

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده با قابلیت ضد اکسندگی بالا از کنجاله کنجد به کمک روش سطح پاسخ

عذرا موسوی نسب^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۲، مهران اعلمی^۲، نسیم مشگین فر^۳

۱- دانش‌آموخته 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

* نویسنده مسئول (sadeghiaz@gau.ac.ir)

۳- دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

هدف از این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده از کنجاله کنجد با بالاترین فعالیت ضد اکسندگی توسط روش آماری سطح پاسخ بود. پروتئین کنجاله کنجد، که یک محصول کم ارزش است و اغلب به مصرف دام می‌رسد را می‌توان از طریق هیدرولیز آنزیمی، توسط آنزیم آلکالاز به پروتئین هیدرولیز شده با ارزش افزوده مناسب تبدیل نمود. فاکتورهایی که در این پژوهش جهت رسیدن به بیشترین میزان فعالیت ضد اکسندگی بررسی شدند شامل: دما (۴۰-۵۵ درجه 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 معادله درجه دوم برازش گردید. نتایج حاصل از بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیز شده بر اساس 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 درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۲۵/۴۹ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد به دست می‌آید. حداکثر مقادیر به دست آمده برای مهار رادیکال DPPH، ۶۶/۵ درصد بود. همچنین نتایج حاصل نشان داد که تولید پروتئین هیدرولیز شده به صورت مؤثری تحت تأثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هریک از فاکتورهای دما، زمان و مقدار آنزیم تأثیر معنی‌داری بر خصوصیات محصول دارند و پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان ترکیب ضد اکسندگی طبیعی داشته باشد.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۴/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۵

واژه‌های کلیدی

بهینه‌سازی
پروتئین هیدرولیز شده
روش سطح پاسخ
کنجاله کنجد
هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

اقتصادی منبع مناسب و قابل توجه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده باشند. تحقیقات اخیر به سمتی پیش رفته است که علاوه بر محصولات با ارزش مانند دانه‌های روغنی و روغن آنها، می‌توان از کنجاله پس از فرایند روغن‌کشی شده آنها که عموماً مورد استفاده دام قرار می‌گیرد، استفاده مجدد صورت گیرد (Chatterjee, Dey, Ghosh, & Dhar, 2015).

کنجد^۱ به خانواده پدالیاسه^۲ تعلق دارد و یکی از گیاهان زراعی با ارزش است. بیشترین بخش کاربردی کنجد، دانه آن است که علاوه بر چربی، حاوی پروتئین نیز می‌باشد (Rastegar, 2005). از طرفی کنجاله دانه کنجد و محصولات فرعی فرایند شده از آنها می‌تواند از لحاظ

¹ *Sesam Indicum*

² Pedaliaceae

پروتئین‌های هیدرولیزشده مواد غذایی دارای خواص بیولوژیک بالایی می‌باشند که به صورت بالقوه در عملکرد و سلامت انسان استفاده می‌شوند و عملکردهایی نظیر کاهش‌دهنده فشارخون، ضدسرطان ضداکسندگی، شلاته‌کنندگی، اثرات مثبت بر سیستم ایمنی بدن، ضد میکروبی و غیره از خود بروز می‌دهند (Agyei, 2016; Ongkudon, Wei, Chan, & Danquah, 2016).

پپتیدهای زیست‌فعال که اجزای تشکیل‌دهنده ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها هستند، اغلب از ۲ تا ۲۰ اسیدآمینو تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (Alaiz, Beppu, Ohishi, & Kikugawa, 1994). با این حال پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می‌دهند (Sarmadi & Ismail, 2010). پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌عنوان اجزای پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و پس از رهاسدن از زنجیره 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^۱)، عمل به‌عنوان شلاته‌کننده فلزات^۲، خاموش‌کننده اکسیژن یا اهداکننده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطره‌های روغن می‌باشد (Li, Jiang, Zhang, Mu, & Liu, 2008).

پپتیدهای زیست‌فعال که اجزای تشکیل‌دهنده ترکیبات حاصل از هیدرولیز پروتئین‌ها هستند، اغلب از ۲ تا ۲۰ اسیدآمینو تشکیل شده‌اند و جرم مولکولی آنها کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشد (Alaiz, Beppu, Ohishi, & Kikugawa, 1994). با این حال پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می‌دهند (Sarmadi & Ismail, 2010). پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌عنوان اجزای پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و پس از رهاسدن از زنجیره 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^۱)، عمل به‌عنوان شلاته‌کننده فلزات^۲، خاموش‌کننده اکسیژن یا اهداکننده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطره‌های روغن می‌باشد (Li, Jiang, Zhang, Mu, & Liu, 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, Benjakul, Kishimura, & Shahidi, 2011). همچنین مشخص گردیده است که پروتئین هیدرولیزشده از منابعی نظیر دانه آلو (Amza, Balla, Tounkara, Man, & Zhou, 2013)، دانه کاملیا (Li et al., 2015)، خزّه دریایی (Sheih, Wu, & ...)

مواد و روش‌ها

مواد خام اولیه

کنجاله کنجد از کارخانه روغن‌کشی دانه‌های روغنی ورژن واقع در شهرک صنعتی اطراف گرگان خریداری شد و پس از چربی‌زدایی کامل توسط هگزان به آزمایشگاه تجزیه مواد غذایی دانشگاه گرگان منتقل گردید. آنزیم آلکالاز (با

³ Response Surface Methodology

⁴ *Carassius Carassius*

¹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

² Chelating

غیرفعال شدن آنزیم، سوسپانسیون در حمام آب گرم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت و دمای مخلوط با استفاده از حمام آب یخ سریعاً کاهش یافت و در نهایت جهت به دست آوردن محلول پروتئین هیدرولیز شده، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال دار با دور $7600 \times g$ سانتریفیوژ شد (Taheri, Abedian Kenari, Motamedzadegan, & Habibi, 2011) و مایع رویی حاصل با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی آزمون‌های کنجالة کنجد

تعیین ترکیبات شیمیایی، شامل اندازه‌گیری رطوبت، خاکستر (Parvaneh, 2006) و اندازه‌گیری پروتئین طبق روش کلدال (AOAC, 2008) صورت گرفت. نمونه کنجالة 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)، تهیه شده توسط اتانول ۹۹/۵ درصد مخلوط و سپس به مدت 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 باتوجه به رابطه (۱) محاسبه گردید.

رابطه (۱)

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} = \text{فعالیت زدودن رادیکال آزاد}$$

نمونه کنترل به همان طریق تهیه شد، با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. جذب کمتر مخلوط نشان دهنده فعالیت مهار رادیکال DPPH بالاتر می‌باشد (Bougatef et al., 2009).

بهینه‌سازی شرایط آزمایش

به منظور بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده 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) به عنوان متغیرهای مستقل در سه سطح (+۱، ۰ و -۱) مورد آزمایش قرار گرفتند (جدول ۱).

فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) (یک اندوپروتئیناز گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس^۱)، از شرکت نووزایم (دانمارک) خریداری و تا شروع آزمایش در دمای ۴ درجه 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 درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تولید ایزوله پروتئینی

به منظور تهیه پروتئین هیدرولیز شده، کنجالة کنجد پس از چربی‌زدایی با هگزان، به نسبت ۱ به ۱۰ وزنی/حجمی با آب مقطر رقیق و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد در pH معادل ۹/۵ (توسط سدیم هیدروکسید ۰/۱ نرمال) قرار گرفت. سپس به منظور حذف بخش نامحلول به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدل Combi-514R، شرکت هانیل، ساخت کره جنوبی) با دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، با دور ۴۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ گردید. پس از آن سوپرناتانت حاصل جهت رسوب در نقطه ایزوالکتریک به pH معادل ۴/۹ (توسط هیدروکلریدریک اسید ۰/۱ نرمال) رسانده شد و به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه قرار گرفت که در این صورت مواد به ۳ فاز تقسیم شدند که فاز اول را چربی، فاز میانی را آب و فاز انتهایی را پروتئین تشکیل می‌داد. در نهایت محتوی پروتئین جدا شده جهت آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری شد (Chatterjee et al., 2015).

تهیه پروتئین هیدرولیز شده

جهت انجام فرایند هیدرولیز، ابتدا نمونه پروتئینی به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق و سپس با بافر تریس-اسیدی هیدروکلریدریک^۲ به نسبت وزنی/حجمی ۱ به ۲ مخلوط گشته و به حالت سوسپانسیون یکنواخت و pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آکالاز درآمد (pH=۸). سپس آنزیم در محدوده غلظتی ۱-۳ درصد به ارلن‌های حاوی نمونه اضافه گردید. واکنش‌های هیدرولیز در انکوباتور لرزشی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه در محدوده دمایی ۴۰-۵۵ درجه سانتی‌گراد و محدوده زمانی ۳۰-۱۸۰ دقیقه انجام شد (Meshgin Far, 2012). در انتها به منظور حصول اطمینان از

^۱ Bacillus licheniformis

^۲ Tris-HCl

بحث و نتایج
آنالیز سطح پاسخ

نتایج تجزیه 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 هر کدام از متغیرهای دما، زمان و میزان آنزیم بر میزان پاسخ‌ها معنی‌دار می‌باشد ($P < 0.05$).

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

| ضریب رگرسیون (DPPH) | |
|-------------------------------|---------------------|
| مدل | ۸۰۸/۳۹** |
| X ₁ (زمان) | -۰/۱۱* |
| X ₂ (دما) | -۳۶/۵۳** |
| X ₃ (نسبت) | -۱۳/۳۹* |
| X ₁ ² | ۵/۲۵ ^{ns} |
| X ₂ ² | ۰/۴۱** |
| X ₃ ² | -۰/۶۲ ^{ns} |
| X ₁ X ₂ | ۰/۰۰ ^{ns} |
| X ₁ X ₃ | -۰/۰۳ ^{ns} |
| X ₂ X ₃ | ۰/۴۶* |

* معنی‌دار در سطح ۹۵ درصد ($P < 0.05$)، ** معنی‌دار در سطح ۹۹ درصد ($P < 0.01$) و ^{ns}: غیر معنی‌دار

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

رابطه (۲)

$$DPPH = 808.296 - 0.1146 \times \text{Time} - 36.515 \times \text{temp} - 13.3927 \times e/s + 0.4062 \times \text{temp}^2 + 0.004464 \times \text{time} \times \text{temp} - 0.03178 \times \text{time} \times e/s + 0.460500 \times \text{temp} \times e/s$$

رابطه (۲)، بیانگر این است که رابطه بین مهار رادیکال آزاد (DPPH) با پارامترهای هیدرولیز از نوع درجه دوم است و نتایج مربوط به جدول (۴) نشان می‌دهد که ضریب همبستگی R² برای مدل (۰/۹۷۷) به دست آمد و این نشان‌دهنده توانایی خوب مدل در پیش‌بینی شرایط واکنش می‌باشد. همچنین عدم برازش مدل، معنی‌دار نشد ($P > 0.05$) و این نشان‌دهنده مناسب بودن مدل برای این آزمایش می‌باشد.

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد

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

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

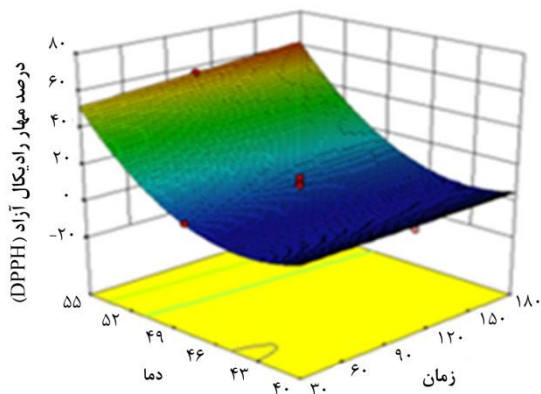
جدول ۲- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح تعیین شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت ضداکسندگی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کنجد

| 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 |

¹ Quadratic Polynomial Model

نتایج حاصل از پژوهش (Meshgin Far ۲۰۱۲) نشان داد که فعالیت مهار رادیکال^۱ آزاد با پیشرفت زمان هیدرولیز به مقدار مشخصی رسیده و سپس از میزان آن کاسته شد. همچنین پژوهش Nourmohammadi, Sadeghi و Ghorbani, Alami, Sadeghi-Mahoonak (۲۰۱۷) نشان داد که خاصیت ضد اکسندگی پروتئین هیدرولیز شده دانه 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 درجه سانتی‌گراد بیشترین اثر را در مهار رادیکال آزاد (DPPH) داشته در حالی که افزایش زمان پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه اثر بیشتری را نشان می‌دهد. تغییر در اندازه، میزان و ساختار اسیده‌های آمینه و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز، میزان فعالیت ضد اکسندگی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (Wu, Chen, & Shiau, 2003).



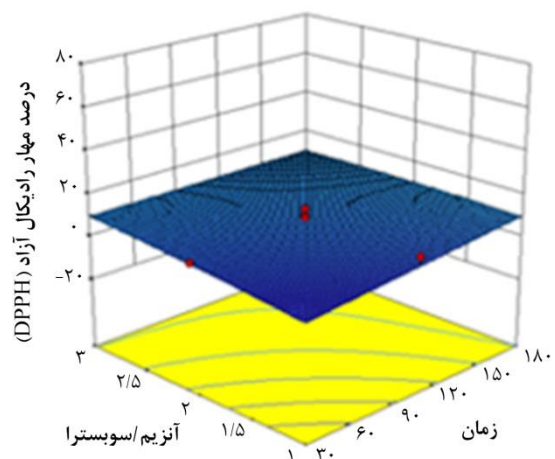
شکل ۲- نمودار سه‌بعدی تغییرات درصد مهار رادیکال آزاد (DPPH) در دما و زمان‌های مورد آزمایش

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 محدوده میانی به بالا تأثیر بالاتری در مهار رادیکال آزاد (DPPH) داشته و نسبت آنزیم نیز از ناحیه میانی به بالا موجب افزایش مهار رادیکال آزاد (DPPH) می‌شود.

جدول ۴- نتایج تجزیه 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. همان‌طور که در شکل (۱) دیده می‌شود با افزایش زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا، میزان فعالیت ضد اکسندگی مقدار اندکی افزایش یافت. نتایج شکل (۱) نشان می‌دهد که افزایش فعالیت آنزیم در یک زمان ثابت نیز در تغییرات فعالیت ضد اکسندگی اثر داشته است. توجیه تغییرات فعالیت ضد اکسندگی با گذشت زمان مربوط به تغییر طول زنجیره پپتیدی با افزایش میزان هیدرولیز است. همچنین بسیاری از پژوهش‌ها ثابت کرده است که پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر، فعالیت ضد اکسندگی بالاتری از خود نشان می‌دهند (Rajapakse, Mendis, Byun, & Kim, 2005).



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

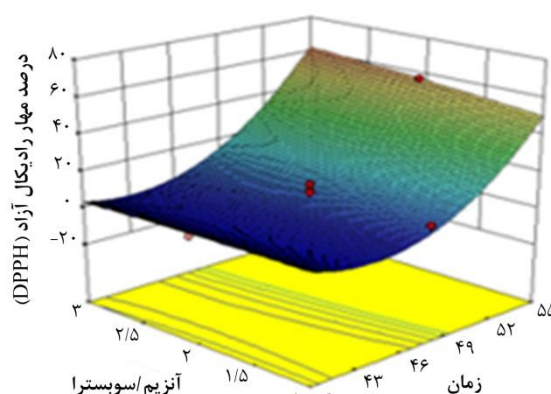
¹ Inhibition of Radicals

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 استفاده 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 کنجاله کنگد 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 ضداکسنده طبیعی در فرمولاسیون غذایی و دارویی به‌کار گرفته شوند.



شکل ۳- نمودار سه‌بعدی 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 بهینه ارائه‌شده توسط مدل برای مهار رادیکال (DPPH) دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد بود. تهیه پروتئین هیدرولیز‌شده در شرایط بهینه ارائه‌شده توسط مدل به‌صورت آزمایشی انجام و نتیجه با مقدار پیش‌بینی‌شده مقایسه گردید. نتایج حاصل از آزمایش انجام‌شده نشان

منابع

- Agyei, D., Ongkudon, C. M., Wei, C. Y., Chan, A. S., & Danquah, M. K. (2016). Bioprocess challenges to the isolation and purification of bioactive peptides. *Food and Bioprocess Processing*, 98, 244-256. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2016.02.003>
- 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. doi:<https://doi.org/10.3390/ijms12106685>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1248/bpb.17.51>
- Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L., & Zhou, H. (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. In *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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075>

- Chatterjee, R., Dey, T. K., Ghosh, M., & Dhar, P. (2015). Enzymatic modification of sesame seed protein, sourced from waste resource for nutraceutical application. *Food and Bioprocess Processing*, 94, 70-81. doi:<https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.01.007>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1021/jf00051a004>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-2621.1996.00351.x>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1007/s13197-014-1693-z>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.04.067>
- Mehregan-Nikoo, A., Alireza, S.-M., Ghorbani, M., Taheri, A., Alami, M., & Kamali, F. (2013). Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from crucian carp (*Carassius carassius*). *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 2(4), 351-364. (in Persian)
- Meshgin Far, A. (2012). *Preparation of Hydrolyzed Protein from Side Products of Meat Industries and evaluation of its Antioxidant Properties*. (Unpublished master's thesis), Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources. (in Persian)
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.089>
- Nourmohammadi, E., Sadeghi-Mahoonak, A., Alami, M., Ghorbani, M., & Sadeghi, M. (2017). Optimization of pumpkin oil cake protein hydrolysis with Alcalase to achieve the maximum antioxidant activity. *Journal of Technology and Food Preservation*, 9(1), 1-12 (in Persian) doi:<https://doi.org/10.22069/ejfp.2017.8810.1236>
- Parvaneh, v. (2006). *Quality control and chemical analysis of food product*. Tehran University Publication: 332 (in Persian).
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.02.005>
- Rastegar, M. (2005). *Cultivation of Industrial Plants*. Agriculture, Borhanmand Publication: First Printing, 480 (in Persian).
- Sarmadi, B. H., & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31(10), 1949-1956. doi:<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2010.06.020>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.02.014>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1002/jsfa.1943>
- 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. doi:<https://doi.org/10.1080/19476337.2010.484551>
- Tang, L., Sun, J., Zhang, H. C., Zhang, C. S., Yu, L. N., Bi, J., . . . 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. doi:[https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(03\)00104-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(03)00104-2)

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

Azra Mousavi Nasab¹, Alireza Sadeghi Mahoonak^{2*}, Mohammad Ghorbani²,
Mehran Alami², Nasim Meshginfar³

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