

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ

پریا شعبانی^a، بهروز اکبری آدرگانی^{*b}

^a دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
^b دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. از مهمترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و افزایش دهنده سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. هدف از انجام این پژوهش، بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از آرد پنبه دانه توسط آنزیم پپسین به روش سطح پاسخ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی با سطوح متغیرهای مستقل: دما (۳۰-۴۰°C)، زمان (۲-۵ ساعت)، نسبت آنزیم به سوپسترا (۰/۵-۲٪) انتخاب گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پنبه‌دانه توسط چهار آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاء کنندگی و شلاته کنندگی یون آهن بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اثر متغیرهای واکنش بر پاسخ‌های آزمایش معنی‌دار است ($P < 0/05$). شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل دمای ۳۱/۱°C، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوپسترا ۱/۷۵٪ حاصل شد و تحت این شرایط میزان مهار رادیکال آزاد ۸۳٪، قدرت احیاء کنندگی ۰/۱۵۸ انگستروم، شلاته کنندگی ۰/۷۰٪، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ۱/۹۹ میلی‌مول آلفاتوکوفرول بر میلی‌لیتر و درجه هیدرولیز در شرایط بهینه ۳۱/۷۵٪ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌باشد و می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدانی طبیعی در مواد غذایی استفاده شود. بنابراین استفاده از این پروتئین‌های هیدرولیز شده در فرمولاسیون مواد غذایی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، پنبه دانه، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مقدمه

پروتئین‌ها به طور گسترده در صنعت غذا قابل استخراج و استفاده هستند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش‌های مورد استفاده جهت بهبود ویژگی‌های کاربردی و تغذیه‌ای پروتئین‌های غذایی است. اکسیداسیون چربی‌ها یکی از موارد نگران کننده در صنایع غذایی است زیرا از جمله عوامل ایجاد کننده طعم و بوی نامطلوب و برخی بیماری‌ها در بدن هستند که عامل آن‌ها پراکسیداسیون لیپیدها و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مرحله‌ی نهایی اکسیداسیون می‌باشند (Li et al., 2008)، از این رو استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در سال‌های گذشته در صنایع غذایی رایج بوده اما با توجه به نگرانی‌های شایع مصرف کنندگان در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و به خطر افتادن سلامتی بدن، تحقیقاتی در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در دهه‌ی اخیر انجام شده است. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی فعالیت قوی‌تری دارند اما به دلیل سمیت این ترکیبات شیمیایی استفاده از آن‌ها محدود شده است (Ito et al., 1986). با توجه به علاقه‌ی بیشتری که محققان برای بررسی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در سال‌های اخیر از خود نشان داده‌اند، تحقیقات زیادی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال انجام شده است که مشخص شده است جهت به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی و دارویی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می‌باشد. پپتیدهای زیست‌فعال با جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ کیلودالتون، در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینو می‌باشند. پپتیدهای زیست‌فعال اغلب به عنوان اجزاء پروتئینی مورد مطالعه قرار می‌گیرند، این پپتیدها در ساختار اصلی غیرفعال بوده و پس از آزاد شدن به وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی، عملکرد فیزیولوژیکی مختلفی از خود نشان می‌دهند (Sarmadi & Ismail, 2010). توانایی آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال به تأثیرات چندگانه نسبت داده می‌شوند که برخی از این ویژگی‌ها از قبیل قابلیت آن‌ها به عنوان شلاته کننده‌ی فلزات واسطه، مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت ضدسرطانی، کاهش فشار خون و ... می‌باشد (Li et al., 2008). تاکنون بیشترین مطالعات پیرامون

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ

تأثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ویژگی‌های هیدرولیز شده‌های تولید شده از پروتئین‌های کازئین، آب پنیر و سویا انجام گرفته است (Cho et al., 2004). محققان زیادی نشان دادند که پپتیدهای زیست‌فعال تولید شده در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها دارای اثرات ضداکسایش هستند (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Erdmen et al., 2008).

نتایج Wiryaphan و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که هیدرولیز آنزیمی ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین و پپتیدهای تولید شده توسط آنزیم پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ بیشترین قابلیت ضد اکسایشی را به خود اختصاص دادند. در مطالعه‌ی پیرامون تأثیر سویا و پپتیدهای آن نشان داده شده که مصرف وعده‌های حاوی ۲۰٪ پروتئین هیدرولیز شده سویا تأثیر ممانعت کننده بر تنش اکسایشی در موشها داشته است (Takenaka et al., 2003). کازئین شیر گوسفند هیدرولیز شده توسط آلکالاز، پپسین، تریپسین و کیموتریپسین نیز فعالیت ضداکسایش قوی نشان داد که در ارتباط با وجود مقدار زیادی هیستیدین و لوسین در زنجیره پپتیدی بود (Silva and Malcata, 2004). در تحقیقی که توسط Cumby و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده، بر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا، آنزیم‌های آلکالاز، یک اندو پپتیداز و فلیپورزایم با فعالیت اندو و آگرو پپتیدازی جهت هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفتند و هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستم‌های مدل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر به ویژه با زدودن رادیکالهای آزاد و عمل به عنوان عامل احیا کننده عمل نمودند. این اثر وابسته به غلظت و نیز تحت تأثیر نوع آنزیم به کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیز شده بود. هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیپورزایم بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در بین تمامی نمونه‌ها از خود نشان داد درحالیکه هیدرولیز شده‌ی حاصل از مخلوط آلکالاز و فلیپورزایم در کارایی آنتی‌اکسیدانی در قیاس با هیدرولیز شده‌های حاصل از آنزیم آلکالاز تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد. همچنین مشخص شد که هیدرولیز شده‌ها در افزایش ظرفیت نگهداری آب و بازدهی پخت مؤثر بودند.

پروتئین پنبه دانه برای نخستین بار در سال ۱۸۷۶ به عنوان منبع پروتئینی در رژیم‌های غذایی کم نشاسته به

در این تحقیق جهت بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی از آنزیم پیپسین ساخت شرکت سیگما-آلدریج (Luis, USA) استفاده شد. واکنشگر DPPH¹ از کمپانی سیگما-آلدریج (Luis, USA) استفاده شد. اتانول، بافر فسفات، فری سیانید پتاسیم، تری کلرو استیک اسید (TCA)²، اسید سولفوریک، آمونیم مولیدات، سدیم دی-هیدروژن فسفات و فروزین از شرکت مرک (Dortmond, Germany) همگی با درجه آزمایشگاهی و خلوص بالای ۹۹/۹۹٪ خریداری شدند.

- روش‌ها

- ارزیابی خصوصیات شیمیایی کنجاله پنبه دانه

کنجاله‌ی چربی‌گیری شده پنبه دانه به صورت آماده از یک کارخانه تولید پنبه تهیه شد. جهت اندازه‌گیری مقدار چربی کنجاله از روش سوکسله ویژه مواد با کمتر از یک درصد چربی، با به کارگیری ۲۰ میلی‌لیتر حلال استخراجی هگزان استفاده شد (پروانه، ۱۳۸۵). برای تعیین مقدار پروتئین کنجاله از روش کج‌دال AACC 46-12 استفاده شد (AACC, ۱۹۹۹).

- آماده‌سازی کنسانتره پروتئین از کنجاله پنبه دانه

کنجاله پنبه دانه آسیاب و پس از غربال شدن با مش ۶۰ در آب مقطر با نسبت (w/v) ۱:۱۵ مخلوط شد و سپس با سود ۱ مولار pH آن روی عدد ۱۰/۵ تنظیم شد. مخلوط حاصل با دستگاه همزن مغناطیسی (IKA RH B2, Germany) به مدت دو ساعت با دور ۹۰ دور بر دقیقه هم زده شد. سپس با گرانش ۸۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ (Heidolph, Germany) شد. رسوب حاصل با آب مقطر (w/v) ۱:۵ مخلوط و pH محلول روی عدد ۱۰/۵ تنظیم شد. سپس مطابق با مرحله قبلی سانتریفوژ گردید و محلول فوقانی نیز طی دو مرحله سانتریفوژ و به منظور ایجاد رسوب، pH آن با اسید کلریدریک ۱ مولار روی عدد ۴/۳ تنظیم شد. در ادامه، محلول فوقانی حاصل لیوفیلیزه شده و در ۲۰°C - نگهداری شد (Gao et al., 2010). تمام آزمون‌های تنظیم pH با دستگاه pH متر دیجیتال (GLP, Barcelona, Spain) انجام شد.

منظور استفاده انسان معرفی شد. سطح زیر کشت پنبه در ایران و جهان به ترتیب ۳۰/۴۶ و ۹۰۰۰۰ هکتار، عملکرد ۷۳۴ کیلوگرم و ۳۶۲۱/۴۱ در هکتار و تولید ۱۰۲/۷۴ میلیون پوند و ۳۰۰۰۰۰ تن و تولید جهانی کنجاله‌ی پنبه دانه ۱۳/۹۶ میلیون تن می‌باشد (کوشکی و همکاران، ۱۳۹۰).

پنبه دانه دارای ۲۶٪ درصد چربی است و کنجاله‌ی حاصل از فرآیند روغن‌کشی آن دارای ۴۵٪ پروتئین است. پروتئین‌های پنبه دانه به دو گروه کلی ذخیره‌ای و غیر ذخیره‌ای تقسیم‌بندی می‌شوند. پروتئین‌های ذخیره‌ای در بذر گیاه و درون دانه‌های آلرون قرار دارند و وزن مولکولی آن‌ها زیاد است و با داشتن نقطه‌ی ایزوالکتریک ۷ در حلال‌های قلیایی محلول می‌باشند ولی پروتئین غیر ذخیره‌ای با نقطه‌ی ایزوالکتریک ۴ و وزن مولکولی زیاد جزء پروتئین‌های فعال سیتوپلاسم بوده و سبب چسباندن سلول‌ها به یکدیگر می‌شوند. از مهم‌ترین خواص پروتئین فرآورده‌های پنبه دانه می‌توان به طعم شیرین، رنگ روشن، زیاد بودن ارزش تغذیه‌ای، برخورداری از خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت جذب آب و بهبود رنگ محصولات تولیدی، خاصیت امولسیفایری و قابلیت جذب روغن اشاره کرد. بنابراین پروتئین پنبه‌دانه یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های جانبی حاصل از روغن‌گیری پنبه دانه می‌باشد که می‌تواند به عنوان جایگزین جدید و یک منبع ارزان قیمت پروتئین با کیفیت بالا محسوب شود. به منظور ارزش افزایی برای این محصول که از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوان است و به علت غنی بودن این ماده از نظر پروتئین با ترکیب اسید آمینه مناسب، در این تحقیق تلاش خواهد شد تا از آن به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی استفاده شود و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی آن با استفاده از آنزیم پیپسین مورد بررسی قرار گرفته است. در واقع هدف از این مطالعه بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ و با استفاده از آنزیم پیپسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- مواد

¹ 1,1-Diphenyl-2-Picrylhyrazyl radical, 2,2-Diphenyl 1-1-(2,4,6-trinitrophenyl) Hydrazyl
² Trichloro Acetic Acid

مراحل هیدرولیز پروتئین پنبه دانه

ابتدا یک محلول پروتئین با استفاده از هم زدن مداوم (IKA RH B2, Germany) تهیه شد و پس از تنظیم pH بهینه هر آنزیم، پروتئاز در غلظت‌های انتخابی افزوده شد و هیدرولیز در زمان‌ها و دماهای مورد نظر برای هر آنزیم در انکوباتورهای شیکردار (Heidolph, Germany) و در دما و pH ثابت انجام گرفت. در انتها واکنش آنزیمی در 90°C پس از ۱۰ دقیقه متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن در ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و محلول بالایی پس از جمع‌آوری با خشک‌کن انجمادی (FDB-5503, Korea)، خشک شد (Gao et al., 2010).

تعیین درجه هیدرولیز

برای تعیین درجه هیدرولیز نقطه بهینه، به حجمی برابر از محلول بالایی، تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰٪ اضافه گردید و سپس در دور ۶۷۰۰ و دمای 10°C به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰٪، سانتریفوژ گردید. درجه هیدرولیز بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (Hoyle and Merritt, 1994).

$$\text{درجه هیدرولیز (\%)} = \frac{\text{میزن نیتروژن در } TCA\ 10\%}{\text{نمونه نیتروژن کل}} \times 100$$

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH

برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در غلظت‌های مختلف با ۵۰۰ میکرولیتر از اتانول ۹۹/۵٪ و ۲۵ میکرولیتر از DPPH ۰/۲٪ در اتانول ۹۹/۵٪ مخلوط شدند. مخلوط برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد و احیاء رادیکال DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Cecil, United Kingdom) ارزیابی گردید. فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به رابطه (۱) محاسبه شد. نمونه شاهد به طریق مشابه تهیه شد با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید (Bougatef et al., 2009).

$$\text{معادله (۱)} \quad \%DPPH = \frac{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}$$

آزمون قدرت احیاء کنندگی

برای این منظور، قدرت پروتئین هیدرولیز شده در احیاء آهن III مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون، یک میلی‌لیتر از محلول هر کدام از نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (۶/۶ pH=) با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فری سیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط شدند. مخلوط حاصل در دمای 50°C به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول (TCA w/v) ۱۰٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل در گرانش ۱۶۵۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل در فاز فوقانی محلول، با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول (w/v) ۰/۱٪ کلرید آهن مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (Bougatef et al., 2009).

فعالیت شلاته کنندگی

مقدار ۴/۷ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس شدت جذب نور در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. فعالیت مهار کنندگی از طریق رابطه‌ی (۲) به دست آمد (Hmidet et al., 2011):

$$\text{معادله (۲)} \quad \text{درصد فعالیت شلاته‌کنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}$$

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

معرف مورد نیاز برای تهیه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از انحلال ۰/۳۸۶ گرم سدیم دی‌هیدروژن فسفات و ۰/۴۹۴ گرم آمونیم مولیبدات در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاصل شد. به محلول حاصل ۳/۲۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و سپس با آب مقطر در یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد. برای انجام آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه ۱ میلی‌لیتر معرف اضافه کرده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای 90°C گرمخانه‌گذاری شد و سپس شدت جذب نور توسط دستگاه

ثابت، β_1 ، β_2 ، β_3 (β_i) ضرایب خطی، β_{11} ، β_{22} ، β_{33} (β_{ii}) اثرات مربعی و β_{12} ، β_{13} و β_{23} (β_{ij}) اثرات متقابل می‌باشند.

یافته‌ها

با توجه به نقاط تعریف شده در طرح RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. در جدول ۲ نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت شلاته‌کنندگی) ارائه شده است. در مرحله بعدی داده‌های به دست آمده از آزمون‌های مختلف توسط روش سطح پاسخ آنالیز گردید. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده و جدول تجزیه واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها مطابق جداول ۳ و ۴ بود.

نتایج آزمون تعیین میزان پروتئین کنجاله پنبه دانه (با سه تکرار) نشان داد که میزان پروتئین آن ۴۷/۶۱٪ می‌باشد. نتیجه میانگین اندازه‌گیری چربی در این نمونه با سه تکرار آزمون ۰/۹۸٪ می‌باشد.

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات^۱ به منظور پیش‌بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ تعیین شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ۳) مدل‌های پیشنهادی زیر ارائه گردید:

$$DPPH = 83.26 + 15.12 X_1 + 6.52 X_2 + 5.58 X_3 - 4.66 X_1 X_2 - 3.21 X_1 X_3 + 1.31 X_2 X_3 - 10.04 X_1^2 + 0.36 X_2^2 - 11.14 X_3^2$$

معادله (۴)

$$\text{قدرت احیاءکنندگی} = 0.1 + 0.035 X_1 + 9.2 X_2 + 0.015 X_3 - 1.125 X_1 X_2 - 7.125 X_1 X_3 - 1.62 X_2 X_3 + 6.364 X_1^2 + 0.043 X_2^2 - 7.364 X_3^2$$

معادله (۵)

$$\text{ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل} = 1.29 + 0.2 X_1 + 0.075 X_2 + 0.32 X_3 - 0.18 X_1 X_2 - 0.21 X_1 X_3 - 0.18 X_2 X_3 - 0.021 X_1^2 - 0.25 X_2^2 + 0.095 X_3^2$$

معادله (۶)

اسپکتروفوتومتر در طول موج ۶۹۵ نانومتر قرائت شد. نمونه‌ی شاهد شامل ۱ میلی‌لیتر نمونه و ۰/۱ میلی‌لیتر آب مقطر می‌باشد (Bougatef et al., 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق به منظور دستیابی به شرایط بهینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۰ طرح آزمایشی مربوط به متغیرهای مستقل تعیین شد. در این مطالعه، طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل شامل دما (X_1^0C)، نسبت آنزیم به سوبسترا ($X_2\%$) و زمان (X_3h) در سه سطح (۱، ۰، -۱) یک بلوک و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح (جهت محاسبه تکرارپذیری فرآیند) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). سپس در شرایط مذکور هیدرولیز انجام شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ و آزمون آنالیز واریانس ANOVA برای تحلیل کافی بودن مدل پاسخ سطح برازش شده برای توضیح کل تغییرات در دامنه مورد مطالعه، استفاده شده است.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی

متغیرهای مستقل	سطوح		
	۱	۰	-۱
X_1 دما ($^{\circ}C$)	۴۰	۳۵	۳۰
X_2 نسبت آنزیم به سوبسترا (%)	۲/۰	۱/۲۵	۰/۵
X_3 زمان (ساعت)	۵/۰	۳/۵	۲

تغییرات اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH (%، آزمون قدرت احیاءکنندگی، فعالیت شلاته‌کنندگی (%، و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (α-tocopherol mmol/ml) در برابر سه متغیر دما ($^{\circ}C$)، نسبت آنزیم به سوبسترا (%) و زمان (ساعت) با استفاده از یک مدل چند متغیره درجه دوم مطالعه گردید. مدل مذکور به صورت معادله زیر می‌باشد:

$$\text{معادله (۳)} \quad Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^K \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{K-1} \sum_{j=1}^K \beta_{ij} X_i X_j$$

در معادله (۳)، Y پاسخ پیش‌بینی شده، β_0 ضریب

¹ Least Square Method

جدول ۲- طرح مرکب مرکزی سه متغیر مستقل و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدولیز شده کنجاله پنبه دانه

Run	زمان (X ₁) (h)	دما (X ₂) (°C)	نسبت آنزیم به سوبسترا (X ₃)	DPPH radical-scavenging assay (%)	Reducing power assay (A)	Total antioxidant capacity (α-tocopherol) mmol/ml	Metal-chelating activity (%)
۱	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۲/۰	-/۱۰۶	۱/۴۵۵	۷۹/۷
۲	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۳/۵	-/۰۹۴	۱/۲۰۲	۸۲/۳
۳	۵/۰۰	۴۰/۰	۰/۵۰	۷۸/۸	-/۱۷۵	۰/۷۹۸	۴۰/۳
۴	۲/۰۰	۴۰/۰	۲/۰۰	۶۸/۲	-/۱۳۳	۱/۰۷۸	۴۳/۰
۵	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۴/۸	-/۱۰۰	۱/۳۶۹	۶۸/۶
۶	۵/۰۰	۳۰/۰	۰/۵۰	۷۵/۰	-/۱۶۱	۰/۶۸۹	۵۲/۰
۷	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۴/۵	-/۰۸۸	۱/۲۳۱	۷۵/۰
۸	۲/۰۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۶۶/۵	-/۰۷۸	۰/۹۱۶	۷۰/۷
۹	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۶/۰	-/۱۰۳	۱/۲۶۹	۷۳/۸
۱۰	۲/۰۰	۳۰/۰	۰/۵۰	۲۷/۲	-/۰۷۵	۰/۷۹۶	۴۸/۱
۱۱	۳/۵۰	۳۵/۰	۲/۰۰	۷۶/۵	-/۱۰۵	۱/۸۵۳	۷۶/۵
۱۲	۲/۰۰	۳۰/۰	۲/۰۰	۴۰/۵	-/۱۲۰	۰/۹۹۸	۴۸/۱
۱۳	۵/۰۰	۴۰/۰	۲/۰۰	۸۴/۵	-/۱۸۵	۰/۱۱۸	۶۵/۰
۱۴	۳/۵۰	۴۰/۰	۱/۲۵	۸۹/۵	-/۱۷۸	۱/۱۶۹	۶۴/۹
۱۵	۵/۰۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۰/۲	-/۱۲۱	۱/۶۸۸	۷۸/۶
۱۶	۳/۵۰	۳۰/۰	۱/۲۵	۷۸/۰	-/۱۰۵	۰/۹۷۸	۷۷/۷
۱۷	۲/۰۰	۴۰/۰	۰/۵۰	۴۵/۰	-/۰۷۷	۰/۹۵۳	۴۳/۹
۱۸	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۷۸/۳	-/۱۲۵	۱/۰۶۹	۸۰/۴
۱۹	۵/۰۰	۳۰/۰	۲/۰۰	۸۰/۱	-/۱۸۵	۲/۳۹۳	۵۷/۱
۲۰	۳/۵۰	۳۵/۰	۰/۵۰	۶۸/۰	-/۰۷۸	۰/۹۸۳	۶۳/۴

اثرات خطی هر ۳ فاکتور، اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، اثرات مربع دما و زمان در آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH معنادار می‌باشد (p<0.05). در آزمون قدرت احیاءکنندگی اثرات خطی فاکتورهای دما و زمان و تنها اثر مربع نسبت آنزیم به سوبسترا معنادار می‌باشد (p<0.05) و اثرات متقابل هیچکدام بر قدرت احیاءکنندگی معناداری نبوده است. در ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مطابق با جدول ۳، اثرات خطی دما و زمان، اثر متقابل نسبت آنزیم به سوبسترا و دما معنادار بوده است (p<0.05). در بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی اثرات خطی تنها دو فاکتور زمان و دما بر فعالیت شلاته‌کنندگی معنادار می‌باشد (p<0.05) و اثرات متقابل و درجه دوم بر فعالیت شلاته‌کنندگی معنادار نمی‌باشد.

$$\text{فعالیت شلاته‌کنندگی} = 78.52 + 3.92 X_1 - 2.59 X_2 + 4.20 X_3 + 0.69 X_1 X_2 + 3.84 X_1 X_3 - 2.34 X_2 X_3 - 6.69 X_1^2 - 10.04 X_2^2 - 11.39 X_3^2$$

معادله (۷)

نتایج حاصل از آزمون آماری ANOVA (جدول ۴) نشان داد که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ با ضرایب مشخص می‌باشد. مقادیر ۰/۹۱، ۰/۸۳، ۰/۸۸ و ۰/۹۵، $R^2 =$ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۵٪، ۸۸٪، ۸۳٪ و ۹۱٪ به ترتیب از کل تغییرات در دامنه مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاءکنندگی، فعالیت شلاته‌کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را توضیح دهد. نتایج نشان داده شده در جدول ۳ حاکی از آن است که

جدول ۳- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ

source	DPPH radical-scavenging assay (%)				Reducing power (A)				Total antioxidant capacity (α-tocopherol mmol/ml)				Metal-chelating activity (%)													
	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of square	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value						
Model	0.477۳	4	0.11۹۳	<0.0001	۲4.0۷	۰.۰۲۴	4	۰.۰۶۰	<0.0001	۸.۱۵	۰.۵۷	4	۰.۱۴۲	<0.0001	0.۱۴	4	۰.۰۳۵	<0.0001	0.۱۴	4	۰.۰۳۵	<0.0001	۰.۱۴			
X ₁	۳۳۸۷۱۴	1	۳۳۸۷۱۴	<0.0001	۱۰۱۷۴۶	۰.۰۱۳	1	۰.۰۱۳	<0.0001	۳۸۷۳	۰.۳۸	1	۰.۳۸	<0.0001	۷.۵۲	۱۵۳۶۶	1	۱۵۳۶۶	<0.0001	۰.۰۴۹	0.۰۱	۱۵۳۶۶	1	۱۵۳۶۶	<0.0001	0.۰۱
X ₂	4۳0۱۰	1	4۳0۱۰	<0.0001	۱۸۸۸	۸۴۶	1	۸۴۶	<0.0001	۲۶۳	۰.۵۶	1	۰.۵۶	<0.0001	۱۱.۰	۳۷۰۸	1	۳۷۰۸	<0.0001	۰.۱۷۰	۰.۰۱	۳۷۰۸	1	۳۷۰۸	<0.0001	۰.۰۱
X ₃	۳۱۷۳۳	1	۳۱۷۳۳	<0.0001	۱۳۷۸	۳۳۱۰	1	۳۳۱۰	<0.0001	۷۱۴	۰.۳	1	۰.۳	<0.0001	۲۰.۳۳	۱۷۶۴۰	1	۱۷۶۴۰	<0.0001	۰.۰۲۷	0.۰۵	۱۷۶۴۰	1	۱۷۶۴۰	<0.0001	0.۰۵
X ₁ X ₂	۱۳۳۹۱	1	۱۳۳۹۱	<0.0001	۷۷۳	۱۰۱۲	1	۱۰۱۲	<0.0001	۰.۳۱	۰.۲۵	1	۰.۲۵	<0.0001	۴.۹۱	۳۸۸	1	۳۸۸	<0.0001	۰.۰۳۳	۰.۱۲	۳۸۸	1	۳۸۸	<0.0001	۰.۱۲
X ₁ X ₃	۸۷۵۶۱	1	۸۷۵۶۱	<0.0001	۳۶۶	۴۰۶۱	1	۴۰۶۱	<0.0001	۱۲۵	۰.۳۱	1	۰.۳۱	<0.0001	۷.۰۲	۱۱۷۸۱	1	۱۱۷۸۱	<0.0001	۰.۰۸۸	۰.۰۱	۱۱۷۸۱	1	۱۱۷۸۱	<0.0001	۰.۰۱
X ₂ X ₃	۱۳۷۸	1	۱۳۷۸	<0.0001	۰.۶۱	۷۱۱۲	1	۷۱۱۲	<0.0001	۰.۱۵	۰.۱۱	1	۰.۱۱	<0.0001	0.۱۹	4۳۷۱	1	4۳۷۱	<0.0001	۰.۰۲۰	۱/۴۳	4۳۷۱	1	4۳۷۱	<0.0001	۱/۴۳
X ₁ ^۲	۳۷۷۱۳	1	۳۷۷۱۳	<0.0001	۱۲۳۰	۱۱۱۴	1	۱۱۱۴	<0.0001	۳۴۴	۰.۳۱	1	۰.۳۱	<0.0001	۱۳.۳۹	۱۳۳۷۱	1	۱۳۳۷۱	<0.0001	۰.۰۳۳	۴.۰۱	۱۳۳۷۱	1	۱۳۳۷۱	<0.0001	۴.۰۱
X ₂ ^۲	۰.۳۱	1	۰.۳۱	<0.0001	۰.۰۱۶	4۹۹۹	1	4۹۹۹	<0.0001	۱0/۴0	۰.۱۷	1	۰.۱۷	<0.0001	۳.۳۸	۳۷۷۲۵	1	۳۷۷۲۵	<0.0001	۰.۱۳۳	۹.۰۴	۳۷۷۲۵	1	۳۷۷۲۵	<0.0001	۹.۰۴
X ₃ ^۲	۲4۱۷۱۹	1	۲4۱۷۱۹	<0.0001	۱0/۱۴	۱/4۹۱	1	۱/4۹۱	<0.0001	۰/۴۶	۰.۰۲۵	1	۰.۰۲۵	<0.0001	۰/۴۴	۲۵۳۸۲	1	۲۵۳۸۲	<0.0001	۰.۰۰۶	۱۱/۳۳	۲۵۳۸۲	1	۲۵۳۸۲	<0.0001	۱۱/۳۳
Residual	۲۲0/۳۳	1۰	۲۲/0۳			۲/۳۳۷	1۰	۲/۳۳۷		۰/۵۱	۰/۵۱	1۰	۰/۵۱		۲۰/۳۷	۲۰/۳۷	1۰	۲۰/۳۷		۰/۳۷	۱/۳۴	۲۰/۳۷	1۰	۲۰/۳۷		۱/۳۴
Lack of Fit	۱۸۷/۸۵	0	۲0/0۷	<0.0001	0/۰۱	۷/۳۹	0	4/۸0۹	<0.0001	۲/۰۱	۰/۴۳	0	۰/۰۸۳	<0.0001	4/۶۱	۱۷0/۶۱	0	۲0/۱0	<0.0001	۰/۳۷	۱/۳۴	۱۷0/۶۱	0	۲0/۱0	<0.0001	۱/۳۴
Pure Error	۳۷/4۷	0	۷/44			۸/۰۷۳	0	۱/۶۱0		۰/۰۴	۰/۰۴	0	۰/۰۷۸		1۳/۹۳	۱۳/۹۳	0	۳۷/۱۹		۰/۳۷	۱/۳۴	۱۳/۹۳	0	۳۷/۱۹		۱/۳۴
Core Error	0/۳۷۰۴	۱۹				۰/۰۲۷	۱۹			۲/۰۸	۱۹				۳۹۹/4۹	۳۹۹/4۹	۱۹					۳۹۹/4۹	۱۹			
Total																										

پویا شعبانی و همکار

جدول ۴- نتایج ضرایب رگرسیون و آنالیز واریانس برای چهار متغیر پاسخ

ضریب	پاسخ			
	DPPH radical-scavenging assay (%)	Reducing power assay (A)	Total antioxidant capacity (α -tocopherol mmol/ml)	Metal-chelating activity (%)
β_0	-.0000	-.001	-.006	-.0002
β_1	-.0000	-.0001	-.020	-.049
β_2	-.0015	-.1369	-.319	-.170
β_3	-.0040	-.2334	-.001	-.037
β_{11}	-.0195	-.18631	-.051	-.133
β_{22}	-.0846	-.2888	-.024	-.078
β_{33}	-.4523	-.18035	-.045	-.260
β_{12}	-.0057	-.9544	-.1778	-.073
β_{13}	-.9020	-.0028	-.095	-.133
β_{23}	-.0030	-.5127	-.050	-.006
R^2	.95	.88	.83	.91
R^2_{adj}	.91	.77	.68	.84

(۰/۱۸۵) را در شرایط دمایی 30°C ، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ داریم. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با افزایش دما افزایش می‌یابد تا به یک مقدار ثابتی می‌رسد و با افزایش زمان افزایش می‌یابد و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل روند افزایشی داشته است (شکل‌های ۷، ۸ و ۹). در آزمایش ۱۹ همچنین بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر طبق جدول ۲ در شرایط دمایی 30°C ، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ مشاهده می‌شود. همان‌طور که در شکل‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مشاهده می‌شود شلاته‌کنندگی با افزایش دما ابتدا روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است و با افزایش زمان شلاته‌کنندگی افزایش می‌یابد تا به مقدار ثابتی می‌رسد و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ابتدا روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است در آزمایشات ۱، ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۸ با زمان ۳/۵ ساعت، دمای 35°C و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۲۵٪ بیشترین شلاته‌کنندگی مشاهده می‌شود. اثر زمان بر میزان درجه هیروولیز در شکل ۱۳ نشان داده شده است. عامل زمان اثر معناداری بر میزان درجه هیروولیز داشته است ($p < 0.05$). با مقایسه تیمارهای مختلف مشخص شد که بین آنها اختلاف معنی‌داری وجود دارد. به صورت کلی با افزایش زمان هیروولیز، میزان

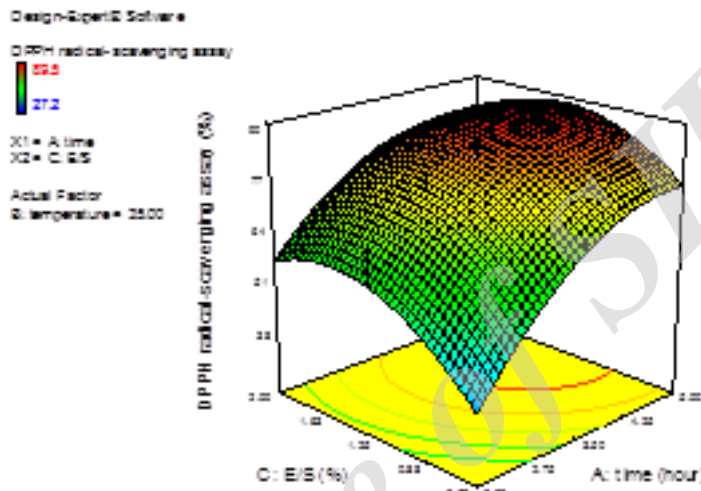
به منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیروولیز آنزیمی جهت حصول بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، نمودارهای سه بعدی برای متغیرها در شکل‌های ۱ تا ۱۲ ارائه شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه‌اش ثابت نگه داشته شده است. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ابتدا مهار رادیکال آزاد DPPH روند افزایشی و سپس به مقدار ثابتی می‌رسد (شکل ۱). همان‌طور که در شکل (۲ و ۳) مشخص است با افزایش دما، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد و با افزایش زمان، تا میزان مشخصی ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد. با توجه به جدول ۲ مشاهده می‌شود آزمایشات ۱، ۲، ۵، ۷، ۹ و ۱۸ با زمان ۳/۵ ساعت، دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۲۵٪ بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد را به خود اختصاص داده‌اند. با توجه به شکل‌های ۴ و ۵ و ۶ قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیروولیز شده حاصل از پنبه دانه با افزایش دما ابتدا روند کاهشی و سپس روند افزایشی داشته است و با افزایش زمان، قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا قدرت احیاءکنندگی روند افزایشی داشته است. جدول ۲ نیز نشان می‌دهد که در آزمایش ۱۹ ما بیشترین قدرت احیاءکنندگی

تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پنبه دانه با فعالیت آنتی‌اکسیدانی به صورت موثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از متغیرهای دما، زمان و نسبت آنزیم تاثیر کاملا معنی‌داری بر کیفیت محصول دارند. نتایج مطالعه Li-Chan و Samaranayaka (۲۰۱۱)، نشان داد که پپتیدهای زیست فعال تولید شده در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها دارای اثرات ضداکسایش هستند. به منظور تولید پپتیدهای ضداکسایش، آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره

هیدرولیز افزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در زمان ۵ ساعت به دست آمد.

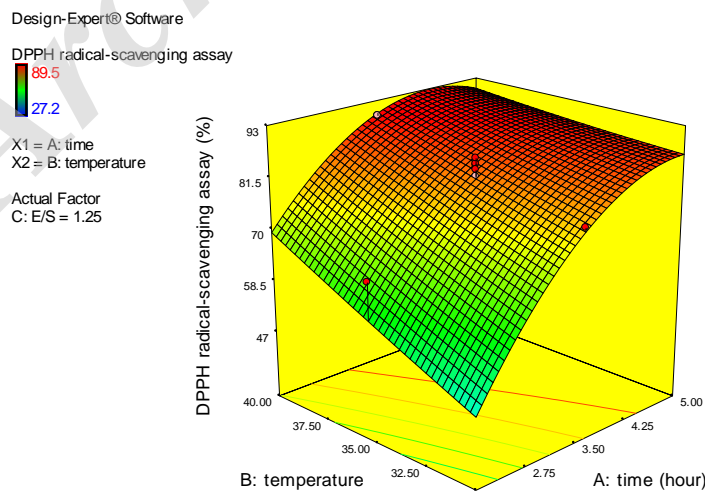
بحث

امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل خطراتی که برای سلامتی انسان دارند، با محدودیت‌هایی مواجه است. بر این اساس استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت به محصولات سنتزی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نتایج این تحقیق نشان داد که فرایند

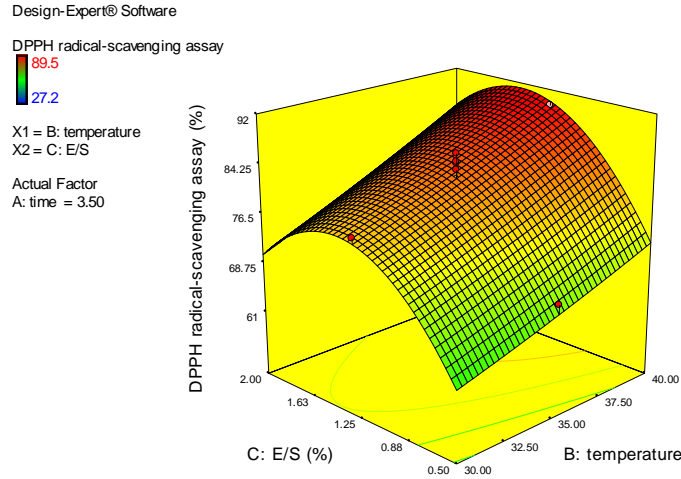


۵۲

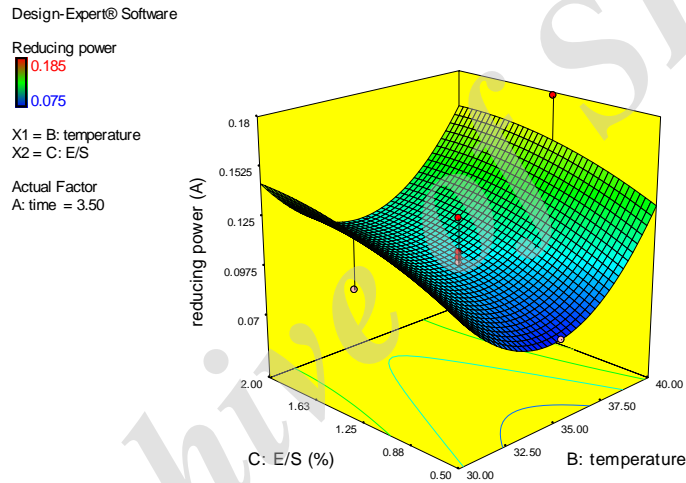
شکل ۱- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تاثیر متغیرهای مستقل (زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH



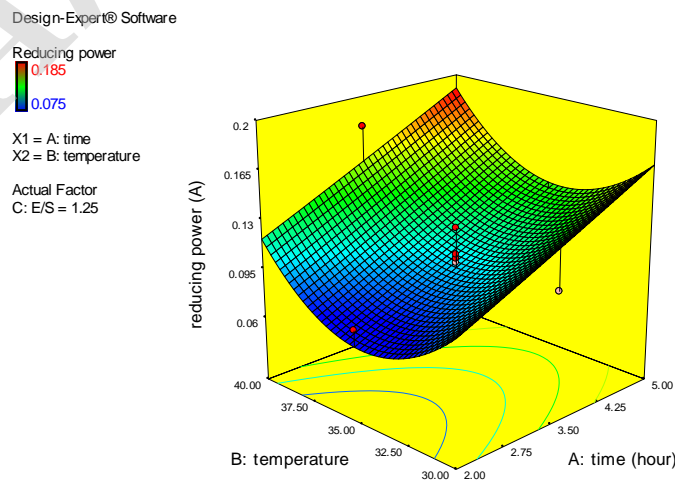
شکل ۲- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تاثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH



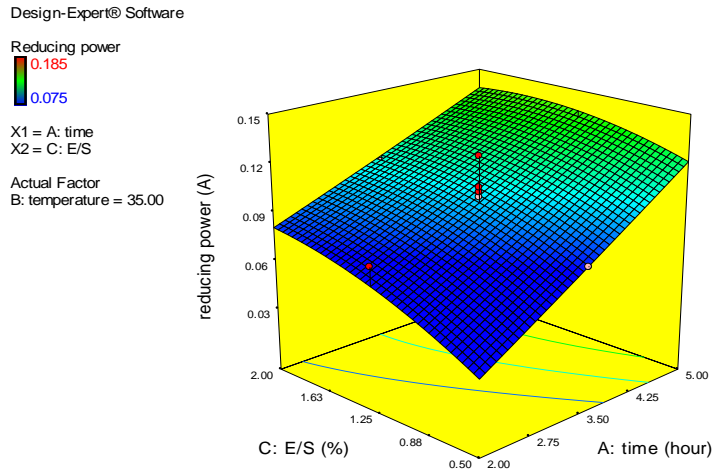
شکل ۳- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (و دما و نسبت آنزیم به سوسترا) بر تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH



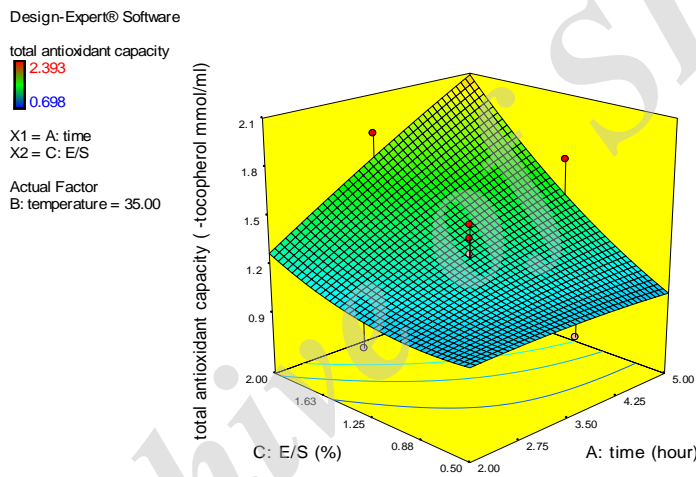
شکل ۴- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (دما و نسبت آنزیم به سوسترا) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



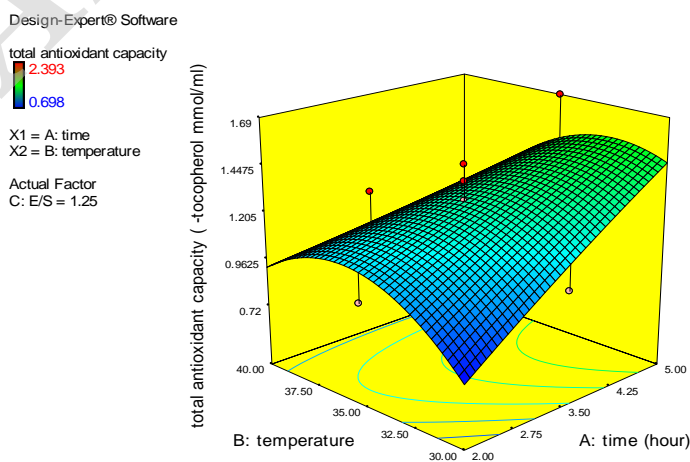
شکل ۵- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



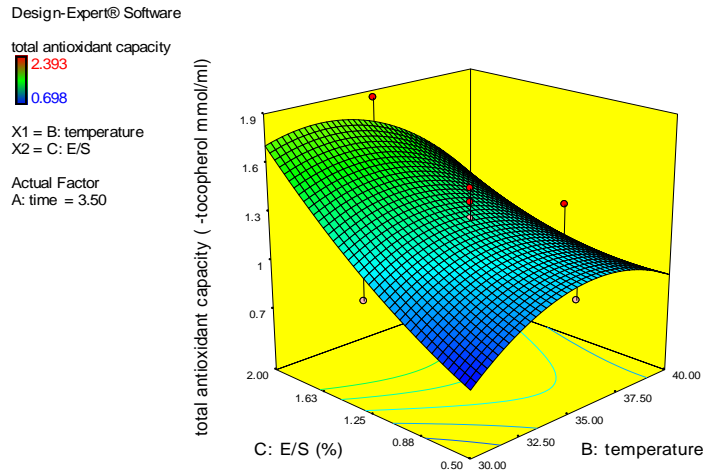
شکل ۶- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



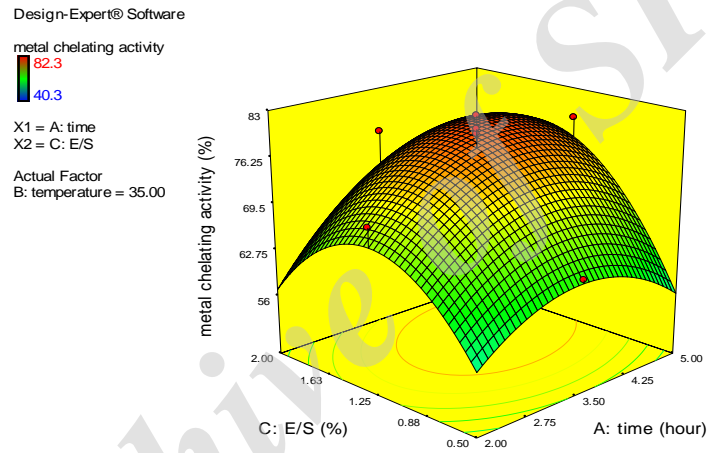
شکل ۷- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا) بر تغییرات ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل



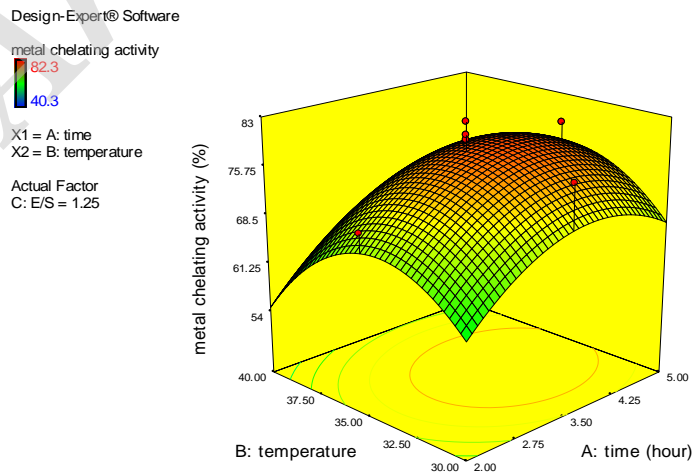
شکل ۸- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل



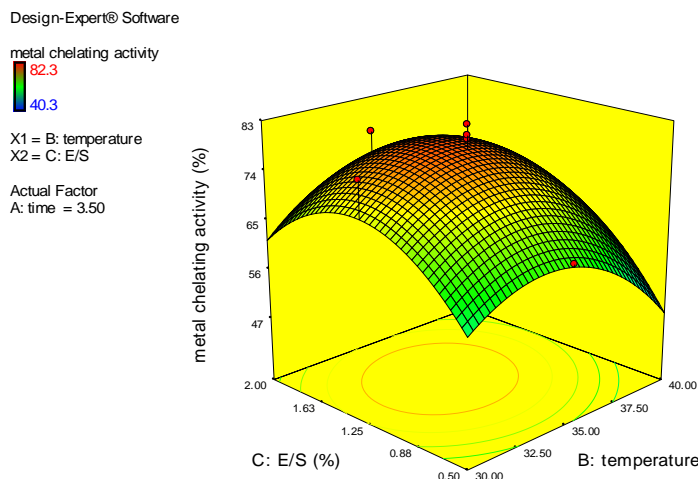
شکل ۹- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (دما و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل



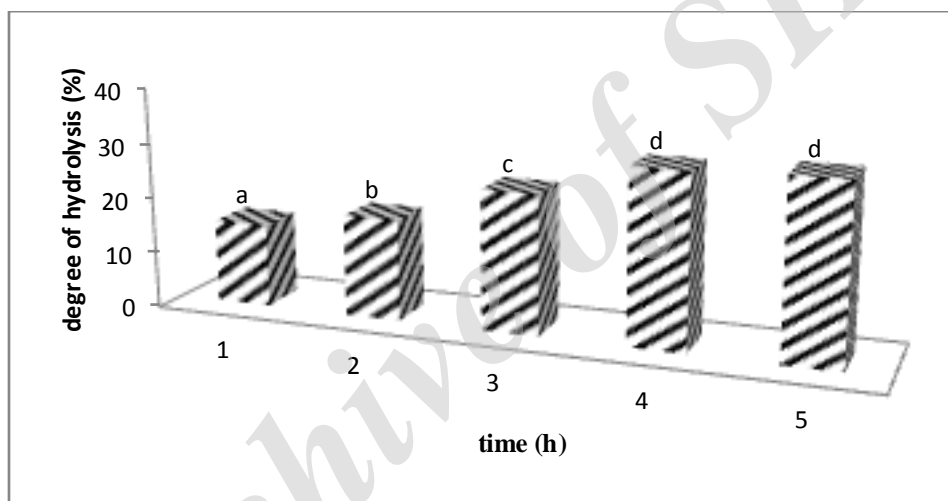
شکل ۱۰- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی



شکل ۱۱- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی



شکل ۱۲- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (دما) و نسبت آنزیم به سوبسترا بر تغییرات فعالیت شلاته کنندگی



شکل ۱۳- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷۵٪ و دمای ۳۱/۱ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف

با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (Rajapakse *et al.*, 2005). به دلیل ایجاد پپتیدها با اندازه‌های مولکولی مختلف در هر تیمار زمانی، فعالیت شلاته کنندگی متفاوت خواهد بود (Je *et al.*, 2009). Gimenez و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نموده‌اند که گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و اسیدهای آمینه بازی (آرژنین، هیستیدین و لایزین) در مهار یون‌های فلزی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند از این رو می‌توان این گونه استنباط نمود که در زمان هیدرولیز بیشترین میزان این اسیدهای آمینه در دسترس می‌باشند و

پروتئینی باشد. متغیرهای مستقل هیدرولیز تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی موثرند. مکانیزم عمل پپتیدهای ضد اکسایش هنوز به درستی مشخص نشده است، اما این اثر احتمالاً به علت مهار کردن یون‌های فلزی، باند کردن رادیکال‌ها و مهار گونه‌های فعال اکسیژن می‌باشد و قدرت ضد اکسایشی پپتیدهای زیست فعال نتیجه اثر مشارکتی این مکانیزم‌هاست (Erdmann *et al.*, 2008) البته توجه تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی با گذشت زمان تحت تأثیر تغییر طول زنجیره‌های پپتیدی حاصل با افزایش هیدرولیز می‌باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهایی

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ

به همین دلیل بالاترین میزان مهار کنندگی یون‌های آهن به دست آمده است. از خاصیت مهار کنندگی رادیکال DPPH برای بررسی قابلیت هیدروژن‌دهندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده می‌شود. حذف رادیکال آزاد مکانیزمی است که توسط آن ترکیبات ضد اکسایش قادر هستند از واکنش‌های اکسایشی جلوگیری نمایند. رادیکال DPPH یکی از محدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانی که این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن دهنده مانند یک ضد اکساینده قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به ترکیبی پایدار تبدیل شده و در نتیجه مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و کاهش میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱). اعتقاد بر این است که نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای موثر بر فعالیت ضد اکسایش به شمار می‌روند (مهرگان و همکاران، ۱۳۹۲). آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای آب‌گریز مانند لوسین و آمینواسیدهای آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر آمینواسیدها می‌گردد و اعتقاد بر این است که گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال می‌باشد. (Sun et al., 2011). در تحقیقی دیگری توسط Cumby و همکاران (۲۰۰۸) بر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا آنزیم‌های آلکالاز، یک اندوپپتیداز و فلیورزایم^۱ با فعالیت اندو و آگرو پپتیدازی جهت هیدرولیز، مورد استفاده قرار گرفتند. هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستم‌های مدل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های موثر به ویژه با مهار رادیکال‌های آزاد و عمل به عنوان عامل احیاء کننده عمل نمودند. این اثر وابسته به غلظت و نیز تحت تاثیر نوع آنزیم به کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیز شده بود. هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیورزایم بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در بین تمامی نمونه‌ها از خود نشان داد. در تحقیق انجام شده توسط Kamau و Lu (۲۰۱۱) بر هیدرولیز کنسانتره پروتئین آب پنیر توسط تریپسین، افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا از ۱ تا ۳٪ تاثیر معناداری بر افزایش خاصیت مهار کنندگی رادیکال DPPH نداشت.

طبق گزارش این محققین دما، pH و غلظت سوبسترا از عوامل تاثیرگذار بر درجه هیدرولیز و قدرت مهار رادیکال DPPH هستند. در سال ۲۰۱۲، Wiryaphan و همکاران گزارش کردند که در نتیجه هیدرولیز آنزیمی ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین پپتیدهای تولید شده توسط آنزیم پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ بیشترین قابلیت ضد اکسایشی را به خود اختصاص دادند. تحقیقات مختلف نشان داده است که همواره رابطه مستقیمی بین فعالیت‌های ضد اکسایش و قدرت احیاء کنندگی ترکیبات زیست فعال وجود دارد برای بررسی قدرت احیاء کنندگی، وجود ترکیبات کاهنده مانند ضد اکساینده‌ها منجر به کاهش کمپلکس فری سیانید به فرم فروس می‌گردد (Bougatef et al., 2009). پایین بودن خاصیت ضد اکسایشی نمونه‌های هیدرولیز شده در زمان‌های اولیه را می‌توان به فرصت ناکافی آنزیم برای اثرگذاری بر سوبسترا و تولید پپتیدهای با قابلیت ضد اکسایش نسبت داد. با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده می‌شود.

در تحقیقی که توسط پیری و همکاران در سال ۱۳۹۳ منتشر شد، برای دستیابی به بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پروتئین آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز با کاربرد نرم افزار سطح پاسخ، محدوده متغیرها شامل $43-55^{\circ}\text{C}$ ، زمان $60-173$ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا $40-90$ (واحد آنسون/کیلوگرم پروتئین) در نظر گرفته شد. شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژن به ترتیب دمای $49/02^{\circ}\text{C}$ و $47/56^{\circ}\text{C}$ ، زمان $174/28$ و $174/51$ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای 90 و $87/84$ (واحد آنسون/کیلوگرم پروتئین) به دست آمد. شرایط بهینه برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز شده دمای $44/9^{\circ}\text{C}$ ، زمان $113/72$ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای $73/84$ (واحد آنسون/کیلوگرم پروتئین) حاصل گردید. تحت هر یک از این شرایط میزان درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب $41/57\%$ ، $70/41\%$ و $60/66\%$ به دست آمدند. مهرگان نیکو و همکاران در سال ۱۳۹۲ اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم به عنوان سه متغیر مستقل در هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال آزاد

¹ Flavourzyme

آزاد ± ۵۵٪، ۸۱٪ قدرت احیاء کنندگی 0.026 ± 0.160 ، شلاته کنندگی $3/5 \pm 68$ ظرفیت آنتی اکسیدانی کل 0.15 $\pm 1/95$ میلی مول آلفا توکوفرول بر میلی لیتر و میزان درجه هیدرولیز در این شرایط $31/75\%$ بود. این نتایج نشان می دهد که مدل توانسته تا حدود زیادی اثر ۳ متغیر دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را آزمون های فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دهد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین پنبه دانه می تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدانی در فرمولاسیون مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

پروانه، و. (۱۳۸۵). کنترل کیفیت و آزمون های شیمیایی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۳۲.

پیری، ش.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م. و اعلمی، م. (۱۳۹۳). بهینه سازی شرایط هیدرولیز پروتئین آب پنیر جهت حصول به حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش سطح پاسخ. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

طاهری، ع.، جلالی نژاد، س. و علی انوار، س.ا. (۱۳۹۱). خواص ضد فشار خون و ضد اکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). پاتوبیولوژی مقایسه ای، دوره ۹، شماره ۱، صفحات ۵۹۹-۶۰۸.

کوشکی، م.ر. خوشگذران آبرس، ص.، عزیزی، م.ح.، بلقیسی، س. و نجفی، م. ع. (۱۳۹۰). بررسی و ارائه روشی مناسب جهت تولید کنسالتره پروتئینی پنبه دانه برای مصرف انسان. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۸، شماره ۲۸.

مهرگان نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م.، طاهری، ع. و اعلمی، م. (۱۳۹۲). بهینه سازی عوامل موثر در فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۹۵-۱۱۰.

AACC. (1999). Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Accosiation of Cereal Chemists. Ins.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical -scavenging

DPPH توسط معادله درجه دوم برازش گردیدند. شرایط بهینه با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (بالا تر از $58/22\%$) در دمای $48/115^{\circ}C$ ، زمان $151/27$ دقیقه و فعالیت آنزیمی $64/43$ واحد انسون بر کیلوگرم بود.

افزایش میزان هیدرولیز از زمان ۱ ساعت تا ۴ ساعت شدت بیشتری داشت ولی در زمان های بالاتر از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته شد. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) علت این وضعیت را چنین توجیه نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش می یابد، همچنین از میزان فعالیت پروتولیتیکی آنزیم کاسته می شود که در مجموع موجب کاهش شدت هیدرولیز می شود. از طرف دیگر شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می تواند در این امر دخیل باشد.

نتیجه گیری

با توجه به اینکه کنجاله پنبه دانه حاصل از فرآیند روغن کشی، دارای تقریباً $45-50\%$ پروتئین است، می تواند منبع پروتئینی مناسب برای تولید پروتئین های هیدرولیز شده با فعالیت آنتی اکسیدانی باشد. نتایج نشان داد که روش سطح پاسخ می تواند به عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین پنبه دانه با استفاده از آنزیم پیپسین با روش سطح پاسخ توسط نرم افزار Design Expert ارزیابی شد. شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیز شده با حداکثر میزان فعالیت بهینه مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی، شلاته کنندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، دمای $31/1^{\circ}C$ ، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا $1/75\%$ تعیین گردید و تحت این شرایط میزان مهار رادیکال آزاد 83% ، قدرت احیاء کنندگی 0.158 انگستروم، شلاته کنندگی 70% و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل $1/99$ میلی مول آلفا توکوفرول بر میلی لیتر به دست آمد که در مقایسه با پروتئین هیدرولیز شده حاصل از سایر مواد گزارش شده در متون، از مقادیر قابل توجهی برخوردار می باشد. عمل هیدرولیز در شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل در سه تکرار انجام گردید و نتیجه با مقدار پیش بینی شده توسط آن مقایسه گردید، که نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در این شرایط برای میزان مهار رادیکال های

activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal protease. *Food chemistry*, 114, 1198-1205.

Cho, M. J., Unklesbay, N., Fu-Hung, H. D. & Clarke, A. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 5895-5901.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczki, M. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food chemistry*, 109, 144-149.

Erdmann, K., Cheung, W. Y. B. & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. *Journal of Nutrition and Biochemistry*, 19, 643-654.

Gao, D., Chang, T., Li, H. & Cao, Y. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. *African Journal of Biotechnology*, 9, 8977-8983.

Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. & Gomez-Guillé, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114, 976-983.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A. & Nasri, M. (2011). Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*sepia officinalis*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus mojavensis* A21 proteases. *Food Research International*, 44, 2703-2711.

Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. & Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: The carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. *Food and Chemical Toxicology*, 24, 1099-1102.

Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. & Ahn, H. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42, 1266-1272.

Kamau, K., Therakulkait, C. & Cadwallader, K. (2009). Effect of preparation

conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolysed rice bran protein concentrate. *Journal of Cereal Science*, 50, 56-60.

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, 444-450.

Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*A. cypenser persicus*) viscera. *Journal of Food Chemistry*, 115, 238-242.

Rajakakse, N., Yung, W. K., Mendis, E., Moon, S. H. & Kim, S. K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Science*, 76, 2607-2619.

Samaranayaka, G. P. A. & Li-Chan, C. Y. E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*, 3, 229-254.

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

Silva, V. S. & Malcata, F. X. (2004). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Science*, 15, 1-15.

Sun, Q., Shen, H. & Leu, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 21, 6646-6652.

Takenaka, A., Annaka, H., Kimura, Y., Aoki, H. & Igarashi, K. (2003). Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 67, 278-283.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B. & Yonsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chemistry*, 132, 104-111.