www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹۸، جلد ۸، شماره ۱، صفحات ۵۲-۴۵
DOI: 10.22101/JRIFST.2019.04.30.814

JRIFST

مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی

# بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیزشده با قابلیت ضداکسندگی بالا از کنجالهٔ کنجد به‌کمک روش سطح پاسخ

**عذرا موسوی نسب[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲*]، محمد قربانی[۲]، مهران اعلمی[۲]، نسیم مشگین‌فر[۳]**

۱-دانش‌آموختهٔ کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
* نویسندهٔ مسئول (sadeghiaz@gau.ac.ir)
۳- دانش‌آموختهٔ دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۵

**واژه‌های کلیدی**
بهینه‌سازی
پروتئین هیدرولیزشده
روش سطح پاسخ
کنجالهٔ کنجد
هیدرولیز آنزیمی

**چکیده**

هدف از این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیزشده از کنجالهٔ کنجد با بالاترین فعالیت ضداکسندگی توسط روش آماری سطح پاسخ بود. پروتئین کنجالهٔ کنجد، که یک محصول کم‌ارزش است و اغلب به مصرف دام می‌رسد را می‌توان ازطریق هیدرولیز آنزیمی، توسط آنزیم آلکالاز به پروتئین هیدرولیزشده باارزش افزودهٔ مناسب تبدیل نمود. فاکتورهایی که در این پژوهش جهت رسیدن به بیشترین میزان فعالیت ضداکسندگی بررسی شدند شامل: دما (۴۰-۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد)، زمان (۳۰-۱۸۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۱-۳ درصد) بودند. تأثیر این پارامترها به‌عنوان متغیر مستقل در هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال آزاد توسط معادلهٔ درجهٔ دوم برازش گردید. نتایج حاصل از بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیزشده براساس میزان مهار رادیکال دی فنیل ۲،۲ دی فنیل ۱، پیکریل هیدرازیل (DPPH) توسط روش سطح پاسخ نشان داد که مقادیر بهینه برای مهار رادیکال DPPH در دمای ۵۲/۰۷ درجهٔ سانتی‌گراد، زمان ۱۲۵/۴۹ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد به‌دست می‌آید. حداکثر مقادیر به‌دست‌آمده برای مهار رادیکال DPPH، ۶۶/۵ درصد بود. همچنین نتایج حاصل نشان داد که تولید پروتئین هیدرولیزشده به‌صورت مؤثری تحت‌تأثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هریک از فاکتورهای دما، زمان و مقدار آنزیم تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات محصول دارند و پروتئین هیدرولیزشدهٔ کنجالهٔ کنجد می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان ترکیب ضداکسندهٔ طبیعی داشته باشد.

## مقدمه

کنجد[۱] به خانوادهٔ پدالیاسه[۲] تعلق دارد و یکی از گیاهان زراعی باارزش است. بیشترین بخش کاربردی کنجد، دانهٔ آن است که علاوه‌بر چربی، حاوی پروتئین نیز می‌باشد (رستگار، ۱۳۸۴). ازطرفی کنجالهٔ دانهٔ کنجد و محصولات فرعی فرایندشده از آنها می‌تواند از لحاظ اقتصادی منبع مناسب و قابل توجیه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیزشده باشند. تحقیق‌های اخیر به سمتی پیش رفته است که علاوه‌بر محصولات باارزش مانند دانه‌های روغنی و روغن آنها، می‌توان از کنجاله پس از فرایند روغن‌کشی‌شدهٔ آنها که عموماً مورد استفادهٔ دام قرار می‌گیرد، استفادهٔ مجدد صورت گیرد (Chatterjee *et al.*, 2015).

[1] *Seseam Indicum*
[2] Pedaliaceae

پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ موادغذایی دارای خواص بیولوژیک بالایی می‌باشند که به‌صورت بالقوه در عملکرد و سلامت انسان استفاده می‌شوند و عملکردهایی نظیر کاهش‌دهندهٔ فشارخون، ضدسرطان ضداکسندگی، شلاته‌کنندگی، اثرات مثبت بر سیستم ایمنی بدن، ضدمیکروبی و غیره از خود بروز می‌دهند (Agyei *et al.*, 2016).

پپتیدهای زیست‌فعال که اجزای تشکیل‌دهندهٔ ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها هستند، اغلب از ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (Alaiz *et al.*, 1994). بااین‌حال پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می‌دهند (Sarmadi & Ismail, 2010). پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌عنوان اجزای پروتئینی موردبررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و پس از رهاشدن از زنجیرهٔ پروتئینی فعالیت‌های بیولوژیکی مشخصی از خود نشان می‌دهند. قابلیت ضداکسندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده به تأثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آنها در مهار رادیکال‌های آزاد دی‌فنیل ۲،۲ دی‌فنیل ۱، پیکریل هیدرازیل (DPPH[1])، عمل به‌عنوان شلاته‌کنندهٔ فلزات[2]، خاموش‌کنندهٔ اکسیژن یا اهداکنندهٔ هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیلهٔ تشکیل لایه‌ای در اطراف قطره‌های روغن می‌باشد (Li *et al.*, 2008).

به‌کارگیری تکنولوژی آنزیمی به‌منظور بازیابی و تغییرات پروتئینی سبب تولید طیف وسیعی از اجزای غذایی و محصولات صنعتی گردیده است. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های مواد غذایی روش مؤثر در بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال قوی می‌باشد و مشخص شده است که پروتئین‌های هیدرولیزشده با وزن مولکولی پایین، خواص عملکردی و زیست‌فعال بالاتری دارند و قابلیت استفاده در کاربردهای غذایی و دارویی دارند (Nalinanon *et al.*, 2011). همچنین مشخص گردیده است که پروتئین هیدرولیزشده از منابعی نظیر دانهٔ آلو (Amza *et al.*, 2013)، دانهٔ کاملیا (Li *et al.*, 2015)، خزهٔ دریایی (Sheih *et al.*, 2009)، بادام‌زمینی (Tang *et al.*, 2012)، دانهٔ لوبیاسبز آفریقایی (Ajibola *et al.*, 2011)، سویا (Chen *et al.*, 1995) و فعالیت ضداکسندگی از خود نشان می‌دهند.

روش سطح پاسخ[3] روشی مفید جهت بهینه‌سازی فرایندهای غذایی می‌باشد (Diniz & Martin ,1996). مشگین‌فر (۱۳۹۱) از روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط فرایند هیدرولیز پروتئین روده و معدهٔ گوسفند با استفاده از آنزیم آلکالاز (۲/۴ واحد بر گرم) استفاده نمود. نتایج حاصل از تجزیهٔ شیمیایی پروتئین هیدرولیزشده، محتوی بالای پروتئین (۸۳/۷۸ درصد) و میزان بسیار کم چربی (۰/۳۴ درصد) و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا را در این محصول نشان داد.

مهرگان‌نیکو و همکاران (۱۳۹۲) اثر هیدرولیز پروتئین ماهی کاراس[4] توسط آنزیم آلکالاز را بهینه نمود و همچنین شرایط هیدرولیز جهت دستیابی به بیشترین درجهٔ هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش سطح پاسخ را موردبررسی قرار داد. نتایج نشان داد که بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده در زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به‌دست آمد که در مقایسه با اسید آسکوربیک ۱۰۰ پی.پی.ام، ۶۷/۳۲ درصد قدرت احیاکنندگی از خود نشان داد.

تجزیه‌وتحلیل سطح پاسخ اثرات بین متغیرهای مستقل را به‌تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید و این روش می‌تواند مدلی ریاضی که کل فرایند را توصیف می‌کند را ایجاد کند (Sumaya-Martínez *et al.*, 2005). هدف از این پژوهش تجزیه‌وتحلیل پاسخ اثرات ترکیبی دما، زمان و نسبت آنزیم بر فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیزشدهٔ کنجالهٔ کنجد با استفاده از آنزیم آلکالاز بود.

## مواد و روش‌ها

### مواد خام اولیه

کنجالهٔ کنجد از کارخانه روغن‌کشی دانه‌های روغنی ورژن واقع در شهرک صنعتی اطراف گرگان خریداری شد و پس از چربی‌زدایی کامل توسط هگزان به آزمایشگاه تجزیهٔ مواد غذایی دانشگاه گرگان منتقل گردید. آنزیم آلکالاز (با فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) (یک اندوپروتئیناز گرفته‌شده از باکتری *باسیلوس لیکنی*

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl
[2] Chelating
[3] Response Surface Methodology
[4] *Carassius Carassius*

فورمیس[1])، از شرکت نووزایم (دانمارک) خریداری و تا شروع آزمایش در دمای ۴ درجهٔ سانتی‌گراد در یخچال نگهداری شد. سدیم هیدروکسید و هیدروکلریدریک اسید از شرکت مرک آلمان و معرف DPPH از شرکت سیگما تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجهٔ آزمایشگاهی برخوردار بودند.

**تولید ایزولهٔ پروتئینی**

به‌منظور تهیهٔ پروتئین هیدرولیزشده، کنجالهٔ کنجد پس از چربی‌زدایی با هگزان، به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی/حجمی با آب‌مقطر رقیق و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰-۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد در pH معادل ۹/۵ (توسط سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال) قرار گرفت. سپس به‌منظور حذف بخش نامحلول به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Combi-514R، شرکت هانیل، ساخت کره‌جنوبی) با دمای ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد، با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن سوپرناتانت حاصل جهت رسوب در نقطهٔ ایزوالکتریک به pH معادل ۴/۹ (توسط هیدروکلریدریک اسید ۰/۱ نرمال) رسانده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت که دراین‌صورت مواد به ۳ فاز تقسیم شدند که فاز اول را چربی، فاز میانی را آب و فاز انتهایی را پروتئین تشکیل می‌داد. درنهایت محتوی پروتئین جداشده جهت آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری شد (Chatterjee *et al*., 2015).

**تهیهٔ پروتئین هیدرولیزشده**

جهت انجام فرایند هیدرولیز، ابتدا نمونهٔ پروتئینی به نسبت ۱ به ۱۰ با آب‌مقطر رقیق و سپس با بافر تریس-اسیدی هیدروکلریدریک[2] به نسبت وزنی/حجمی ۱ به ۲ مخلوط گشته و به حالت سوسپانسیون یکنواخت و pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز درآمد (pH=۸). سپس آنزیم در محدودهٔ غلظتی ۱-۳ درصد به ارلن‌های حاوی نمونه اضافه گردید. واکنش‌های هیدرولیز در انکوباتور لرزشی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در محدودهٔ دمایی ۴۰-۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد و محدودهٔ زمانی ۳۰-۱۸۰ دقیقه انجام شد (مشگین‌فر، ۱۳۹۱). در انتها به‌منظور حصول اطمینان از غیرفعال‌شدن آنزیم، سوسپانسیون در حمام آب‌گرم در دمای ۸۵ درجهٔ سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و دمای مخلوط با استفاده از حمام آب‌یخ سریعاً کاهش یافت و درنهایت جهت به‌دست‌آوردن محلول پروتئین هیدرولیزشده، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۰ درجهٔ سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور ۷۶۰۰×g سانتریفیوژ شد (Taheri *et al*., 2011) و مایع رویی حاصل با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید.

**اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی**

**آزمون‌های کنجالهٔ کنجد**

تعیین ترکیبات شیمیایی، شامل اندازه‌گیری رطوبت، خاکستر (پروانه، ۱۳۸۵) و اندازه‌گیری پروتئین طبق روش کلدال (AOAC, 2008) صورت گرفت. نمونهٔ کنجالهٔ کنجد شامل: ۶/۶ درصد رطوبت، ۹/۲۵ درصد خاکستر و ۴۳/۴۹ درصد پروتئین بود.

**اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH**

برای این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۱۰۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱ میلی‌مولار)، تهیه‌شده توسط اتانول ۹۹/۵ درصد مخلوط و سپس به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار داده و جذب رادیکال DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (پی‌جی اینسترومنت مدل T80، ساخت انگلستان) اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد باتوجه‌به رابطهٔ (۱) محاسبه گردید.

رابطهٔ (۱)

$$\text{فعالیت زدودن رادیکال آزاد} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

نمونهٔ کنترل به‌همان‌طریق تهیه شد، با این تفاوت که به‌جای نمونه از آب‌مقطر استفاده گردید. جذب کمتر مخلوط نشان‌دهندهٔ فعالیت مهار رادیکال DPPH بالاتر می‌باشد (Bougatef *et al*., 2009).

**بهینه‌سازی شرایط آزمایش**

به‌منظور بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیزشده از روش سطح پاسخ با طراحی مرکب مرکزی استفاده شد. ۳ متغیر دما ($X_1$)، زمان ($X_2$) و نسبت آنزیم به سوبسترا ($X_3$) به‌عنوان متغیرهای مستقل در سه سطح (۱+، ۰ و ۱-) مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱).

[1] Bacillus licheniformis
[2] Tris-Hcl

**جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیزشدهٔ کنجالهٔ کنجد**

| متغیرهای مستقل | سطوح و درصد متغیرها | | |
|---|---|---|---|
| | +۱ | ۰ | -۱ |
| دما (درجهٔ سانتی‌گراد) | ۵۵ | ۴۷/۵۰ | ۴۰ |
| زمان (دقیقه) | ۱۸۰ | ۱۰۵ | ۳۰ |
| نسبت آنزیم به سوبسترا | ۳ | ۲ | ۱ |

تیمارهای آزمایشی و طراحی آنها در جدول (۲) ارائه شده است. فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH) به‌عنوان متغیر وابسته در نظر گرفته شد و اثر متغیرهای مستقل روی این پاسخ بررسی شد. به‌منظور بهینه‌سازی فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیزشده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به‌این‌منظور طرح مرکب مرکزی با ۳ سطح (۱+، ۰ و ۱-) و ۶ تکرار در نقطهٔ مرکزی مورد استفاده قرار گرفت.

**جدول ۲- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح تعیین‌شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیزشدهٔ کنجالهٔ کنجد**

| شماره تیمار | زمان ($X_1$) | دما ($X_2$) | فعالیت آنزیمی ($X_3$) |
|---|---|---|---|
| ۱ | ۳۰ | ۴۰/۰۰ | ۳ |
| ۲ | ۱۸۰ | ۵۵/۰۰ | ۱ |
| ۳ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۴ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۵ | ۱۰۵ | ۴۰/۰۰ | ۲ |
| ۶ | ۱۰۵ | ۵۵/۰۰ | ۲ |
| ۷ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۳ |
| ۸ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۱ |
| ۹ | ۱۸۰ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۰ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۱ | ۱۸۰ | ۴۰/۰۰ | ۱ |
| ۱۲ | ۳۰ | ۵۵/۰۰ | ۳ |
| ۱۳ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۴ | ۳۰ | ۴۰/۰۰ | ۱ |
| ۱۵ | ۳۰ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۶ | ۱۸۰ | ۴۰/۰۰ | ۳ |
| ۱۷ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۸ | ۱۰۵ | ۴۷/۵۰ | ۲ |
| ۱۹ | ۱۸۰ | ۵۵/۰۰ | ۳ |
| ۲۰ | ۳۰ | ۵۵/۰۰ | ۱ |

## بحث و نتایج

### آنالیز سطح پاسخ

نتایج تجزیهٔ واریانس برای متغیر مهار رادیکال آزاد (DPPH) در جدول (۳) و نتایج مربوط به ارزیابی هر یک از مدل‌ها در جدول (۴) ارائه شده است. نتایج جدول (۳) نشان می‌دهد که تأثیر هرکدام از متغیرهای دما، زمان و میزان آنزیم بر میزان پاسخ‌ها معنی‌دار می‌باشد ($P$<۰/۰۵).

**جدول ۳- ضرایب مدل برای درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)**

| | ضریب رگرسیون (DPPH) |
|---|---|
| مدل | ۸۰۸/۲۹** |
| $X_1$ (زمان) | -۰/۱۱* |
| $X_2$ (دما) | -۳۶/۵۳** |
| $X_3$ (نسبت) | -۱۳/۳۹* |
| $X_1^2$ | ۵/۲۵ns |
| $X_2^2$ | ۰/۴۱** |
| $X_3^2$ | -۰/۶۲ns |
| $X_1X_2$ | ۰/۰۰ns |
| $X_1X_3$ | -۰/۰۳ns |
| $X_2X_3$ | ۰/۴۶* |

* معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($P$<۰/۰۵)، ** معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد ($P$<۰/۰۱) و ns: غیرمعنی‌دار

رابطهٔ (۲)، روابط بین پاسخ (قابلیت جذب رادیکال آزاد) و پارامترهای هیدرولیز (دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) را نشان می‌دهد.

رابطهٔ (۲)

$$DPPH=808.296-0.1146\times Time-36.515\times temp-13.3927\times e/s+04062\times temp^2+0.004464\times time\times temp-0.03178\times time\times e/s+0.460500\times temp\times e/s$$

رابطهٔ (۲)، بیانگر این است که رابطهٔ بین مهار رادیکال آزاد (DPPH) با پارامترهای هیدرولیز از نوع درجهٔ دوم است و نتایج مربوط به جدول (۴) نشان می‌دهد که ضریب همبستگی $R^2$[1] برای مدل (۰/۹۷۷) به‌دست آمد و این نشان‌دهندهٔ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی شرایط واکنش می‌باشد. همچنین عدم برازش مدل، معنی‌دار نشد ($P$>0/05) و این نشان‌دهندهٔ مناسب‌بودن مدل برای این آزمایش می‌باشد.

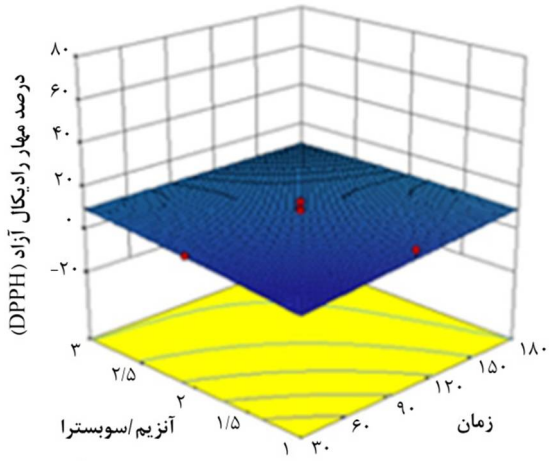
[1] Quadratic Polynomial Model

**جدول ۴- نتایج تجزیهٔ واریانس برای مدل درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH)**

| DPPH | |
|---|---|
| ضریب رگرسیون | عدد |
| Lack of fitness | ۰/۲۱ |
| $R^2$-pred | ۰/۹۳ |
| $R^2$-Adj | ۰/۹۸ |

به جهت تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی جهت حصول بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد (DPPH)، نمودارهای سه‌بعدی سطحی برای متغیرها در شکل (۱) تا (۳) ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر روی پاسخ را در زمانی که متغیر سوم در شرایط بهینه قرار داده شده است، نشان می‌دهد.

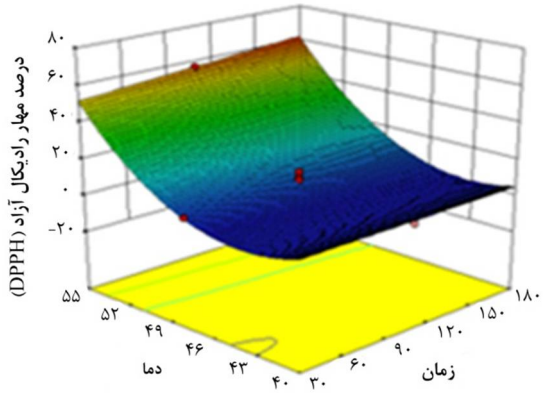
همان‌طورکه در شکل (۱) دیده می‌شود با افزایش زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا، میزان فعالیت ضداکسندگی مقدار اندکی افزایش یافت. نتایج شکل (۱) نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم در یک زمان ثابت نیز در تغییرات فعالیت ضداکسندگی اثر داشته است. توجیه تغییرات فعالیت ضداکسندگی با گذشت زمان مربوط به تغییر طول زنجیرهٔ پپتیدی با افزایش میزان هیدرولیز است. همچنین بسیاری از پژوهش‌ها ثابت کرده است که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر، فعالیت ضداکسندگی بالاتری از خود نشان می‌دهند (Rajapakse *et al.*, 2005).




**شکل ۱- نمودار سه‌بُعدی تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) در نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان‌های مورد آزمایش**

نتایج حاصل از پژوهش مشگین‌فر (۱۳۹۱) نشان داد که فعالیت مهار رادیکال[1] آزاد با پیشرفت زمان هیدرولیز به مقدار مشخصی رسیده و سپس از میزان آن کاسته شد. همچنین پژوهش نورمحمدی همکاران (۱۳۹۶) نشان داد که خاصیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیزشدهٔ دانهٔ کدو در ابتدا کاهش و سپس افزایش چشمگیری داشته است.

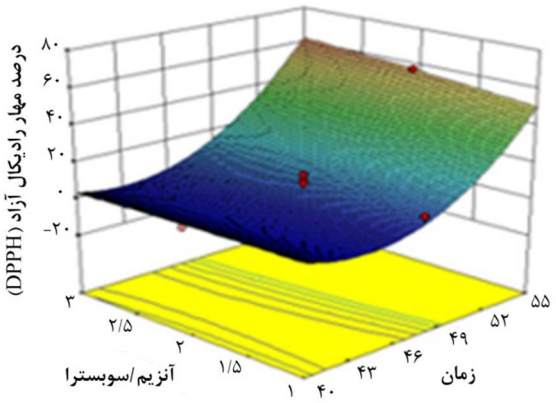
شکل (۲) تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) در دماها و زمان‌های مورد آزمایش را نشان می‌دهد. براساس نتایج متغیر دما در نواحی بالاتر از ۴۹ درجهٔ سانتی‌گراد بیشترین اثر را در مهار رادیکال آزاد (DPPH) داشته درحالی‌که افزایش زمان پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه اثر بیشتری را نشان می‌دهد. تغییر در اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز، میزان فعالیت ضداکسندگی را تحت‌تأثیر قرار می‌دهند (Wu *et al.*, 2003).




**شکل ۲- نمودار سه‌بُعدی تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) در دما و زمان‌های مورد آزمایش**

شکل (۳) که بیانگر تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) در نسبت آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش است، بیان می‌کند که افزایش دما از محدودهٔ میانی به بالا تأثیر بالاتری در مهار رادیکال آزاد (DPPH) داشته و نسبت آنزیم نیز از ناحیهٔ میانی به بالا موجب افزایش مهار رادیکال آزاد (DPPH) می‌شود.

[1] Inhibition of Radicals




**شکل ۳- نمودار سهُبعدی تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) در نسبت آنزیم به سوبسترا و دماهای مورد آزمایش**

### بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل

بیشترین میزان پیش‌بینی‌شده توسط مدل برای درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) ۶۵/۳۷ درصد بود. شرایط بهینهٔ ارائه‌شده توسط مدل برای مهار رادیکال (DPPH) دمای ۵۵ درجهٔ سانتی‌گراد، زمان۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد بود. تهیهٔ پروتئین هیدرولیزشده در شرایط بهینهٔ ارائه‌شده توسط مدل به‌صورت آزمایشی انجام و نتیجه با مقدار پیش‌بینی‌شده مقایسه گردید. نتایج حاصل از آزمایش انجام‌شده نشان داد که بین مقدار پیش‌بینی‌شده و مقدار به‌دست‌آمده حاصل از انجام آزمون اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و در این شرایط برای درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH) ۶۶/۵۰ درصد به‌دست آمد که این بیانگر توانایی مناسب مدل در پیش‌بینی اثر سه متغیر دما، زمان و نسبت آنزیم بر هیدرولیز پروتئین می‌باشد.

## نتیجه‌گیری

تولید پروتئین هیدرولیزشده چندین هدف مختلف را دنبال می‌کند که مهم‌ترین آنها استفادهٔ بهینه از بخش پروتئینی مواد غذایی می‌باشد. امروزه پیشرفت در تکنولوژی، امکان استفاده از منابع پروتئینی مختلف و غیرقابل دسترس را فراهم کرده است.

در این مطالعه تولید پروتئین هیدرولیزشده با خاصیت ضداکسندگی بالا از کنجالهٔ کنجد با استفاده از آنزیم آلکالاز توسط روش سطح پاسخ صورت پذیرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که فاکتورهای دما، زمان و آنزیم تحت شرایط واکنش تأثیر معنی‌داری بر کیفیت محصول هیدرولیزشده دارند. این پروتئین‌های هیدرولیزشده می‌توانند به‌عنوان ضداکسندهٔ طبیعی در فرمولاسیون غذایی و دارویی به‌کارگرفته شوند.

## منابع


پروانه، و. ۱۳۸۵. کنترل کیفی و آزمایش‌های شیمیایی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران، ۳۳۲ صفحه.

رستگار، م.ع. ۱۳۸۴. زراعت گیاهان صنعتی، انتشارات برهمند نوبت چاپ اول، ۴۸۰ صفحه.

مشگین‌فر، ن. ۱۳۹۱. تهیهٔ پروتئین هیدرولیزشده از فراورده‌های جانبی صنایع گوشت و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن. پایان‌نامهٔ کارشناسی ارشد، دانشکده کشاورزی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

مهرگان نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، م.، طاهری، غ.، اعلمی، م. و کمالی، ف. ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassiu*). نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۲(۴):۳۵۱-۳۶۴.

نورمحمدی، ا.، صادقی ماهونک، ع.، اعلمی، م.، قربانی، م. و صادقی، م. ۱۳۹۶. بهینه‌سازی هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو با آلکالاز جهت دستیابی به بیشینه ویژگی ضداکسایشی. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۹(۱):۱-۱۲.

Agyei, D., Ongkudon, C.M., Wei, C.Y., Chan, A.S., & Danquah, M.K. 2016. Bioprocess chellanges to the isolation and purification of bioactive peptides. Food and Bioproducts Processing, 98: 244-256.

Ajibola, C.F., Fashakin, J.B., Fagbemi, T.N., & Aluko, R.E. 2011. Effect of peptide size on antioxidant properties of African yam bean seed (*sphenostylis stenocarpa*) protein hydrolysate fractions. International Journal of Molecular Sciences, 12(10): 6685-6702.

Alaiz, M., Beppu, M., Ohishi, K., & Kikugawa, K. 1994. Modification of delipidated apoprotein B of low density lipoprotein by lipid oxidation products in relation to macrophage scavenger receptor binding. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 17(1):51-57.

Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., & Zhou, H.M. 2013. Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*neocarya macrophylla*) seeds. International Food Research Journal, 20(5): 2081-2090.

AOAC. 2008. Official methods of analysis, 18th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington, DC.

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.

Chatterjee, R., Day, T.K., Ghosh, M., & Dhar, P. 2015. Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. Food and Bioproducts Processing, 94: 70-81

Chen, H.M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean. beta.-conglycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43(3): 574-578.

Diniz, F.M., & Martin, A.M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*squalus acanthias*) muscle. International Journal of Food Science & Technology, 31(5): 419-426.

Li, X., Deng, J., Shen, S., Li, T., Yuan, M., Yang, R., & Ding, C. 2015. Antioxidant activities and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from defatted Camellia oleifera seed cake. Journal of Food Science and Technology, 52(9): 5681-5690.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry, 106(2): 444-450.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chemistry, 124(4): 1354-1362.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., & Kim, S.K. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. The Journal of Nutritional Biochemistry, 16(9): 562-569.

Sarmadi, B.H, & Ismail, A. 2010. Antioxidative peptide from food proteins: a review. Peptides, 31:1949-1956.

Sheih, I.C., Wu, T.K., & Fang, T.J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology, 100(13):3419-3425.

Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., & Prado-Barragán, L.A. 2005. Fish protein hydrolysates from gold carp (*carassius auratus*): I. a study of hydrolysis parameters using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85(1): 98-104.

Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., & Habibi Rezaie, M. 2011. Optimization of goldstripe sardine (*sardinella gibbosa*) protein hydrolysate using alcalase® 2.4 L by response surface methodology optimización de hidrolisato de proteína de sardinela dorada (*sardinella gibbosa*) usando alcalase® 2.4 L a través de RSM. CyTA-Journal of Food, 9(2): 114-120.

Tang, L., Sun, J., Zhang, H.C., Zhang, C.S., Yu, L.N., Bi, J., Zhu, F., Liu, S.F.,& Yang, Q.L. 2012. Evaluation of physicochemical and antioxidant properties of peanut protein hydrolysate. PlOS ONE, 7(5): e37863.

Wu, H.C., Chen, H.M., & 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(9-10): 949-957.

# The Optimization of Hydrolyzed Protein Production with High Anti-Oxidation Ability from Sesame Meal by Response Surface Methodology

**Azra Mousavi Nasab[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2*], Mohammad Ghorbani[2], Mehran Alami[2], Nasim Meshginfar[3]**

1. Msc. Graduate, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author (sadeghiaz@gau.ac.ir)
3- PhD. Graduate, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

## Abstract

The purpose of this study was to produce a hydrolyzed protein from sesame seed meal using response surface methodology (RSM).The sesame meal protein is a low-value product, often used for feeding animals, but it can be hydrolyzed to protein hydrolysate with high nutritional value using alkalase enzyme. The factors that were considered in this study to achieve the highest level of antioxidant activity were temperature (40-55 °C), time (30-180 min) and ratio of enzyme to substrate (1-3%) whose effects, as 3 independent variables, were evaluated on DPPH free radical scavenging activity and this effect fitted by quadratic equation. The results showed that optimal conditions for reaching the highest antioxidant activity were temperature 52.07 °C, time 125.49 min and ratio of enzyme to substrate was 3% and under this condition DPPH free radical scavenging activity was 66.5%. Also, the results showed that the production of hydrolyzed protein was highly affected by the hydrolysis conditions, so different hydrolysis conditions including time, temperature and enzyme to substrate ratio showed significant effect on the properties of final hydrolyzed product. The results showed that hydrolyzed sesame protein can be used in food formulation as a natural antioxidant.

**Keywords**: Enzyme Hydrolysis, Hydrolyzed Protein, Optimization, Response Surface Method, Sesame Meal