دو تیمار هیدرولیز ساده شامل: ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین (تیمار ۵) و ۱۸۰ دقیقه تیمار با پپسین (تیمار ۶) مقایسه انجام گرفت. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مورد استفاده تیمارهای هیدرولیز ترکیبی ۳ و ۴ در مقایسه با تیمارهای هیدرولیز ساده (۵ و ۶) قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان می‌دهند به طوری که بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به ترتیب به میزان ۷۹/۸۵٪، ۱/۲۳، ۱/۵۶ و ۷۷٪ در تیمار هیدرولیز ترکیبی (تیمار ۴) و پایین‌ترین میزان آن‌ها به ترتیب به میزان ۶۵/۷٪، ۰/۹۱، ۱/۲۸ و ۶۸٪ در تیمار هیدرولیز ساده (تیمار ۶) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی قابلیت آنتی اکسیدانی محصولات هیدرولیز شده در شرایط مختلف (هیدرولیز ساده یا ترکیبی) به دلیل ایجاد پپتیدهای متفاوت از نظر اندازه، ترکیب و توالی به دلیل تفاوت در میزان هیدرولیز، پپتیدهای حاصل از فعالیت ترکیبی دو آنزیم قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند.

استناد: بزی، رؤیا؛ حسینی قابوس، سیدحسین؛ فدوی، ابوالفضل. (۱۴۰۳). ارزیابی قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پپسین و تریپسین. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱۶ (۴)، ۲۰-۱.



"حق نشر و حقوق کامل انتشار برای نویسندگان محفوظ است"

DOI: 10.22069/fppj.2025.22865.1843

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

پروتئین‌های حیوانی به دلیل ویژگی‌های عملکردی عالی به طور گسترده مورد بررسی قرار گرفته و به طور معمول در سیستم‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. با این وجود تولید این پروتئین‌ها تأثیر زیست محیطی قابل توجهی دارد. برآورد شده است که میزان مشارکت تولید گوشت در تولید گازهای گلخانه‌ای به میزان ۲۵٪ برآورد شده است (۱). علاوه بر این تقاضا برای مصرف گوشت روبه افزایش است. بر اساس برآورد سازمان ملل متحد جمعیت دنیا در سال ۲۰۵۰ به میزان ۹ میلیارد نفر افزایش خواهد یافت. بخش قابل توجهی از این افزایش در کشورهای جهان سوم صورت می‌گیرد که در آن‌ها مصرف گوشت نیز روبه افزایش است. در نتیجه بخش قابل توجهی از تحقیقات به کشف و مطالعه بر روی منابع پروتئینی دیگر معطوف گردیده است (۲). هزینه تولید پروتئین حیوانی نسبت به پروتئین گیاهی ۱۰ برابر بیشتر است (۳). در نتیجه، علاقه به تحقیق در زمینه پروتئین‌های گیاهی و عملکرد آن‌ها در دهه‌های اخیر به صورت قابل توجهی افزایش یافته است. به هر حال این پروتئین‌ها دارای مشکلاتی از جمله خصوصیات عملکردی و قابلیت هضم پایین می‌باشند. هیدرولیز آنزیمی محدود می‌تواند تا حد زیادی حلالیت و بنابراین کاربرد بالقوه بسیاری از پروتئین‌ها را بهبود بخشد و به دلایل مختلف نسبت به هیدرولیز شیمیایی دارای مزایای بیشتر است از جمله: کیفیت تغذیه‌ای اسیدهای آمینه در روش آنزیمی نسبت به شیمیایی بهتر محافظت می‌شود، نوع آنزیم و انتخاب آن تأثیر عمده‌ای در هدایت هیدرولیز جهت تولید محصولات هیدرولیز شده مطلوب دارد (۴). هیدرولیز آنزیمی نه تنها باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌گردد بلکه باعث ایجاد ویژگی‌های جدید در محصول تولیدی می‌گردد. این عمل می‌تواند باعث تولید محصولات

هیدرولیز شده با توانایی تثبیت کف، پایداری امولسیون و یا حتی ویژگی‌های زیست فعالی نظیر کاهندگی فشارخون، ضد میکروب، آنتی اکسیدان یا فعالیت شبه مخدري گردد (۵). پپتیدهای زیست فعال، مشتقات پروتئینی هستند که در ساختمان منبع پروتئین اولیه غیرفعال بوده و پس از رهائش خصوصیات سلامتی بخشی متفاوتی بر مبنای ترکیب و توالی آمینواسیدی خود بروز می‌دهند. به طور کلی پپتیدهای زیست فعال، به عنوان نسل جدیدی از تنظیم کننده‌های فعال بیولوژیکی شناخته می‌شوند که پتانسیل قابل توجهی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند؛ همچنین پژوهش‌ها نشان داده است که این ترکیبات با ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها و جلوگیری از رشد میکروبی پتانسیل مناسبی در حفظ کیفیت مواد غذایی دارند. به طور معمول این پپتیدها دارای ۲۰-۲۰۰ آمینواسید بوده و از نظر وزن مولکولی دارای وزن پایین‌تر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند. همانطور که ذکر شد ویژگی‌های سلامتی بخشی این ترکیبات به ساختار، ترکیب و توالی آمینواسیدی آن‌ها بستگی دارد که در نتیجه آن‌ها خصوصیات سلامتی بخشی گوناگونی همچون ضد فشارخون، ضد سرطان، ضد التهاب، بهبود سیستم ایمنی بدن، آنتی اکسیدانی، ضد دیابت و ضد کلسترول از خود نشان داده‌اند (۶).

هیدرولیز آنزیمی، مرسوم‌ترین شیوه تولید این ترکیبات ارزشمند می‌باشد. آنزیم‌های رایج مورد استفاده در این شیوه، آنزیم‌های گیاهی و میکروبی نظیر آلکالاز، فلاورزیم پائین، فیسین، ترمولایزین، پروناز و یا آنزیم‌های گوارشی نظیر پپسین و تریپسین می‌باشند که به صورت جداگانه و یا در ترکیب با یکدیگر، جهت تولید توالی‌های پپتیدی کوچک از مخلوط‌های پیچیده پروتئینی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۷). با توجه به عملکرد اختصاصی آنزیم‌ها، نوع آنزیم مصرفی یکی از فاکتورهای مهم در

ویژگی پپتیدهای زیست فعال تولیدی است. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آب گریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (۸). تریپسین پروتئاز سیرینی از پانکراس است که قابلیت هضم پروتئین‌های غذایی را دارد و بر زنجیره جانبی با بار مثبت لایزین و آرژنین اثر می‌گذارد و آن را می‌شکند. تریپسین یک اندو پپتیداز است و پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره می‌شکند (۹).

پپتیدهای دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی از مهم‌ترین اجزاء فراسودمند غذایی هستند که مورد توجه بسیاری از محققین، مصرف کنندگان و صنعت غذا قرار گرفته‌اند و این امر به دلیل پتانسیل کاربرد آن‌ها در تولید غذاهای فراسودمند و حفظ کیفیت و ایمنی محصولات غذایی است (۱۰). تحقیقات مختلفی بر روی تولید پپتیدهای با ویژگی آنتی‌اکسیدانی از محصولات گیاهی صورت گرفته است. سمائی و همکاران (۱۳۹۹) پروتئین هیدرولیز شده باقلا را به روش ترکیبی تولید و از نظر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی دادند و گزارش کردند که هیدرولیز ترکیبی با آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین (در غلظت‌های ۱/۵ و ۱/۵ درصد) منجر به تولید پروتئین هیدرولیز شده با بالاترین میزان خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۹۲/۷۲ درصد) شد (۱۱). لی و همکاران (۲۰۰۷)، هیدرولیز آنزیمی کلاژن گوشت خوک را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت با استفاده از آنزیم پپسین انجام دادند. محصولات هیدرولیز شده حاصل هریک به‌طور جداگانه به مدت ۲۴ ساعت تحت تیمار با آنزیم‌های پاپائین، پروتئاز پانکراس گاوی^۱ و مخلوط سه آنزیم (پروتئاز پانکراس

گاوی، پروتئاز حاصل از *استرپتومایسس*^۲ و *باسیلوس پلی میکسا*^۳) قرار گرفتند. نتایج نشان داد که پپتیدهای هیدرولیز شده توسط مخلوط آنزیم، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند (۱۲).

دانه کدو (*Cucurbita pepo L.*) به‌عنوان یک محصول جانبی کشاورزی، دارای مقادیر نسبتاً بالای پروتئین (۳۰-۴۰ درصد برحسب ماده خشک) است. پروتئین آن غنی از اسیدهای آمینه ضروری بوده و منبع مناسبی از متیونین، والین، لوسین، ایزولوسین، هیستیدین و ترئونین می‌باشد (۱۳). بر اساس مطالعات مشخص شده است که پروتئین دانه کدو از نظر فراهمی زیستی اسیدهای آمینه مشابه سویا می‌باشد (۱۴). علاوه بر این، پروتئین‌های جدا شده از دانه‌های کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کننده مناسبی هستند. بر اساس بررسی‌های اخیر مشخص شده است که پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی است (۱۵، ۱۶). به‌عنوان نمونه دیانکووا و همکاران (۲۰۲۴) قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط پاپائین و لین و همکاران (۲۰۲۴) قابلیت زیست‌فعالی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو حاصل از هیدرولیز آنزیم توسط پاپائین، پپسین و پروتئازهای آناناس گزارش نمودند (۱۷، ۱۸). با توجه به این‌که آنزیم‌های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این‌که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی‌های زیست‌فعالی محصول حاصل می‌گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر سیستم آنزیمی ساده و ترکیبی با استفاده از دو آنزیم پپسین و تریپسین می‌باشد.

² Streptomyces

³ Bacillus polymixa

¹ Protease from bovine pancreas

محلول رویی جداسازی شد باقی مانده به دست آمده جدا و در آب مقطر حل و پس از تنظیم pH بر روی ۱۱ استخراج پروتئین دوباره تکرار شد. در مرحله بعد، سوپرناتانت ها جمع آوری و با یکدیگر مخلوط شده و با استفاده از اسیدکلریدریک (۱ نرمال) pH آن روی ۴ تنظیم شده و عمل سانتریفیوژ با شرایط قبلی تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل جداسازی و توسط خشک کن انجمادی (آپرون، کره جنوبی) خشک (۲ میلی متر جیوه، ۴۰- درجه سانتی گراد) و در ظروف در بسته و تا زمان استفاده در یخچال خنک نگه داری شد (۱۵).

تهیه پروتئین هیدرولیز دانه کدو: جهت انجام هیدرولیز از دو آنزیم تریپسین و پپسین به صورت ساده و ترکیبی استفاده شد. در ابتدا جهت دستیابی به زمان مناسب هیدرولیز ساده از دو آنزیم مذکور به صورت جداگانه در شرایط دما و pH مناسب هر آنزیم (تریپسین pH ۸ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پپسین در pH ۲ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد)، نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و در طی زمان های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه هیدرولیز صورت گرفت. در انتهای هر تیمار زمانی، جهت توقف فعالیت آنزیمی از حرارت دهی به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. پس از سرد شدن هیدرولیز شده ها عملیات سانتریفیوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد پروتئین های هیدرولیز شده (موجود در بخش رومانند) در زمان های مختلف از نظر قابلیت آنتی اکسیدانی توسط روش های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بررسی و زمان مناسب جهت هیدرولیز انتخاب گردید. در مرحله بعد جهت مقایسه هیدرولیز ساده و ترکیبی، عمل هیدرولیز در طی زمان بهینه مشخص شده (۱۸۰ دقیقه) با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۲ درصد و در

مواد و روش ها

مواد اولیه مصرفی: ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima* L.) از بازار محلی آزادشهر (استان گلستان) خریداری شد. در مرحله بعد دانه ها به صورت دستی جداسازی و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد در آون خشک شدند (۱۵). آنزیم پپسین و تریپسین، دی کلرید آهن، فریک کلراید، DPPH، تری کلرواستیک اسید (TCA)، فروزین و فری سیانیدسیدیم از شرکت سیگما و سود، اسیدکلریدریک، اتانول ۹۶ درصد، اسیدسولفوریک، هگزان، فسفات سدیم و آمونیوم مولیدات، معرف متیل رد از شرکت مرک تهیه شدند.

اندازه گیری ترکیبات شیمیایی: جهت اندازه گیری ترکیبات شیمیایی دانه کدو و ایزوله پروتئینی دانه کدو شامل رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی از روش AOAC (۲۰۰۳) استفاده شد (۱۹).

تولید ایزوله پروتئینی دانه کدو: دانه های کدو پس از خشک شدن توسط آسیاب به پودر تبدیل شده و پس از عبور از الک شماره ۵ (شرکت اطلس، دهانه چشمه ۶۳ میکرون) با حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی - وزنی) مخلوط شده و عمل چربی گیری به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به چربی زیر ۵ درصد انجام گرفت. جهت خروج حلال باقیمانده در کنجاله، کنجاله چربی گیری شده به مدت ۲۴ ساعت در آون (ممرت، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. کنجاله روغن گیری شده به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی - حجمی) با آب مقطر مخلوط و با کمک سود ۱ نرمال pH آن بر روی ۱۱ تنظیم گردید و مخلوط در دمای آزمایشگاه توسط همزن مکانیکی به مدت ۱ ساعت هم زده شد. پس از آن به کمک سانتریفیوژ (هانیل، کره جنوبی) در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه

دمای بهینه هر آنزیم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. جهت هیدرولیز از دو آنزیم تریپسین (pH=۸) و آنزیم پپسین (pH=۲) به صورت هیدرولیز ساده و ترکیبی و بر اساس تیمارهای

جدول ۱- تیمارهای هیدرولیز ساده و ترکیبی مورد استفاده

Table 1- simple and sequential hydrolysis treatments

شماره تیمار Treatment No.	نوع تیمار Treatment type
T1	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۹۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ۹۰ دقیقه Hydrolysis with trypsin for 90 min then with pepsin for 90 min
T2	هیدرولیز با آنزیم پپسین به مدت ۹۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ۹۰ دقیقه Hydrolysis with pepsin for 90 min then with trypsin for 90 min
T3	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ۶۰ دقیقه Hydrolysis with trypsin for 120 min then with pepsin for 60 min
T4	هیدرولیز با آنزیم پپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ۶۰ دقیقه Hydrolysis with pepsin for 120 min then with trypsin for 60 min
T5	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۸۰ دقیقه (هیدرولیز ساده) Hydrolysis with trypsin for 180 min (simple hydrolysis)
T6	هیدرولیز با آنزیم پپسین به مدت ۱۸۰ دقیقه (هیدرولیز ساده) Hydrolysis with pepsin for 180 min (simple hydrolysis)

محلول حاوی پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه سپس ۱/۵ میلی لیتر از این محلول با ۱/۵ میلی لیتر محلول اتانولی DPPH (با غلظت ۰/۱۵ میلی مولار) افزوده و مخلوط پس از ورتکس شدن، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ گردید. سپس لوله های آزمایش در یک محل تاریک به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مدت، توسط اسپکتروفوتومتر (پی جی اینسترومنت، انگلستان) در طول موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب نمونه ها خوانده شد. لازم به ذکر است که در این آزمون در نمونه کنترل به جای نمونه، حجم یکسانی از آب مقطر با محلول DPPH مخلوط گردید. در نهایت درصد مهار رادیکال های DPPH مخلوط توسط معادله ۱ محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = \left(\frac{A_c - A_s}{A_c} \right) \times 100$$

معادله ۱

پس از اتمام زمان هیدرولیز توسط هر آنزیم به منظور غیرفعال کردن آن، روش حرارت دهی استفاده شد به طوری که محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آب (ممرت، آلمان) قرار داده شد. هر تیمار به طور جداگانه در سانتیفریوژ یخچال دار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتیفریوژ گردید. در مرحله بعد قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از تیمارهای مختلف (سوپرناتانت) توسط چهار روش ذیل اندازه گیری و با یکدیگر مقایسه شد. تیمارهای مورد استفاده در هیدرولیز ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز ساده به شرح جدول ۱ مشخص گردید.

بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: از روش چبی و همکاران (۲۰۱۵) جهت بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد (۲۰). برای این منظور،

اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد و نتایج به صورت جذب در این طول موج گزارش شد. از آب مقطر دو بار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. در این آزمون جذب بالاتر معادل ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل بیشتر است.

فعالیت شلاته کنندگی یون آهن: ابتدا، ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) با ۰/۰۵ میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (۲Mm) و ۱/۸۵ میلی لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵Mm) افزوده و مخلوط به شدت هم زده شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، جذب نمونه ها در طول موج ۵۶۲ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. به عنوان نمونه شاهد از آب دو بار تقطیر استفاده شد. فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد (۲۳).

معادله ۲

Chelating effect (%) =

$$\frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100$$

 در این معادله، A_{control} برابر جذب شاهد و A_{sample} برابر جذب نمونه می باشد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان های مختلف هیدرولیز به صورت ساده و ترکیبی توسط دو آنزیم پیپسین و تریپسین (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) بر ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ی دانه کدو بر اساس طرح کاملاً تصادفی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چند دامنه ای دانکن و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2016 انجام گرفت.

نتایج و بحث

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می باشند.

قدرت احیاء یون آهن: از روش بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹) برای تعیین قدرت احیاء یون آهن نمونه ها استفاده شد (۲۱). برای این منظور، ابتدا محلول حاوی پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد. سپس ۱ میلی لیتر از نمونه با ۲/۵ میلی لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد و ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) مخلوط گردید و در انکوباتور (ویژن، کره جنوبی) در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. در مرحله بعد به این مخلوط، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری-کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و در نهایت جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه برای تهیه ی نمونه کنترل استفاده شد.

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: از روش پریتو و همکاران (۱۹۹۹) جهت تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل استفاده شد (۲۲). برای انجام این آزمون ابتدا مخلوط حاوی پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر (۵۰ میلی گرم در میلی لیتر) تهیه شد. سپس معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی-مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی-مولار) مورداستفاده تهیه و در مرحله بعد ۰/۱ میلی لیتر از نمونه محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۱ میلی لیتر از معرف در لوله اپندورف ریخته و در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه ها، میزان جذب آن ها توسط

ترکیبات شیمیایی کنجاله کدو و ایزوله پروتئینی: ایزوله پروتئینی دانه کدو مورد استفاده در جدول ۲
نتایج آنالیز ترکیب شیمیایی کنجاله چربی گیری شده و آورده شده است.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی کنجاله چربی گیری شده دانه کدو و ایزوله پروتئینی دانه کدو

Table 1- chemical composition of defatted pumpkin seed meal and pumpkin seed protein isolate

ترکیب شیمیایی Chemical composition	میزان (%) Amount (%)	ایزوله پروتئینی دانه کدو Pumpkin seed protein isolate
پروتئین Protein	49.57 ± 1.15	89.57 ± 0.89
چربی Fat	3.2 ± 0.25	0.75 ± 0.05
خاکستر Ash	5.85 ± 0.22	1.85 ± 0.1
رطوبت Moisture	6.5 ± 0.57	3.45 ± 0.24
کربوهیدرات (با روش تفاضل) Carbohydrate by Diff	34.88 ± 1.34	4.38 ± 0.35

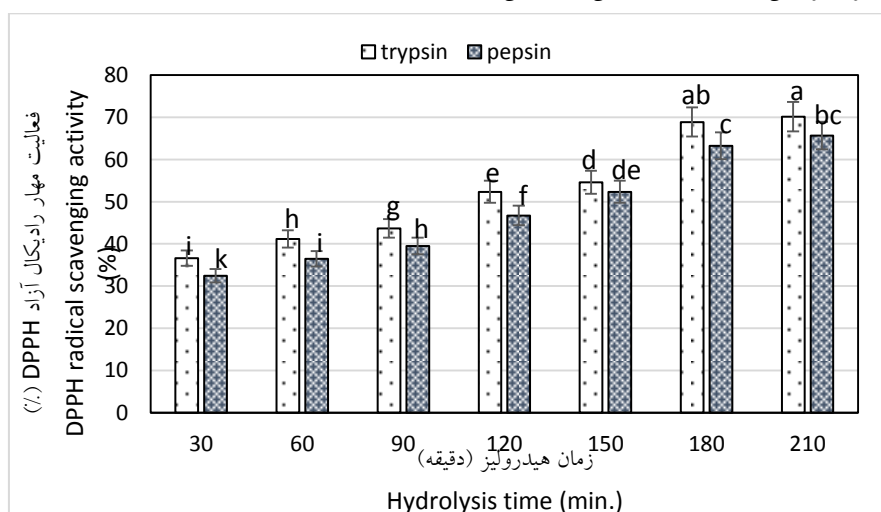
مقادیر شامل میانگین ± انحراف استاندارد ۳ تکرار می باشد.

همخوانی دارد. دلیل تفاوت در میزان چربی با مقادیر گزارش شده احتمالاً به دلیل تفاوت در فرآیند چربی گیری مورد استفاده در این تحقیق است.

قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط هیدرولیز ساده

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (برحسب درصد) تحت تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین) در شکل ۱ آورده شده است.

نورمحمدی و همکاران (۱۳۹۵) میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر کنجاله دانه کدو را به ترتیب ۴۸/۵۷، ۸/۹۳، ۶/۲۴ و ۷/۱۱ درصد گزارش نمودند (۲۴). مظلومی و صادقی ماهونک (۱۳۹۶) میزان پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر کربوهیدرات را در آرد چربی گیری شده دانه کدو به ترتیب ۴۸/۵۷، ۱۰/۳۲، ۴/۲۴، ۶/۰۵ و ۳۰/۸۳ درصد و در ایزوله پروتئینی دانه کدو به ترتیب میزان ۸۷/۵۵، ۱/۷۹، ۱/۰۱، ۱/۰۶ و ۸/۰۵ درصد گزارش نمودند (۲۵). مقادیر به دست آمده در این تحقیق با مقادیر گزارش شده توسط این محققین



شکل ۱- میزان مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (برحسب درصد)

تحت تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین)

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح ۹۵٪ است.

مهارکنندگی بالاتری بودند به طوری که پس ۲۱۰ دقیقه هیدرولیز قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، در نمونه های هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین و پپسین به ترتیب به ۷۰/۱۵ و ۶۵/۷ درصد رسید. اندازه ی متفاوت پپتیدهای تولیدی، تفاوت در ترکیب و توالی اسید آمینه در پپتیدهای حاصل از فعالیت این دو آنزیم (به دلیل درجه هیدرولیز متفاوت) می تواند علت این امر باشد (۲۷). بر اساس نتایج یک تحقیق بر روی هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی^۱، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش یافت. این محققین دلیل این مساله را افزایش پپتیدهای دهنده ی هیدروژن با توانایی ترکیب با رادیکال های آزاد بیان کردند (۲۸). رابطه ی مستقیمی بین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و درجه هیدرولیز در طی فرآیند هیدرولیز پروتئین های ماهی تیان، بادام زمینی و کلاژن خوکی گزارش شده است (۲۶، ۲۳، ۱۲). احتمالاً بالاتر بودن فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های حاصل از فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به آنزیم پپسین ناشی از تأثیر مطلوب آنزیم تریپسین به عنوان یک اندوپپتیداز در رهایش پپتیدهایی با قابلیت مهارکنندگی رادیکال محلول در چربی DPPH می باشد.

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین) در شکل ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج (شکل ۲)، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۲۱۰ دقیقه ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (بر اساس جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر) - در مورد هر دو نوع آنزیم روند صعودی نشان داد و این شاخص در هیدرولیز شده های حاصل

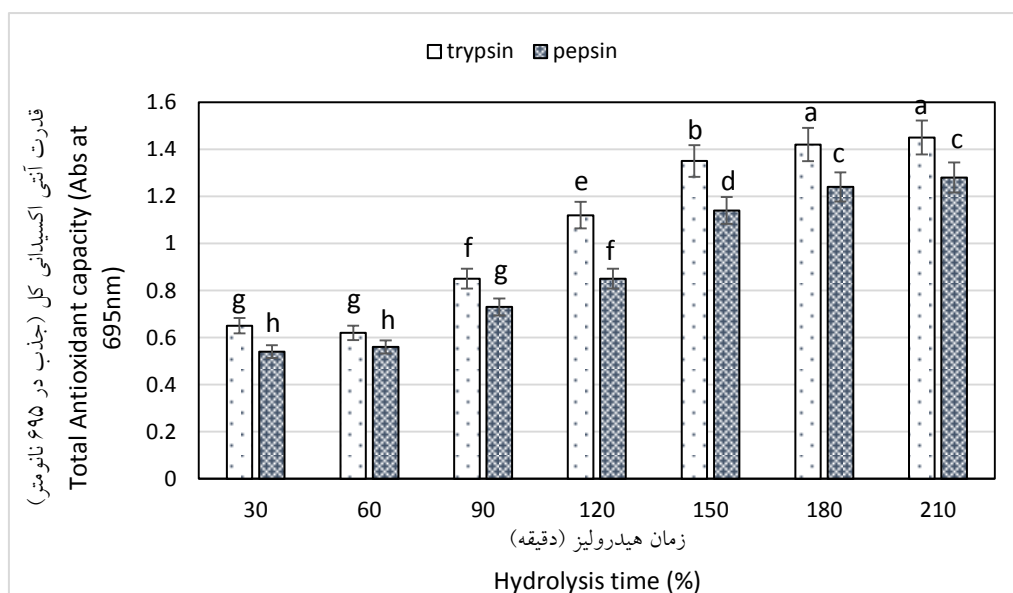
بر اساس نتایج به دست آمده بین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و زمان هیدرولیز رابطه مستقیمی برقرار است. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های هیدرولیز شده با تریپسین بالاتر از نمونه های هیدرولیز شده با پپسین بود. DPPH رادیکال آزاد محلول در چربی است که در طول موج ۵۱۷ نانومتر حداکثر میزان جذب را نشان می دهد اما در نتیجه واکنش با یک ترکیب آنتی اکسیدان و دریافت هیدروژن از آن به ترکیبی پایدار تبدیل و کاهش جذب در آن ایجاد می شود (۲۶). نتایج حاصل از ارزیابی تأثیر زمان هیدرولیز بر روی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد که این قابلیت در پروتئین های هیدرولیز شده دانه کدو با پیشرفت زمان هیدرولیز به میزان قابل توجهی افزایش یافت ($p < 0.05$)، به طوریکه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در مورد نمونه های حاصل از پپسین در محدوده ی ۳۲/۴۵-۶۵/۷۰ درصد در تریپسین در محدوده ۳۶/۰۶-۷۰/۱۵ درصد بود. بین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه های حاصل از زمان های هیدرولیز ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی داری وجود نداشت.

بنابراین با توجه به نتایج حاصل می توان بیان نمود که پیشرفت فرآیند هیدرولیز در طی زمان فرآیند منجر به تولید میزان بیشتری از پپتیدهای دهنده ی پروتون شده که می توانند با رادیکال آزاد DPPH، واکنش داده و آن را به ترکیبات پایدار تبدیل کنند و موجب اختتام واکنش های زنجیره ای رادیکالی گردند. با توجه به شکل ۱، بین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین های هیدرولیز شده ی دانه کدو حاصل از آنزیم پپسین و تریپسین تفاوت معنی داری وجود داشت و نمونه های حاصل از فعالیت تریپسین دارای قدرت

¹ *Apanopus carbo*

نورمحمدی و همکاران (۱۳۹۶) در تحقیق خود در زمینه هیدرولیز پروتئین دانه کدو توسط آنزیم تریپسین گزارش نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز به دلیل تولید پپتیدهای با اندازه کوچک‌تر قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کدو افزایش یافت (۳۱). کاوه و همکاران (۱۳۹۸) بر روی تحقیقی بر روی هیدرولیز پروتئین‌های شنبلیله توسط آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز گزارش کردند که با افزایش مدت زمان هیدرولیز و پیشرفت فرآیند، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل محصول تولیدی افزایش می‌یابد (۳۲). اعتقاد بر این است که رهاسازی پپتیدهای با خاصیت الکترون‌دهندگی با افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، افزایش می‌یابد و این ترکیبات می‌توانند با رادیکال‌های آزاد ترکیب شده و با ایجاد ترکیبات پایدار موجب افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه‌ها گردند (۳۳).

از آنزیم تریپسین نسبت به پپسین بالاتر بود. تفاوت در محتوی اسیدآمینه و ترکیب پپتید تولیدشده به خاطر ویژگی اختصاصی هر آنزیم دلیل احتمالی تفاوت در قابلیت آنتی اکسیدانی محصول تولیدی توسط هر آنزیم می‌باشد (۲۹). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو در نمونه‌های حاصل از آنزیم‌های پپسین در محدوده $0.54-1.28$ و در مورد تریپسین در محدوده $0.45-1.65$ (جذب در 695 نانومتر) بود. بین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل از هردو آنزیم در زمان‌های هیدرولیز 180 و 210 دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. گزارش شده است که باگذشت زمان هیدرولیز به دلیل پیشرفت فرآیند هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی تغییر می‌نماید و این امر تأثیر قابل توجهی در قدرت ضد اکسایش آن دارد به‌طوری‌که مشخص شده است که پپتیدهای تولیدی با وزن مولکولی کمتر دارای قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری هستند (۳۰).



شکل ۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (جذب در طول موج 695 نانومتر) تحت

تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین)

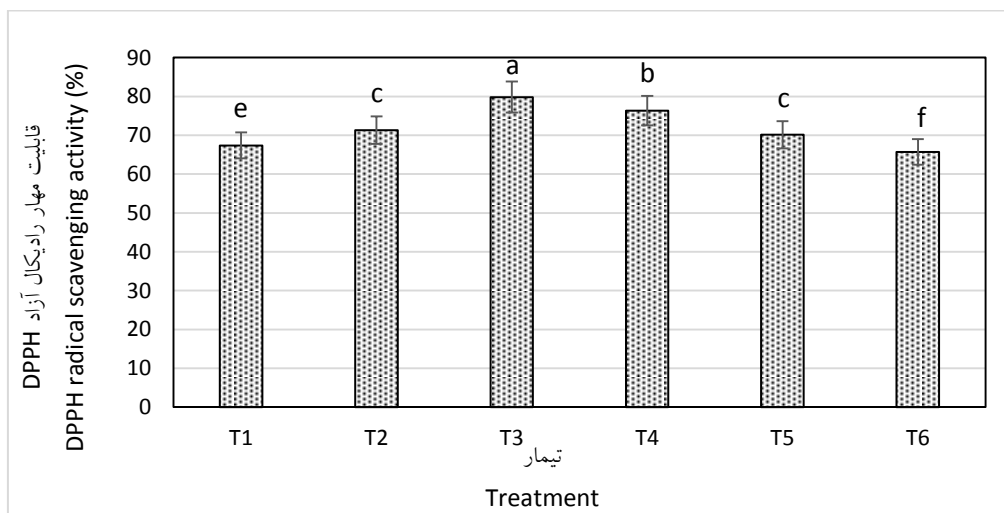
*حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح 95% است.

به عنوان زمان مناسب جهت هیدرولیز ترکیبی در مرحله بعدی انتخاب شد.

قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط هیدرولیز ترکیبی

قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH: قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۳ آورده شده است.

با توجه به نتایج حاصل از این دو آزمون آنتی اکسیدانی و بررسی تأثیر زمان و نوع آنزیم مشخص شد که زمان های هیدرولیز بالاتر موجب بروز قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتر در محصول تولیدی می گردند. با توجه به این که در این دو آزمون آنتی اکسیدانی بین زمان های ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی داری ملاحظه نشد و با توجه به لزوم استفاده از زمان های کوتاه تر به دلیل ملاحظات اقتصادی، زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه



شکل ۳- قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده *حروف متفاوت روی هر ستون نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح ۹۵٪ است.

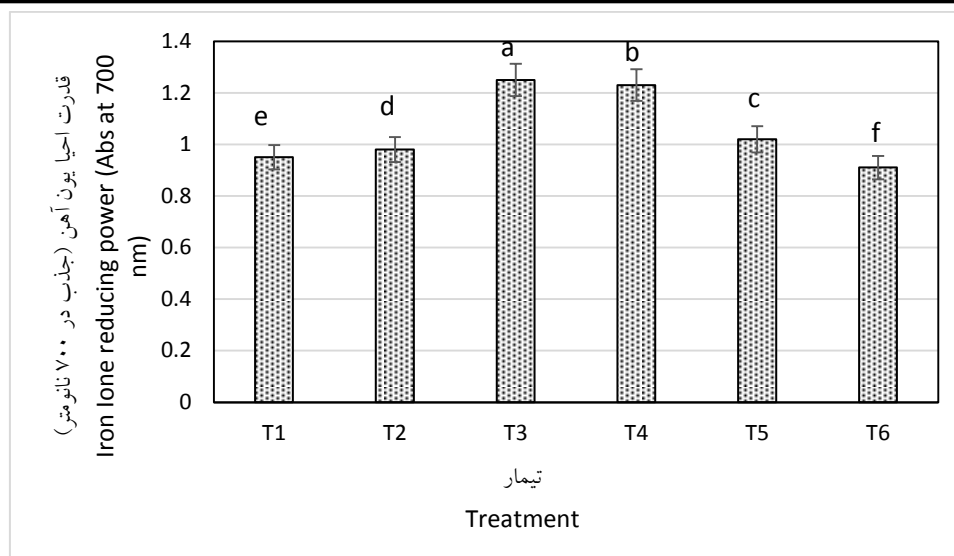
اسیدی در انتهای کربوکسیلی زنجیره، عمل هیدرولیز کند شده و در صورت وجود اسید آمینه پرولین این فرایند متوقف خواهد شد. مکانیزم عمل تریپسین مانند سایر پروتئازهای سرینی است. این آنزیم اثر خود را از طریق اسیدهای آمینه هیستیدین، آسپارژین و سرین موجود در محل فعال آنزیم اعمال می کند (۳۴). پپسین یک آنزیم هضم کننده از خانواده پروتئازهای آسپارتیک اسید و یکی از سه آنزیم اصلی فعال در سیستم هضم کننده بدن است. این آنزیم عمدتاً در شکستن پیوندهای پپتیدی در اسیدهای آمینه آروماتیک و آب گریز مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین مؤثر است (۳۵).

بر اساس نتایج، هیدرولیز ترکیبی منجر به بهبود قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت هیدرولیز ساده گردید. بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار ۳ (هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ۶۰ دقیقه) به میزان ۷۹/۸۵ درصد مشاهده شد. علت افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH می تواند ناشی از تفاوت در ترکیب، توالی و اندازهی متفاوت پپتیدهای حاصل از فعالیت ترکیبی دو آنزیم باشد (۲۷). تریپسین یک اندوپپتیداز به شمار می رود و پیوندهای پپتیدی را عمدتاً از داخل زنجیره می شکند. تریپسین پیوندهای پپتیدی را از انتهای کربوکسیلی اسیدهای آمینه لایزین و آرژنین می شکند اما در صورت وجود یک اسید آمینه

هر آنزیم از نظر رهائش اسیدهای آمینه خاص (لیپوفیل یا هیدروفیل) عملکرد متفاوتی دارد که این امر می‌تواند بر مهار رادیکال‌های آزاد و قابلیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی مؤثر باشد. پپتیدهای تولیدی می‌توانند به واسطه اهداء اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد فرآیند اکسیداسیون را متوقف یا کند نمایند همچنین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH به فعالیت هیدروژن‌دهندگی گروه هیدروکسیل آمینواسیدهای آروماتیک وابسته است بنابراین وجود و یا عدم وجود آمینواسیدهای مذکور در پپتیدها بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH متفاوت است. بنابراین شرایط مختلف هیدرولیز و عمل آنزیم‌های متفاوت در هیدرولیز پلی‌پپتیدها می‌تواند سبب ایجاد محصول هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت گردد (۳۶). با توجه به محل تأثیر متفاوت این دو آنزیم، به نظر می‌رسد که هیدرولیز ترکیبی باعث ایجاد مخلوط پپتیدی با توالی و ترکیب اسیدآمینه باقابلیت آنتی‌اکسیدانی مناسب گردیده است. بینگ و همکاران (۲۰۲۴) گزارش کردند که تأثیر آنزیمی پروتئازهای خاص بر روی مکان‌های متفاوت پروتئین منجر به تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌ها و عملکرد متفاوت می‌گردد (۲۹).

قدرت احیاء یون آهن: قدرت احیاء یون آهن تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در

مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۴ آورده شده است. بر اساس نتایج، قدرت احیاء یون آهن تیمارها در روش هیدرولیز ترکیبی نسبت به هیدرولیز ساده بالاتر بود. بالاترین میزان قدرت احیاء یون آهن در تیمار ۳ (هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ۶۰ دقیقه) به میزان ۱/۲۵ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. دلایل مختلفی برای این مساله ذکر گردیده است ازجمله، افزایش شدت هیدرولیز منجر به افزایش میزان اسیدهای آمینه آزاد می‌گردد که می‌توانند به عنوان منبع اضافی از پروتون‌ها و الکترون‌ها عمل نمایند. ازطرف دیگر پیشرفت هیدرولیز منجر به در معرض قرار گرفتن بیشتر اسیدهای آمینه دهنده الکترون مانند هیستیدین، تریپتوفان و لیزین می‌گردد در که نتیجه موجب افزایش قدرت احیاء کنندگی یون آهن می‌گردد (۳۷). آمبی گاپالان و همکاران (۲۰۱۵) پروتئین‌های آرد هسته خرما با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلاوورزایم (Flavourzyme) و ترمولیزین (Thermolysin) به صورت مجزا یا در ترکیب با هیدرولیز نمودند. در بین تیمارهای مختلف کمترین قدرت احیاء کنندگی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز بود درحالی‌که بیشترین قدرت احیاء در تیمارهای آنزیمی ترکیبی مشاهده شد (۳۸).



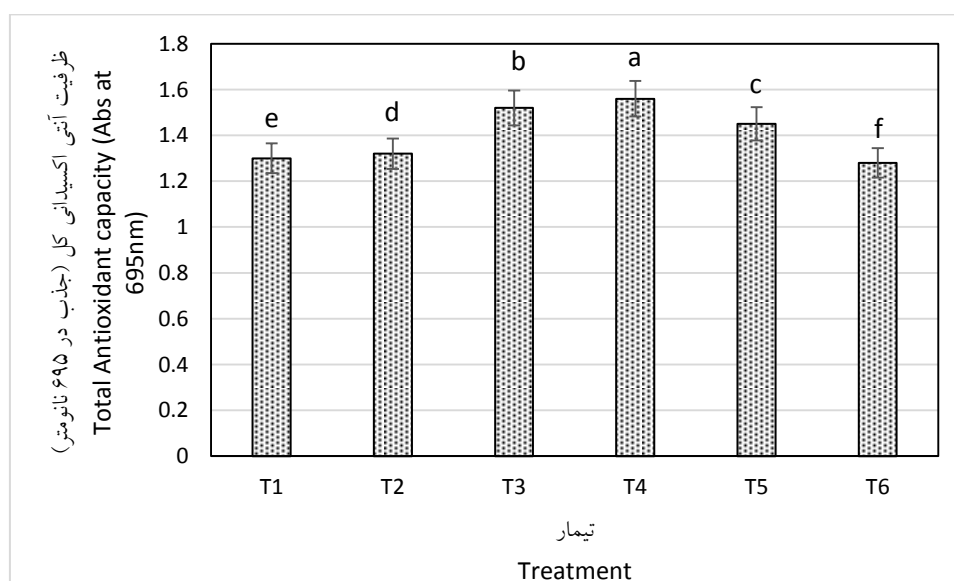
شکل ۴- قدرت احیاء یون آهن تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی دار در سطح ۹۵٪ است.

نتایج به دست آمده نشان داد که دو تیمار هیدرولیز ترکیبی با دو آنزیم پپسین و تریپسین (۳ و ۴) نسبت به هیدرولیز هرکدام (تیمار ۵ و ۶) به تنهایی فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری را دارد. درواقع با فعالیت توأم آنزیم های تریپسین و پپسین، رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهنده گی افزایش یافته است که این پپتیدها قادرند با رادیکال های آزاد واکنش داده و آنها را به ترکیباتی پایدار با واکنش پذیری کمتر تبدیل کنند (۲۶).

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۵ آورده شده است. بر اساس نتایج، هیدرولیز ترکیبی می تواند منجر به بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نسبت هیدرولیز ساده گردد. بالاترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمار ۴ (هیدرولیز با آنزیم پپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ۶۰ دقیقه) به میزان ۱/۵۶ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد.

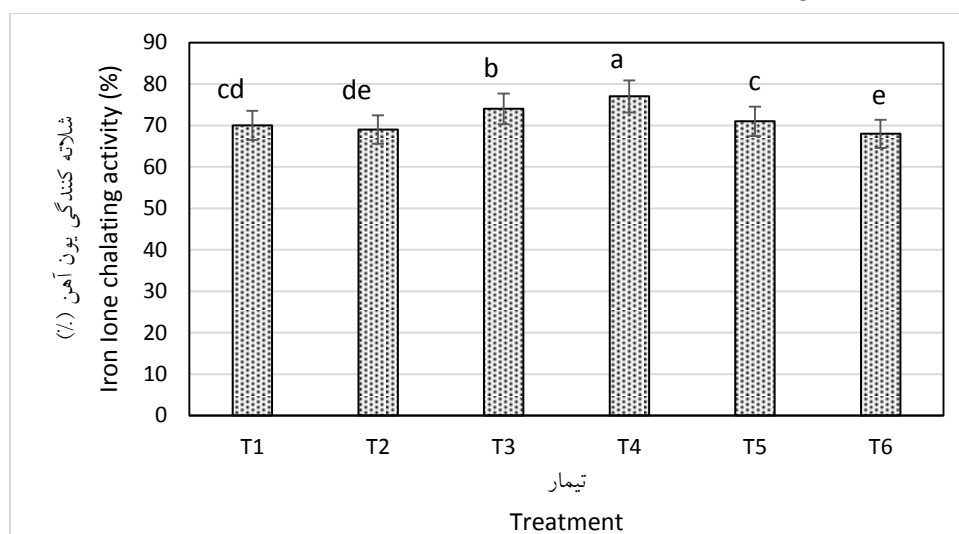


شکل ۵- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده
*حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

هیدرولیز شده‌های حاصل از یک آنزیم نسبت به هیدرولیزات حاصل از آنزیم‌های دیگر ممکن است در خصوص همه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و انواع رادیکال‌ها صدق نکند (۲۹) که این امر احتمالاً دلیل فعالیت بالاتر تیمار ۴ در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به دو آزمون قبلی (که تیمار ۳ بالاترین میزان را نشان داد) می‌باشد.

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن: فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۶ آورده شده است.

بر اساس پژوهش‌های پیشین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به ترکیب آن‌ها وابسته است. به عنوان مثال، تری پپتیدهای حاوی تریپتوفان یا تیروزین در انتهای کربوکسیل زنجیره پپتیدی قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی را نشان می‌دهند. تفاوت ترکیب آمینواسیدها در زنجیره‌های پپتیدی نیز سبب تغییر در ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۲۴، ۳۴). از آنجاکه هر آنزیم تأثیر متفاوتی بر آزادسازی اسیدهای آمینه خاص دارد و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد شده تأثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها دارد، در نتیجه فعالیت بالاتر در مهار برخی رادیکال‌های آزاد توسط



شکل ۶- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده
*حروف متفاوت روی هر ستون نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

پپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ۶۰ دقیقه) به میزان ۷۷ درصد مشاهده شد. قدرت شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل از برخی تیمارهای هیدرولیز ترکیبی بیشتر از هیدرولیز با هریک از آنزیم‌ها به تنهایی بود، درواقع این نتایج بیانگر این است که ترکیب مناسب (از نظر زمان و توالی استفاده)

براساس نتایج، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در تیمارهای ۳ و ۴ هیدرولیز ترکیبی نسبت مقادیر آن در تیمارهای هیدرولیز ساده بالاتر بود، هرچند بین تیمار ۱ و ۵ و همچنین بین تیمارهای ۲ و ۶ اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. بالاترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در تیمار ۴ (هیدرولیز با آنزیم

نتیجه گیری

بخش اعظم دانه های کدو به شکل آجیل مورد استفاده قرار می گیرند و بخشی از آن نیز جز ضایعات کشاورزی محسوب می شود. از آنجایی که این ضایعات از اهمیت تغذیه ای بالایی برخوردار هستند و دفع کردن آن ها از نظر زیست محیطی مشکل و از نظر اقتصادی هزینه بر می باشد و از طرفی با اتلاف مواد مغذی با ارزش نیز همراه است بنابراین تحقیقات زیادی در راستای تبدیل ضایعات تولید شده به محصولات مفید و استفاده از آن ها به عنوان ماده اولیه صنایع دیگر یا جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان صورت گرفته است. با توجه به این که آنزیم های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی های زیست فعالی محصول حاصل می گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی بر روی ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بود. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مورد استفاده تیمارهای هیدرولیز ترکیبی ۳ و ۴ در مقایسه با تیمارهای هیدرولیز ساده (۵ و ۶) قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری از خود نشان می دهند به طوری که بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار هیدرولیز ترکیبی ۴ و پایین ترین میزان آن ها در تیمار هیدرولیز ساده ۶ مشاهده شد. احتمالاً دلیل تأثیر بالاتر هیدرولیز ترکیبی دو آنزیم به دلیل تفاوت در میزان هیدرولیز و در نتیجه ایجاد پپتیدهای متفاوت از نظر اندازه، ترکیب و توالی می باشد به طوری که پپتیدهای حاصل از قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند.

آنزیم تریپسین با پپسین قادر به تولید پپتیدهایی با زنجیره ی جانبی متفاوت و با قابلیت به دام اندازی فلزات است. پپتیدهایی که در توالی خود دارای اسیدهای آمینه هیستیدین و تریپتوفان هستند به دلیل وجود حلقه ی ایمیدازول در این اسیدهای آمینه، توانایی به دام اندازی رادیکال های آزاد و شلاته کنندگی مناسبی دارند بنابراین احتمالاً هیدرولیز ترکیبی منجر به تولید پپتیدهایی با این ویژگی ترکیبی می گردد و به همین دلیل قدرت شلاته کنندگی یون آهن توسط آن ها افزایش یافته است. علاوه بر این کارایی شلاته کنندگی یون آهن در پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی را می توان به وجود گروه های آمینو و کربوکسیلیک (به ترتیب در شاخه های اسیدهای آمینه بازی و اسیدی) و حذف یون های پرواکسیدان فلزی از محیط نسبت داد (۳۹). در تحقیقی دیگر هیدرولیز آنزیمی پروتئین های موجود در آرد هسته خرما با استفاده از آنزیم های مختلف و ترکیب آن ها بررسی شد. نتایج نشان دادند که هیدرولیز شده های حاصل از فعالیت ترکیبی از آلکالاز، فلاووریزیم و ترمولیزین از کمترین قدرت شلاته کنندگی (۱۵ mM معادل EDTA بر گرم پروتئین) برخوردار بودند. اما استفاده از ترکیب آلکالاز، فلاووریزیم بالاترین اثر را (۷۲ mM معادل EDTA بر گرم پروتئین) در مهار یون آهن داشتند (۳۳). به طور کلی عوامل مؤثر در بهبود ویژگی شلاته کنندگی عبارتند از اندازه، ساختار و یا وجود توالی ویژه در پروتئین های هیدرولیز شده. در پژوهشی پیرامون هیدرولیز پروتئین بذرتان اثر نوع آنزیم بر شلاته کنندگی یون آهن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد شلاته کنندگی یون آهن در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم های آلکالاز و پانکراتین در بیشترین مقدار و در پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاووریزیم در کمترین مقدار بود (۴۰).

منابع

- 1 Xu X, Sharma, P, Shu S, Li TS, Ciaia P, Tubiello FN, Smith P, Campbell N, Hian AK. (2021). Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. *Nat Food*, 2, 724–732.
2. Wouters AGB, Rombouts I, Lagrain B, Delcour JA. (2016). Impact of casein and egg white proteins on the structure of wheat gluten-based protein-rich food. *J Sci Food Agric*, 96:757–63.
3. Lusk JL, Norwood FB. (2009). Some economic benefits and costs of vegetarianism. *Agr Resource Econ Rev*, 38:109–24.
4. Friedman M. (1999). Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *J Agric Food Chem*, 47:1295–319.
5. Garcia MC, Puchalska P, Esteve C, Marina ML. (2013). Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, 106:328–49.
6. Cheng, S., Tu, M., Liu, H., Zhao, G., Du, M. (2019). Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification, and interactions with thrombin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 59 (sup1), S81-S95.
7. Tung, Y. T., Chen, H. L., Wu, H. S., Ho, M. H., Chong, K. Y., Chen, C. M. (2018). Kefir peptides prevent hyperlipidemia and obesity in high-fat-diet-induced obese rats via lipid metabolism modulation. *Molecular Nutrition and Food Research*. 62(3): 1–9.
8. 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.
9. Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., & Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry*. 124(2):551-555.
10. Zapadka, K.L., Becher, F.J., Santos, A.L.G., Jackson, S.E., Jackson, S.E. (2017). Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Int. Focus*, 7 (6), 20170030.
11. Samaee, S.P., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., & Alami, M. (2021). Investigation of functional and antioxidant properties of faba bean protein hydrolysates using combines hydrolysis. *Food Processing and preservation Journal*. 12(2), 25-38. (In Persian).
12. Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chem.*, 102 (4), 1135-1143.
13. 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.
14. Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarondo, M. I., Hessini, K., Guéguen, J., Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *J. Agric. Food Chem.* 61 (32) 7715–7721.
15. Mazloomi, S.N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi, E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of Paper Skin Pumpkin Seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atherosclerosis*, 15: 218-227.
16. Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M. (2017). Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L.) oil cake protein, *Int J Food Prop*, 20:1-12.
17. Dyankova, S., et al. (2024). Optimization of the Process for Obtaining Antioxidant Protein Hydrolysates from Pumpkin Seed Oil Cake Using Response Surface Methodology. *Applied Sciences*, 14(5), 1967.

18. Lin, C. T., et al. (2024). Protein identification and potential bioactive peptides from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *Food Science & Nutrition*, 12(8), 5388-5402.
19. Association of Official Agricultural Chemists. (2003). Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
20. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G. F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *J Funct. Foods*, 15, 301-313.
21. 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 Chem.*, 114(4), 1198-1205.
22. Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analyt. Biochem*, 269(2), 337-341.
23. 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 Chem.*, 121(1): 178-184.
24. Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A. R., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *J Food Science and Technology*, 61 (13), 123-130. (in Persian).
25. Mazloomi, S. N., & Sadeghi Mahoonak, A. R. (2017). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *J Food Science and Technology*, 61(13), 123-130. (in Persian).
26. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovat Food Sci Emer Techn.*, 10(2): 235-240.
27. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., and Kumar, B. D. (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg. *Nutrition*, 31(2): 388-398.
28. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., and Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem.*, 45(1): 18-24.
29. Bing, S.-J., et al. (2024). Structural, functional and antioxidant properties of *Lentinus edodes* protein hydrolysates prepared by five enzymes. *Food Chemistry*, 437(1), 137805.
30. Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Hossieninan, F., Ghorbani, M., & Tsopmo, A. (2018). Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *J Food Sci Techn.*, 55: 3498–3507.
31. Nourmohammadi, E, Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M., Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 13 (1), 14-26.
32. Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Jafari, S.M., & Sarabandi, K. (2019). Coparision between antioxidant properties of fenugreek seed proptein hydrolysate prepared by alcalase and pancreatin. *Innovation in Food Science and Technology Journal*. 11 (4), 77-87. (in Persian)
33. Pan, X., Zhao, Y.-Q., Hu, F.-Y., and Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *J Func Foods*, 25:220-230.

34. Chen, Z., Li, W., Kumar, R., Cong, S., Xudong, W., Yue, G., Chunli, C., Xu, L., Chen, H., (2018). Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking study. *Eur. Food Res. Technol.*, 245 (3), 677–689.
35. Sun, J., He, H., Xie, J. B. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *J Agri Food Chem*, 21: 6646-6652.
36. Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M., and Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem.*, 109: 144-148.
37. Wu, H-C., Chen, H-M., and Shiau CY. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int*, 36: 949-57.
38. Ambigaipalan P, Al-Khalifa AS, Shahidi F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *J Funct Foods*, 18:1125–37.
39. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem.*, 118(2):403–10.
40. Karamac, M., Kosińska-Cagnazzo, A. and Kulczyk, A. (2016). Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int J of Molecu Sci.*, 17: 7.1027-1040.

