

## بهینه‌یابی فرآیند تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین

سیده نرگس مظلومی<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، محمد قربانی<sup>۳</sup>، فیدل تولدرا<sup>۴</sup>، غلامرضا هوشمند<sup>۵</sup>

- ۱- دکتری علوم و صنایع غذایی - شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- ۲- نویسنده مسئول: استاد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، Pست الکترونیکی: Sadeghiaz@gau.ac.ir
- ۳- دانشیار علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- ۴- استاد گروه بیوشیمی، موسسه علوم غذایی (تکنولوژی و شیمی مواد غذایی) دانشگاه والنسیا، مرکز تحقیقات ملی اسپانیا
- ۵- استادیار گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۴

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۱/۲۶

### چکیده

**سابقه و هدف:** نتایج حاصل از مشاهدات و مطالعات در طول سال‌های متوالی، نشان داده است که سلامت و تغذیه بسیار به هم وابسته‌اند. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای تعریف می‌شوند که پس از ورود و جذب به بدن، توانایی تحریک فعالیت‌های مطلوب را دارند. در این پژوهش تأثیر افزودن آنزیم پپسین بر پروتئین هسته پرتقال جهت دستیابی به پروتئین هیدرولیز شده انجام گرفت و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ارزیابی شد.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش ابتدا استخراج کنسانتره پروتئین صورت گرفت، سپس با استفاده از اثر آنزیم پپسین در نسبت مختلف (۱ تا ۳٪ وزنی - وزنی) و بازه زمانی (۲ تا ۵ ساعت) در دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، پروتئین هسته پرتقال هیدرولیز شد و شرایط بهینه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای بهترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهارکنندگی رادیکال OH، قدرت احیاکنندگی  $Fe^{3+}$  و ویژگی آنتی‌اکسیدانی کل) انتخاب شد.

**یافته‌ها:** تیمار بهینه در شرایط تعیین شده (دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴ ساعت و نسبت ۲/۳۵ درصد وزنی - وزنی) با مقادیر ۵۹/۶۳ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۴۸/۱۲ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های OH، ۵۷/۸۳ درصد برای قدرت احیاکنندگی  $Fe^{3+}$  و ۸۷/۵۹ درصد برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به دست آمد. آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی به منظور تأیید مقادیر پیشنهاد شده توسط نرم افزار، بر تیمار بهینه صورت گرفت.

**نتیجه‌گیری:** نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هسته پرتقال می‌تواند در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان افزودنی طبیعی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و نیز استفاده به عنوان دارو قابلیت کاربرد داشته باشد.

**واژگان کلیدی:** هسته پرتقال، خصوصیات ضد اکسیدانی، پپتیدهای زیست فعال، آنزیم پپسین، بهینه‌یابی

### • مقدمه

فعال بوده و توسط فرآیندهایی نظیر: تخمیر میکروبی پروتئین توسط میکروب‌های پروتئولیتیک، پروتئولیز توسط آنزیم‌های استخراج شده از گیاهان و یا میکروارگانیسم‌ها و نیز پروتئولیز توسط آنزیم‌های گوارشی آزاد می‌شوند (۵، ۶). WiryapHan و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که پپتیدهای به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی توسط پپسین، آلکالاز و تریپسین دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (۷). نتایج حاصل از مشاهدات Chen و همکاران (۲۰۱۴) نشان داده است که در هیدرولیز پروتئین تخم مرغ با استفاده از مخلوط آنزیم-

پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای تعریف می‌شوند که پس از ورود و جذب در بدن، توانایی تحریک فعالیت‌های مطلوب و فیزیولوژیکی نظیر فعالیت‌های هورمونی را نیز دارند (۱، ۲). فعالیت‌های بیولوژیکی ناشی از این پپتیدها، شامل فعالیت ایمنی‌زایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد فشارخون، ضد میکروبی، ضد ترومبوتیک، چلاته‌کنندگی فلزات (نظیر آهن)، قدرت اتصال دهندگی به مواد معدنی می‌باشند (۳، ۴). این ترکیبات زیست فعال اغلب در مولکول‌های پروتئین اولیه خود به‌صورت غیر -

این کشت میکروبی و همچنین بر رهايش پپتیدهای با ویژگی آنتی‌اکسیدانی ارزیابی کردند. نتایج بیانگر ایجاد ۷۰٪ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ۶۹/۸٪ فعالیت احیا کنندگی یون آهن سه ظرفیتی بود (۱۴). Castro و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه ای در رابطه با اثر تقویت کننده‌ی چندین پروتئین هیدرولیز شده شامل ایزوله ی پروتئین سویا، پروتئین سرمی گاو و پروتئین سفیده‌ی تخم مرغ انجام دادند. هیدرولیز توسط پروتئاز فلاورزایم انجام شد. نتایج آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی نشان داد مخلوط پروتئین‌های هیدرولیز شده که با مدل آماری طرح میکسچر (Mixture) در سطوح مشخصی با یکدیگر مخلوط شده بودند باعث افزایش حدود سه برابر مهار رادیکال آزاد DPPH گردید و نتایج به کارگیری هیدرولیز شده‌های پروتئینی از منابع مختلف پروتئینی را به عنوان منبع غنی جهت کنترل و کاهش واکنش‌های اکسیداسیون پیشنهاد کردند (۱۵). نتایج حاصل از مشاهدات نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین سویای تخمیر شده توسط باکتری لاکتوباسیلوس سوبتیلیس در غلظت ۱۰ mg/ml دارای فعالیت بازدارندگی بر رادیکال‌های سوپراکسید (۶۲٪) و هیدروکسیل (۹۶٪) نیز می‌باشد (۱۶). به‌طور کلی نتایج حاصل از مطالعات انجام شده نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌عنوان جایگزین پروتئین‌های هیدرولیز نشده به‌کار گرفته می‌شوند و نتایج نیز نشان داده است که این ترکیبات زیست فعال در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله: بیماری‌های کبدی، فنیل کتونوریا، فشارخون، دیابت تا حدودی موثر می‌باشند و نیز به‌طور موفقیت آمیزی در رژیم غذایی افراد میان‌سال و ورزشکار، به عنوان ترکیبات فراسودمند و انرژی زا جهت تولید فرآورده‌های غنی شده با پپتیدهای زیست فعال به‌کار گرفته می‌شوند (۱۷).

میوه پرتقال، از گونه مرکبات (*Citrus*) و خانواده (*Rutaceae*) می‌باشد که در کشورهای مدیترانه‌ای به میزان قابل توجهی تولید می‌گردد (۱۸). نتایج حاصل از مطالعات نشان داده است که هسته مرکبات منابع غنی و با ارزشی از پروتئین و روغن‌های گیاهی و خوراکی می‌باشد و این میزان پروتئین در مقادیر ۲۶/۵-۱۷/۹٪ بر اساس وزن خشک متغیر است (۱۹). همچنین براساس نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که هسته پرتقال دارای مقادیر مناسبی از مواد معدنی، از جمله کلسیم و روی نیز می‌باشد؛ در نتیجه از آرد چربی‌گیری شده حاصل از هسته پرتقال می‌توان به‌عنوان مواد افزودنی موثر در غذاها استفاده کرد (۲۰). از

های آلكالاز و پروتئاز، پپتیدهایی که دارای وزن مولکولی پایین و در حدود ۵ کیلودالتون می‌باشند، دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مهار کردن رادیکال DPPH و رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای یون آهن می‌باشند (۸). Bougatif و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی ساردین با استفاده از آنزیم‌های پروتئازی، به این نتیجه دست یافتند که با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نیز افزایش می‌یابد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز هستند (۹). نتایج حاصل از هیدرولیز گونه‌ای از ماهی نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش درجه هیدرولیز تا ۴۰٪ افزایش می‌یابد (۱۰). Lahart و همکاران (۲۰۱۱) به این نتیجه دست یافتند که طی هیدرولیز پروتئین، وزن مولکولی ترکیبات حاصل از هیدرولیز کاهش می‌یابد و هیدرولیزات‌های با وزن مولکولی کمتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (۱۱). نتایج حاصل از آزمایشات نشان داده است که هیدرولیز پروتئین گوشت گوسفند در حضور آنزیم‌های آلكالاز، پپسین و کیموتریپسین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشد. به‌طور کلی این ویژگی را می‌توان به‌حضور مقادیر بالایی از اسیدهای آمینه هیستیدین و لوسین نسبت داد. بیشتر محققان بر این باورند که آب‌گریزی نقش بسیار کلیدی در پپتیدهای زیست فعال چند منظوره از جمله: خاصیت ضد فشارخون بالا و آنتی‌اکسیدانی دارد (۱۲). نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده‌ی کدو تخم کاغذی (*Cucurbita pepo*) توسط دو آنزیم آلكالاز و تریپسین، به این نتایج دست یافتند که هیدرولیز شده‌های پروتئینی تولید شده توسط آنزیم آلكالاز، از نظر مهار کردن رادیکال‌های آزاد DPPH، چلاته کنندگی یون آهن و آنتی‌اکسیدانی کل، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدرولیز شده‌های تولید شده توسط آنزیم تریپسین می‌باشند و یک رابطه مستقیم میان خاصیت آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌های هیدرولیز شده و اسیدهای آمینه هیدروفوب وجود دارد (۱۳). مویدی و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از روش تخمیر میکروبی (توسط باسیلوس سوبتیلیس A) بر فرآورده‌ی جانبی کارخانه‌ی رب شامل تفاله و دانه‌ی باقی مانده حاصل از مرحله‌ی رب‌گیری، اقدام به تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی با ارزش افزوده کردند. در این تحقیق آن‌ها اثر شرایط مختلف شامل دمای گرم خانه و زمان تخمیر و میزان pH را بر فعالیت پروتئازی آنزیم‌های

پرتقال به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط شد و در دمای محیط با سدیم هیدروکسید یک نرمال به بیشینه pH حلالت رسانده شد (pH=۱۰). سپس نمونه حاصل به مدت یک ساعت در دمای محیط هم زده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Hanil, combi 514R, Korea) گردید. سوپرناتانت حاصل جداسازی شده و با اسید کلریدریک ۱ نرمال به نقطه ایزوالکتریک (pH=۳) رسانده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. در مرحله بعد سوسپانسیون حاصل در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوبات حاصل با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و توسط خشک کن انجمادی (مدل FD<sub>4</sub>، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی) خشک شدند (۲۲).

**تهیه پروتئین هیدرولیز شده:** به منظور هیدرولیز کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال، ابتدا آنزیم پپسین با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی به وزنی (آنزیم به سوبسترا) به محلول کنسانتره پروتئینی افزوده شد و هیدرولیز در مدت زمان‌های ۲ تا ۵ ساعت و دمای ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد (pH اپتیمم آنزیم پپسین) در انکوباتور شیکردار انجام گرفت. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف شد. به منظور حذف ترکیبات اضافی، سانتریفیوژ کردن در ۱۲۰۰۰ rpm به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد انجام شد و در نهایت سوپرناتانت حاصل پس از جمع آوری جهت انجام آزمون‌های بهینه‌سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگهداری گردید (۲۳).

**بهینه‌یابی فرآیند جهت دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت ضد اکسیدانی:** به منظور بهینه‌یابی فرآیند از نظر خواص ضد اکسایش، از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای سه متغیر مستقل: غلظت آنزیم به سوبسترا ( $X_1$ )، دما ( $X_2$ ) و زمان هیدرولیز ( $X_3$ ) در سه سطح (+۱، ۰، -۱) استفاده گردید. پاسخ‌های مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت مهارکنندگی یون  $Fe^{3+}$ ، اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال OH و اندازه‌گیری ظرفیت ضد اکسایش کل بودند. به این منظور ۲۰ تیمار تصادفی، با در نظر گرفتن ۶ تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم افزار Design Exper پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است.

طرفی مقدار ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در هسته پرتقال، از جمله: اسید فیتیک، تانین، بازدارنده تریپسین و اگزالات به ترتیب ۱۰/۷۱ میلی‌گرم، ۳/۵ میلی‌گرم، ۱/۷۶ میلی‌گرم، ۲/۴۸ میلی‌گرم به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن آرد پرتقال بر اساس وزن خشک نیز گزارش شده است (۲۰). همچنین مقادیر اسیدهای آمینه آبریز در این هسته زیاد است، از این رو انتظار می‌رود این گیاه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده منبع مناسبی باشد (۲۰).

تاکنون براساس اطلاعات موجود از آن‌جایی که، تحقیقی در زمینه هیدرولیز پروتئین از آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال توسط آنزیم‌های پروتئازی صورت نگرفته است؛ لذا در این تحقیق سعی می‌شود پروتئین آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با کیفیت مناسب و خاصیت سلامتی بخش بالا (ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا) توسط آنزیم پپسین، مورد هیدرولیز قرار گیرد و ویژگی آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز در محیط *in-vitro* مورد ارزیابی قرار گیرد.

## • مواد و روش‌ها

مواد اولیه تهیه شده این تحقیق (هسته پرتقال)، از شرکت تعاونی کشاورزی باغداران مرکبات رامسر- کارخانجات کشت و صنعت کوثر تهیه گردید. تمام مواد شیمیایی به کار برده شده این پژوهش از شرکت Merck تهیه شدند و از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

**آماده سازی آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال:** ابتدا پوست و مقادیر باقی مانده‌ی پالپ از تفاله هسته پرتقال جدا گردید؛ سپس هسته پرتقال پس از تمیز شدن و خشک کردن در برابر تابش نور آفتاب، توسط دستگاه آسیاب (Perten, 3100) ساخت کشور آلمان، به آرد تبدیل و از الک با مش ۳۰ عبور داده شد. آرد کامل حاصل به مدت ۴ ساعت (در دو نوبت) با حلال n- هگزان با خلوص بیش از ۹۵٪ با نسبت ۱:۱۰ چربی‌گیری و پس از نگهداری به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط به منظور خروج کامل بقایای حلال، مجدداً از الک با مش ۷۰ عبور داده شد، اندازه‌گیری ترکیبات تشکیل دهنده کنجاله چربی‌گیری شده (شامل رطوبت، پروتئین، چربی، خاکستر) با استفاده از روش AOAC انجام گرفته شد (۲۱) و در نهایت آرد چربی‌گیری شده تا مرحله استخراج پروتئین در دمای فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**تولید کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده:** به منظور تهیه‌ی کنسانتره‌ی پروتئینی هسته پرتقال، ابتدا آرد چربی‌گیری شده‌ی هسته‌ی

### آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: به منظور اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ابتدا ۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیز شده به همراه ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰.۰۲٪) و ۱ میلی‌لیتر اتانول مخلوط شده و سپس بعد از طی شدن مدت زمان لازم در محیط تاریک، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ خوانده شد. درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH از رابطه‌ی ۵ محاسبه شد (۲۴):

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی یون  $Fe^{3+}$ : در اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی یون آهن، در ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۲۵۰ میکرولیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲۵۰ میکرولیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد با هم مخلوط شدند و پس از هم زدن به مدت یک دقیقه، مخلوط حاصل در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. پس از سپری شدن زمان گرمخانه‌گذاری، به مخلوط فوق، ۲۵۰ میکرولیتر از تری کلریدریک اسید ۱۰ درصد حجمی- وزنی اضافه گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در سانتریفیوژ با دور ۱۶۵۰g در دمای محیط سانتریفیوژ گردید. سپس ۲۵۰ میکرولیتر سوپرناتانت حاصل از مرحله فوق، با ۵۰ میکرولیتر از محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد وزنی- حجمی و ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر مخلوط گردید و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید (۲۵).

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال OH: در این آزمون، ۱۰۰ میکرولیتر از محلول فنانترولین ۱/۸۶۵ میلی مولاری و ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با هم مخلوط شدند. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  ۱/۸۶۵ میلی مولاری به مخلوط فوق اضافه گردید و پس از مخلوط شدن، ۱۰۰ میکرولیتر از  $H_2O_2$  سه درصد (حجمی - حجمی) نیز به محتویات فوق اضافه شد و پس از گرمخانه‌گذاری محتویات در دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت ۶۰ دقیقه، در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۸ نانومتر قرائت گردید و درصد قدرت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل از رابطه‌ی ۶ زیر محاسبه شد (۲۶).

جدول ۱. سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه‌یابی فعالیت

| ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال |              |               |  |
|--|--------------|---------------|--|
| حد بالا (+1)                                 | حد متوسط (۰) | حد پایین (-1) | حدود تغییرات   |
| ۱  | ۲            | ۳             | متغیرهای مستقل                                       |
| ۲  | ۲/۵          | ۵             | نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد وزنی - وزنی) $X_1$       |
| ۳۰   | ۳۵           | ۴۰            | زمان (ساعت) $X_2$                                    |
|  |              |               | دمای هیدرولیز برای آنزیم پپسین ( $^{\circ}C$ ) $X_3$ |

مدل‌های رگرسیونی به منظور پیش بینی پاسخ‌های مد نظر (قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت مهار رادیکال OH، قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  و ظرفیت ضد اکسایش کل جهت هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین) ارائه شده است (روابط ۱ تا ۴).

پاسخ یا متغیر وابسته (فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهار رادیکال OH، قدرت مهار رادیکال  $Fe^{3+}$  و ظرفیت ضد اکسایش کل پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم پپسین در مقادیر واقعی)،  $b_0$  مقدار ثابت،  $b_1$ ،  $b_2$ ،  $b_3$  اثرات خطی،  $b_{11}$ ،  $b_{22}$ ،  $b_{33}$  اثرات درجه دوم،  $b_{12}$ ،  $b_{23}$ ،  $b_{13}$  اثرات متقابل می‌باشند.

تیمارهای پیشنهاد شده توسط نرم افزار جهت هیدرولیز، نیز در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲. تیمارهای تصادفی پیشنهادی جهت هیدرولیز کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین

| تیمار | غلظت آنزیم (درصد وزنی به وزنی) | دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد) | زمان هیدرولیز (یز ساعت) |
|-------|--------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| ۱     | ۱                              | ۳۰                              | ۲                       |
| ۲     | ۱                              | ۳۰                              | ۵                       |
| ۳     | ۲                              | ۳۰                              | ۲/۵                     |
| ۴     | ۳                              | ۳۰                              | ۲                       |
| ۵     | ۳                              | ۳۰                              | ۵                       |
| ۶     | ۱                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۷     | ۲                              | ۲۵                              | ۲                       |
| ۸     | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۹     | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۰    | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۱    | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۲    | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۳    | ۲                              | ۲۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۴    | ۲                              | ۳۵                              | ۵                       |
| ۱۵    | ۳                              | ۳۵                              | ۲/۵                     |
| ۱۶    | ۱                              | ۴۰                              | ۲                       |
| ۱۷    | ۱                              | ۴۰                              | ۵                       |
| ۱۸    | ۲                              | ۴۰                              | ۲/۵                     |
| ۱۹    | ۳                              | ۴۰                              | ۲                       |
| ۲۰    | ۳                              | ۴۰                              | ۵                       |

رابطه ۱: مدل رگرسیونی قدرت مهار رادیکال DPPH :

$$b_3x_3 - b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 + b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 + Y = b_0 + b_1x_1 - b_2x_2$$

رابطه ۲: مدل رگرسیونی قدرت مهار رادیکال OH :

$$Y = b_0 - b_1x_1 - b_2x_2 - b_3x_3$$

رابطه ۳: مدل رگرسیونی قدرت مهار رادیکال Fe<sup>3+</sup>:

$$Y = b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 - b_3x_3 - b_{12}x_1x_2 - b_{13}x_1x_3 - b_{23}x_2x_3 - b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 - b_{33}x_3^2$$

رابطه ۴: مدل رگرسیونی ظرفیت ضد اکسایش کل:

$$Y = -b_0 + b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 - b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 - b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 - b_{22}x_2^2 - b_{33}x_3^2$$

رابطه ۵:

$$100 \times \text{جذب کنترل} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل}) = \text{درصد بازدارندگی}$$

رابطه ۶:

$$\text{قدرت مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل} = [(As - An) / (Ab - An)] \times 100\%$$

As = جذب نمونه

An = جذب نمونه کنترل منفی که شامل تمام ترکیبات بالا (به جز پروتئین هیدرولیز شده) می باشد.

Ab = جذب نمونه بلانک که شامل تمام ترکیبات بالا (به جز نمونه پروتئین هیدرولیز شده و H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) می باشد.

میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ انجام شد. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم گراف‌ها با نرم‌افزار Excell انجام گرفت. کلیه‌ی آزمایشات در سه تکرار انجام شد.

#### • یافته‌ها

**ترکیب شیمیایی:** ترکیبات شیمیایی آرد روغن گیری شده و کنسانتره پروتئین هسته پرتقال در جدول ۳ آورده شده است. همانطور که در جدول مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت هسته پرتقال چربی‌گیری شده، ۵۲/۰ ± ۱۳/۷ درصد بود. این مقدار بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشد (۱۵). میزان چربی و خاکستر هسته پرتقال چربی‌گیری شده بر اساس وزن خشک، به ترتیب (۱۵/۰ ± ۴۶/۵) و (۱۷/۰ ± ۶۶/۲) بود؛ که به ترتیب کمتر و بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشند (۲۰). میزان پروتئین آرد کامل چربی‌گیری شده حدوداً ۳/۵۱ ± ۲۲/۴۷ درصد و این مقدار در کنسانتره پروتئینی حدوداً ۱/۴۱ ± ۷۵/۱۲ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج حاصل، با اعمال فرایند روغن‌گیری، میزان پروتئین بیشتری به دست آمد و عمل چربی‌گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی کنسانتره پروتئین شد (۳۸/۴۳٪ به ۴۶/۵٪). علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه به-کار گرفته شده‌ی این پژوهش با پژوهش‌های قبل را می‌توان به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرایند نسبت داد.

#### اندازه‌گیری ظرفیت ضد اکسایش کل (Total

**Antioxidant Capacity):** جهت انجام این آزمون، ابتدا ۱۰۰

میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف مولیبدات (اسید سولفوریک ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی مولار و مولیبدات آمونیوم ۴ میلی مولار) مخلوط گردید و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در بن ماری ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۷).

**تجزیه و تحلیل آماری:** به منظور بهینه‌یابی فرآیند هیدرولیز کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده شد و ترسیم نمودارها توسط نرم افزار Design Expert صورت گرفت.

در این تحقیق از نرم افزار آماری Design Expert برای اعمال طرح آماری سطح پاسخ استفاده شد. طرح آماری مذکور با طراحی کامپوزیت مرکزی و تعداد ۲۰ ران آزمایشی که شامل نقطه‌ی مرکزی با شش تکرار و هفت نقطه‌ی محوری و هفت نقطه‌ی مکعبی بود طراحی گردید. متغیرهای مستقل مورد آزمون شامل زمان هیدرولیز (۵-۲ ساعت) و میزان آنزیم مصرفی (۱-۳٪) و دمای هیدرولیز (۴۰-۳۰ درجه سانتی-گراد)، متغیرهای وابسته در این پژوهش شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH، فعالیت مهارکنندگی رادیکال OH، قدرت چلاته‌کنندگی یون آهن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بود. تجزیه تحلیل مربوط به دیگر نتایج پژوهش در قالب طرح فاکتوریل صورت گرفت و مقایسه

### بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH: در معادله ۷

با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH) ارائه شد. در این معادله،  $(X_1)$  به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا،  $(X_2)$  به عنوان دمای هیدرولیز و  $(X_3)$  به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۷۴۶۵ و ۰/۶۱۸۴ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تبیین برابر ۰/۷۴۶۵ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۷۴ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

### جدول ۳. ترکیب شیمیایی کنجاله چربی گیری شده و کنسانتره پروتئین

| هسته پرتقال      |                      |                                     |
|------------------|----------------------|-------------------------------------|
| کنسانتره پروتئین | کنجاله چربی گیری شده |                                     |
| ۷۵/۱۲ ± ۱/۴۱     | ۲۲/۴۷ ± ۳/۵۱         | پروتئین (N×۶/۲۵)                    |
| ۵/۴۶ ± ۰/۱۵      | ۴۳/۳۸ ± ۰/۵۸         | چربی                                |
| ۸/۷۹ ± ۰/۱۷      | ۷/۱۳ ± ۰/۵۲          | رطوبت                               |
| ۱/۶ ± ۰/۲۳       | ۲/۶۶ ± ۰/۱۷          | خاکستر                              |
| ۹/۰۳             | ۲۴/۳۶                | کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات) |

\* اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

\* میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

### فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده:

ارزیابی فعالیت ضد اکسیدانی تمام تیمارهای پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پپسین، در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داده است که اختلاف معنی‌داری بین فعالیت ضد اکسیدانی تیمارهای مختلف در سطح ۵ درصد وجود داشت.

### بهبهینه‌یابی فرآیند به منظور دست‌یابی به تیمار با

### بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی

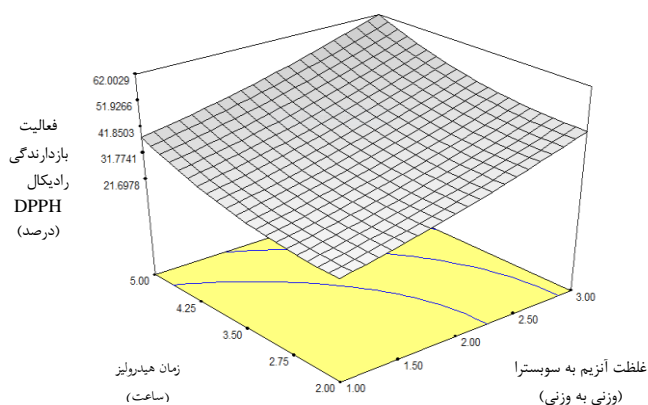
معادله ۷:

$$35.82 + 11.98 (X_1) - 3.66 (X_2) + 8.18 (X_3) - 3.04 (X_1 X_2) + 0.015 (X_1 X_3) + 5.34 (X_2 X_3) + 1.71 X_1^2 + 23.98 X_2^2 + 4.30 X_3^2$$

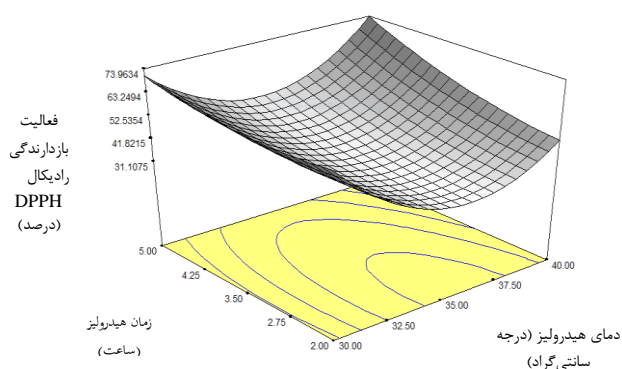
### جدول ۴. تیمارهای تصادفی و فعالیت ضد اکسایش پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین

| تیمار | غلظت آنزیم (%) | دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد) | زمان هیدرولیز (ساعت) | فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (%) | فعالیت مهارکنندگی رادیکال OH (%) | فعالیت احیا کنندگی $Fe^{3+}$ | فعالیت آنتی-اکسیدانی کل |
|-------|----------------|---------------------------------|----------------------|------------------------------------|----------------------------------|------------------------------|-------------------------|
| ۱     | ۱              | ۳۰                              | ۵                    | ۶۰/۶                               | ۸۰/۶۹                            | ۰/۵۳۷                        | ۰/۴۰۵                   |
| ۲     | ۳              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۷۹/۹۵                              | ۳۹/۳                             | ۰/۶۴۹                        | ۰/۹۳۱                   |
| ۳     | ۳              | ۳۰                              | ۲                    | ۷۵/۷۵                              | ۸۸/۲                             | ۰/۵۵۹                        | ۰/۶۹۹                   |
| ۴     | ۲              | ۳۵                              | ۵                    | ۶۰/۳۳                              | ۳۴/۴۵                            | ۰/۵۳۵                        | ۰/۹۰۱                   |
| ۵     | ۳              | ۳۰                              | ۵                    | ۸۱/۸۱                              | ۴۲/۶۵                            | ۰/۵۳۷                        | ۰/۸۸۹                   |
| ۶     | ۳              | ۴۰                              | ۲                    | ۴۸/۸۵                              | ۴۲/۶۵                            | ۰/۶۰۴                        | ۰/۹۵۲                   |
| ۷     | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۸/۱۸                              | ۱۷/۸                             | ۰/۶۶۱                        | ۰/۹۲۳                   |
| ۸     | ۲              | ۳۵                              | ۲                    | ۴۱/۵                               | ۵۶/۸۷                            | ۰/۶۷۲                        | ۰/۸۹۹                   |
| ۹     | ۱              | ۳۰                              | ۲                    | ۵۶/۵۴                              | ۳۹/۴۲                            | ۰/۵۲۲                        | ۰/۲۷۳                   |
| ۱۰    | ۱              | ۴۰                              | ۲                    | ۳۹/۸۷                              | ۷۳/۷۵                            | ۰/۵۴۱                        | ۰/۹۳۹                   |
| ۱۱    | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۸/۱۸                              | ۳۲/۶                             | ۰/۵۴۲                        | ۰/۸۸۵                   |
| ۱۲    | ۳              | ۴۰                              | ۵                    | ۷۴/۳۲                              | ۳۶/۳                             | ۰/۵۲۲                        | ۰/۹۳۳                   |
| ۱۳    | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۹                                 | ۴۲/۱۹                            | ۰/۶۱۶                        | ۰/۸۷۱                   |
| ۱۴    | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۸/۶                               | ۳۰/۸۶                            | ۰/۶۰۶                        | ۰/۸۹۳                   |
| ۱۵    | ۱              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۱۶/۷                               | ۸۱/۳۸                            | ۰/۵۲۸                        | ۰/۹۰۶                   |
| ۱۶    | ۲              | ۳۰                              | ۳/۵                  | ۶۶/۶۶                              | ۸۰/۳۴                            | ۰/۶۴۷                        | ۰/۵۷۶                   |
| ۱۷    | ۲              | ۴۰                              | ۳/۵                  | ۷۴/۵۳                              | ۱۷/۶۸                            | ۰/۶۱۶                        | ۰/۹۵۶                   |
| ۱۸    | ۱              | ۴۰                              | ۵                    | ۶۷/۲۲                              | ۲۰/۸                             | ۰/۵۵                         | ۰/۹۵                    |
| ۱۹    | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۸/۸۱                              | ۳۳/۶۴                            | ۰/۶۱۱                        | ۰/۸۸۲                   |
| ۲۰    | ۲              | ۳۵                              | ۳/۵                  | ۲۹                                 | ۳۶/۵۳                            | ۰/۶۰۸                        | ۰/۸۸۷                   |

می‌تواند ناشی از پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده پروتئینی باشد که باعث شکستن زنجیره‌ی برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تشکیل شده در مراحل اولیه هیدرولیز و کاهش آن‌ها می‌شود.



شکل ۲. نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH (دما در حد بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد فرض شده است).



شکل ۳. نمودار سه بعدی تأثیر زمان و دما بر قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH (نسبت آنزیم به سوبسترا در حد بهینه ۲ درصد فرض شده است).

### بررسی قدرت مهارکنندگی رادیکال OH: معادله ۸ با

توجه به ضرایب رگرسیون و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (قدرت مهارکنندگی رادیکال OH) ارائه شد:

معادله ۸:

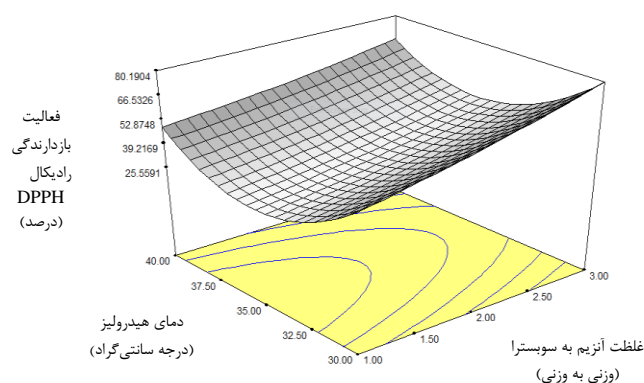
$$= 46.25 - 4.69 (X_1) - 14.31 (X_2) - 8.60 (X_3)$$

که در این معادله (۸)،  $(X_1)$  به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا،  $(X_2)$  به عنوان دمای هیدرولیز و  $(X_3)$  به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان

### اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت مهار رادیکال

آزاد DPPH: نمودار سه بعدی تأثیر دما و غلظت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در شکل ۱ نشان می‌دهد که افزایش دما و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، تأثیر مثبت بر افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH داشت و منجر به افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال گردید. بنابراین بهتر است جهت دستیابی به بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، از دما (محدوده ۳۷-۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غلظت آنزیم بالاتر در زمان ثابت استفاده نمود.



شکل ۱. نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH (زمان در حد بهینه ۳/۵ ساعت فرض شده است).

نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، در شکل ۲ نشان می‌دهد که افزایش زمان و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، یک تأثیر مثبت بر افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH دارند و منجر به افزایش فعالیت مهارکنندگی شدند و بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در بیشینه زمان (۵ ساعت) و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (۳ درصد) انجام گرفت.

نمودار سه بعدی تأثیر دما و زمان (در میزان بهینه نسبت آنزیم به سوبسترا ۲ درصد) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در شکل ۳، نشان می‌دهد که با افزایش دما، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH ابتدا کاهش و سپس افزایش یافت و کمترین فعالیت مهارکنندگی DPPH، در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده شد. افزایش زمان نیز تأثیر مثبت بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH داشت، اما در زمان‌های بالاتر، تأثیر زمان بر افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، به‌طور ملایم‌تری صورت پذیرفت که دلیل این امر،

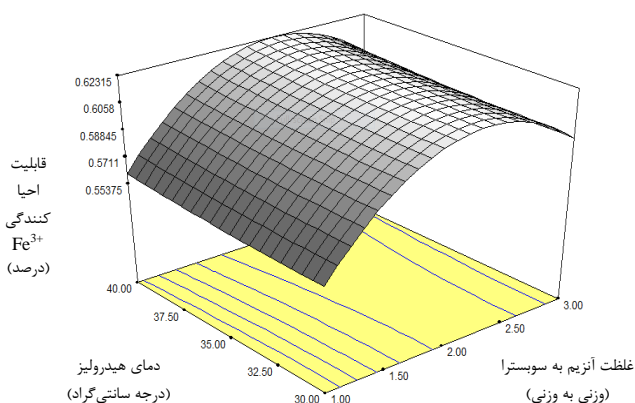
معادله ۹:

$$0.62 + 0.019 (X_1) + 3.1 (X_2) - 0.022 (X_3) - 2.5 (X_1X_2) - 0.016 (X_1X_3) - 8.25 (X_2X_3) - 0.042 X_1^2 + 1.5 X_2^2 - 0.027 X_3^2$$

که در این معادله،  $(X_1)$  به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا،  $(X_2)$  به عنوان دمای هیدرولیز و  $(X_3)$  به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده به ترتیب برابر با ۰/۷۹۵۳ و ۰/۶۳۱۰ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تبیین برابر ۰/۷۹۵۳ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۷۹ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

**اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$ :** نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در شکل ۵ نشان می‌دهد که افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، ابتدا سبب افزایش و سپس کاهش فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  می‌شود؛ اما در ادامه از شدت تأثیر غلظت نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  کاسته شد و بیشترین فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در غلظت ۲/۱۶ درصد آنزیم مشاهده شد. افزایش دما یک روند افزایشی بر فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  داشته و با افزایش دما، روند احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  به آرامی افزایش یافت.

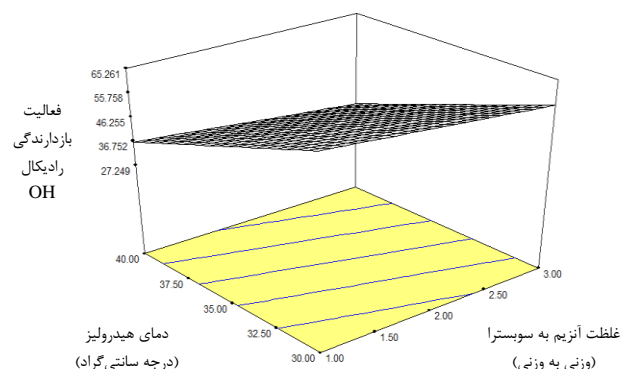


شکل ۵. نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  (زمان در حد بهینه ۳/۵ ساعت فرض شده است).

برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده به ترتیب برابر با ۰/۶۸۵۲ و ۰/۶۳۴۱ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تبیین برابر ۰/۶۸۵۲ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۶۸ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

**اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت مهار رادیکال OH:** نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH در شکل ۴ نشان می‌دهد که افزایش دما و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، یک تأثیر منفی بر افزایش فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH داشت. اما تغییرات دمایی تأثیر منفی بیشتری بر فعالیت مهار-کنندگی رادیکال OH داشت و بیشترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال OH، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱ درصد آنزیم مشاهده شد.

به‌طور کلی تفاوت در میزان مهار کنندگی رادیکال OH بین تیمارهای مختلف را می‌توان به تفاوت در نوع اسیدهای آمینه و نیز پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از هیدرولیز آنزیم نسبت داد.



شکل ۴. نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت مهار کنندگی رادیکال OH (زمان در حد بهینه ۳/۵ ساعت فرض شده است).

**بررسی قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$ :** معادله ۹ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$ ) ارائه شد:

### بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی کل: معادله ۱۰ با توجه به

ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر

قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) ارائه شد:

معادله ۱۰:

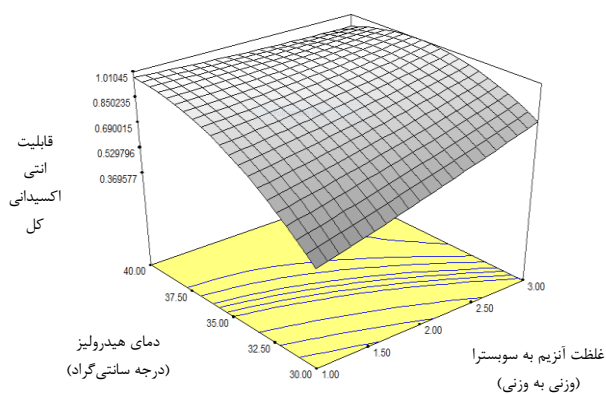
$$= 0.20 - 0.25 (X_1) - 0.65 (X_2) - 0.092 (X_3) - 0.11 (X_1 X_2) + 3.5 (X_1 X_3) - 0.041 (X_2 X_3) + 0.013 X_1^2 - 0.14 X_2^2 - 5.318 X_3^2$$

که در این معادله،  $(X_1)$  به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا،  $(X_2)$  به عنوان دمای هیدرولیز و  $(X_3)$  به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

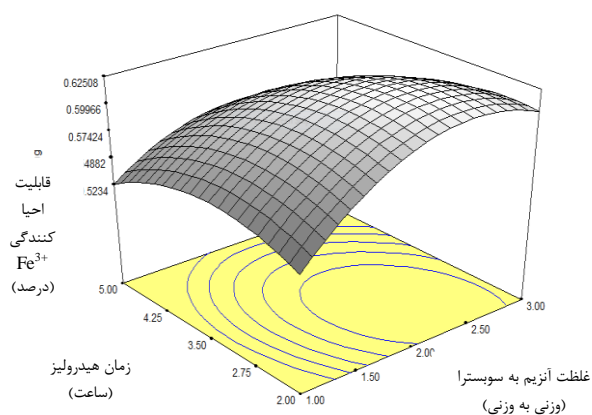
آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۹۶۰۶ و ۰/۹۲۵۱ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تعیین برابر ۰/۹۶۰۶ نشان‌دهنده این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۹۶ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

### اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت آنتی‌اکسیدانی کل:

نمودار سه بعدی ۸ تأثیر دما و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان می‌دهد که دمای هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا یک تأثیر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت و این اثر افزایشی، در نمودار دما بیشتر مشهود بود.



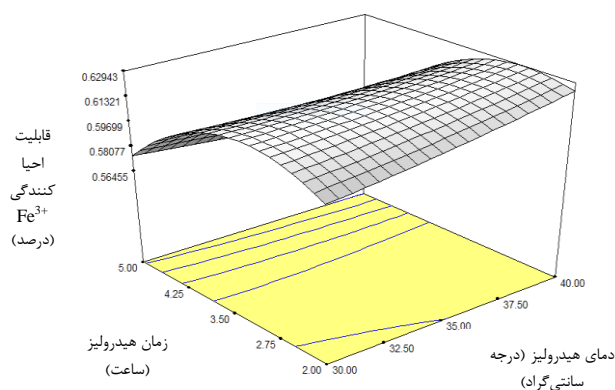
شکل ۸. نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل (زمان در حد بهینه ۳/۵ ساعت فرض شده است).



شکل ۶. نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  (دما در حد بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد فرض شده است).

نمودار سه بعدی تأثیر زمان و غلظت آنزیم پپسین به سوبسترا (در دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در شکل ۶ نشان می‌دهد که افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا و نیز افزایش زمان هیدرولیز، ابتدا سبب افزایش و سپس کاهش فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  می‌شود و بیشترین فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در غلظت ۳ درصد آنزیم و زمان ۴ ساعت مشاهده شد.

نمودار سه بعدی تأثیر دما و زمان هیدرولیز (در غلظت بهینه نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا ۲ درصد) بر فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در شکل ۷ نشان می‌دهد که دمای هیدرولیز یک تأثیر افزایشی بر فعالیت احیا کنندگی داشت و زمان هیدرولیز ابتدا سبب افزایش و سپس کاهش فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  می‌شود؛ و بیشترین فعالیت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴/۲۵ ساعت مشاهده شد.



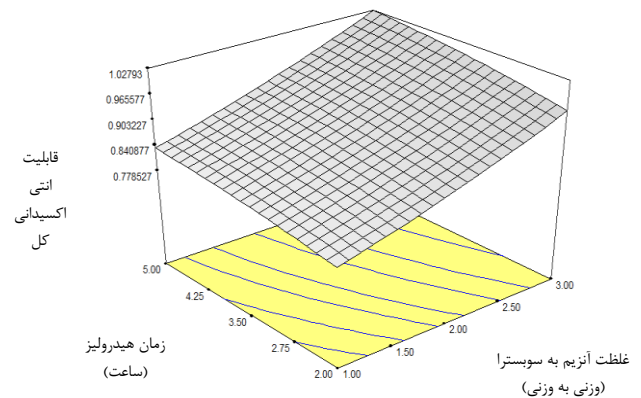
شکل ۷. نمودار سه بعدی تأثیر دما و زمان بر قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  (غلظت آنزیم به سوبسترا در حد بهینه ۲ درصد فرض شده است).

پروتئین هسته پرتقال با فعالیت بهینه (قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهارکنندگی رادیکال OH، قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) توسط آنزیم پپسین، تیمار بهینه در دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۳۵ درصد وزنی-وزنی بود. که با درجه مطلوبیت ۱۰۰ درصد منطبق با ۵۷/۹۱ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۴۶/۲۵ درصد قدرت مهار رادیکال‌های OH، ۵۸/۳۱ درصد قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  و ۸۵/۷۹ درصد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بود. به منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی (در سه تکرار) در شرایط پیش بینی شده (دمای ۳۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۴ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۳۵ درصد وزنی-وزنی) توسط مدل اجرا گردید که مقادیر ۵۹/۶۳ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۴۸/۱۲ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های OH، ۵۷/۸۳ درصد برای قدرت احیا کنندگی  $Fe^{3+}$  و ۸۷/۵۹ درصد برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به دست آمد. مقادیر آزمایشی تا حد بالایی مطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل بود که بیان‌گر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی از آرد چربی گیری شده هسته پرتقال بود.

### • بحث

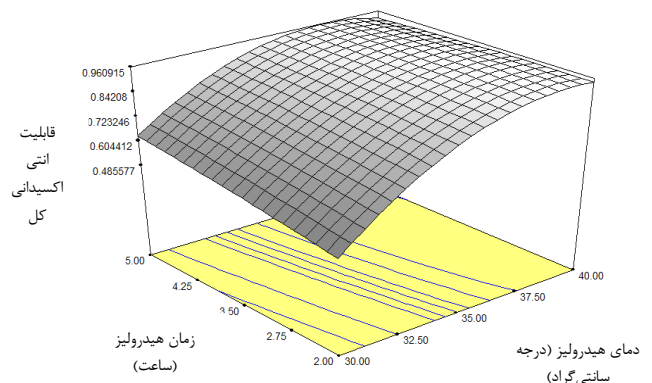
نتایج حاصل نشان داده است که آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد و اعتقاد بر این است گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال و خاصیت ضد اکسیدانی می‌باشد (۲۸). هم‌چنین اعتقاد بر این است که تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به باز شدن ساختار و قرارگیری در معرض گروه‌های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند، خواهد شد (۲۸). این موضوع به اثبات رسیده است که رابطه مستقیمی میان قدرت مهار رادیکال و ضد اکسیدانی و قابلیت هیدروژن دهنده‌گی آمینواسیدها وجود دارد. تغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر بسزایی در قدرت ضد اکسایش دارد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضد اکسایش قوی‌تری هستند (۲۸). هم‌چنین نتایج نشان داده است که فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها، به نوع پروتئاز بکار برده

نمودار سه بعدی ۹ تأثیر زمان و نسبت غلظت آنزیم پپسین به سوبسترا (در دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان می‌دهد که زمان هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا یک تأثیر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت و در نسبت ۳ درصد غلظت آنزیم به سوبسترا و زمان ۵ ساعت هیدرولیز بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مشاهده گردید.



شکل ۹. نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (دما در حد بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد فرض شده است).

نمودار سه بعدی ۱۰ تأثیر دما و زمان (در غلظت بهینه نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا ۲ درصد) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان می‌دهد که زمان هیدرولیز یک سیر صعودی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت و دمای هیدرولیز ابتدا باعث افزایش و سپس سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل گردید.



شکل ۱۰. نمودار سه بعدی تأثیر زمان و دما بر قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (غلظت آنزیم به سوبسترا در حد بهینه ۲ درصد فرض شده است).

بهینه سازی شرایط هیدرولیز جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا توسط آنزیم پپسین با استفاده از روش سطح پاسخ: نتایج به دست آمده نشان داده است که شرایط بهینه جهت هیدرولیز

توانند به عنوان اهداکننده‌ی موثر الکترون جهت کاهش رادیکال هیدروکسیل در نظر گرفته شوند (۳۵). به‌طور کلی اندازه‌گیری قدرت احیا کنندگی، جهت سنجش توانایی دادن الکترون توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها به رادیکال‌های آزاد صورت می‌گیرد و عوامل احیا کننده باعث احیای کمپلکس‌های فری سیانید و تبدیل آن‌ها به یون آهن دو ظرفیتی می‌گردند. به دلیل اینکه این کمپلکس در طول موج ۷۰۰ نانومتر در ناحیه‌ی مرئی دارای بیشترین میزان جذب می‌باشد، از این رو می‌توان غلظت یون‌های دو ظرفیتی را با اندازه‌گیری میزان جذب محلول تعیین نمود (۳۶). نتایج حاصل از پژوهش‌ها نشان داده است که آنزیم پپسین، سبب شکستن اتصالات مجاور اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شده و به دنبال شکسته شدن این باندهای پپتیدی و رها شدن از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها کاهش یافته و سپس با افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، پپتیدهای با قابلیت دادن الکترون جهت احیای یون آهن سه ظرفیتی به یون آهن دو ظرفیتی افزایش می‌یابد (۳۷). به‌طور کلی روند افزایشی و کاهش‌ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و نیز قدرت احیا کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی هسته پرتقال، را می‌توان به نوع و ماهیت آنزیم پروتئازی و شرایط انجام واکنش، اسیدهای آمینه موجود در جایگاه فعال آنزیم و نوع آنزیم به کار گرفته شده جهت انجام هیدرولیز (از نظر اندوپپتیداز یا اگزوپپتیداز بودن)، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی پپتیدهای به دست آمده طی فرآیند هیدرولیز نسبت داد؛ که این ویژگی‌ها در نوع پپتیدهای تولید شده و اهدای الکترون بسیار موثر می‌باشند (۳۸). Lassoued و همکاران (۲۰۱۵)، اعلام کردند علاوه بر اختلاف در شرایط آزمایشگاهی و نوع آنزیم بکار برده شده در فرآیند هیدرولیز، نوع سوبسترای بکار گرفته شده، توالی اسیدهای آمینه در پپتیدهای تولید شده، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی پپتیدها، در عملکرد پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها در احیای یون آهن بسیار موثر می‌باشد (۳۹). ظرفیت ضد اکسایش کل نیز بر اساس احیاء مولیبدات توسط نمونه و تولید کمپلکس مولیبدات/ فسفات سبز رنگ در شرایط اسیدی می‌باشد (۴۰). نتایج حاصل از پژوهش نشان داد که حضور اسیدهای آمینه آبگریز نظیر: اسید آمینه والین، فنیل آلانین، ایزولوسین و لوسین در پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها، نقش بسیار مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل دارند (۴۱). در بررسی پروتئین هیدرولیز شده نوعی کوسه

شده جهت هیدرولیز، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی، توالی اسیدهای آمینه و ساختار پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز وابسته است (۲۹).  
Guevar و همکاران (۲۰۰۲) بر اساس مشاهدات انجام گرفته شده به این نتایج دست یافتند که بین میزان هیدرولیز و میزان تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها با غلظت آنزیم به کار برده شده، یک رابطه مستقیم و خطی وجود دارد؛ به‌طوری‌که با افزایش غلظت آنزیم، میزان تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد (۳۰). به طور کلی با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم به کار برده شده جهت انجام هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و سبب تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای کوچک و با وزن مولکولی پایین می‌گردد. بسته به وزن مولکولی، بار، و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد در آن‌ها نیز افزایش می‌یابد (۳۱). به‌طور کلی نتایج حاصل از آزمایشات و پژوهش‌ها نشان داده است که پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی با وزن مولکولی پایین و در محدوده ۱-۳ کیلو دالتون، دارای بالاترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال می‌باشند (۳۲) و نیز پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای محتوی اسید آمینه هیستیدین با اهداء هیدروژن و به دام انداختن رادیکال‌ها، سبب ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند و از طرفی اسیدهای آمینه محتوی گروه سولفیدریل نظیر: اسید آمینه سیستئین، نیز از طریق واکنش مستقیم با رادیکال‌های آزاد، سبب ایجاد خاصیت ضد اکسایشی بسیار مطلوبی در پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌گردند (۳۳) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از هیدرولیز آنزیمی را می‌توان به چلاته کنندگی یون‌های فلزی و پایان دادن به فعالیت رادیکال‌های آزاد از طریق اسیدهای آمینه خاص در زنجیره جانبی پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز نسبت داد (۱۷). به‌طور کلی رادیکال هیدروکسیل قوی‌ترین رادیکال آزاد مشتق شده از اکسیژن می‌باشد که به راحتی می‌تواند با مولکول‌های بیولوژیک نظیر اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و DNA واکنش نشان دهد؛ بنابراین حذف رادیکال هیدروکسیل می‌تواند به عنوان یکی از مؤثرترین دفاع‌های سلول زنده در برابر بیماری‌های مختلف باشد (۳۴). تفاوت در میزان مهار کنندگی رادیکال OH بین تیمارهای مختلف را می‌توان به تفاوت در نوع اسیدهای آمینه و نیز پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از هیدرولیز نسبت داد. نتایج حاصل نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی هسته پرتقال، می-

قابل استفاده در مواد غذایی وجود دارد و نیز ضایعات صنعت تولید آب‌میوه پرتقال می‌تواند به عنوان یک محصول در دسترس، به صورت یک منبع پروتئینی جدید جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد و با در نظر گرفتن فعالیت آن‌تی‌اکسیدانی بالقوه در هسته پرتقال می‌توان از آن به جای آن‌تی‌اکسیدان‌های سنتزی و سایر نگهدارنده‌های شیمیایی جهت به تأخیر انداختن اکسیداسیون استفاده نمود.

ماهی (*Mustelus mustelus*) با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز قلیایی، پپسین و تریپسین، نتایج حاصل نشان داد که با افزایش غلظت آنزیم و درجه هیدرولیز، ویژگی آن‌تی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های هیدرولیز شده نیز افزایش می‌یابد و بیشترین میزان فعالیت در غلظت ۳ mg/ml آنزیمی گزارش شد (۴۲). تحقیق حاضر نشان داد که از طریق بهینه کردن شرایط هیدرولیز امکان تولید پپتیدهایی با قدرت آن‌تی‌اکسیدانی بالا و

## • References

- Danquah MK, Agyei D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. *OA BioTech*. 2012; 1:1-5.
- Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. *Int Dairy J*. 2006; 16:945-960.
- Power O, Jakeman P, FitzGerald RJ. Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milk-derived antioxidative peptides. *Amino Acids*. 2013; 44:797-820.
- Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *J Funct Foods*. 2009; 1:177-187.
- Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitor activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem*. 2010; 121:178-184.
- Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive Peptides: A Review. *Int J Bioautomation*. 2011;15:223-250.
- Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongswadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. *Food Chem*. 2012; 132:104-111.
- Chen MS, Ouyang HC, Zhou SY, Li JY, Ye YB. PLGA nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxic T cell responses. *Immunology and Cell Biology*. 2014; 287:91-99.
- Bougatef A, Hajji M, Balti R. Antioxidant and free radical – scavenging activities of smooth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases. *food chem*. 2010; 19:1198-1255.
- Khantaphant S, Benjakul S, Ghomi MR. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vita*). *LWT - Food Sci Technol*. 2011; 44:1139-1148.
- Lahart N, O'Callaghan Y, Aherne SA, O'Sullivan D. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: Evaluation using the human Jurkat T cell line. *Int Dairy J*. 2011;21:777-782.
- El-Salam MA, El-Shibiny S. Bioactive peptides of buffalo, camel, goat, sheep, mare, and yak milks and milk products. *Food Rev. Int*. 2013;29:1-23.
- Nourmohammadi E, Sadeghi Mahoonak A, Alami M, Ghorbani M. Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (*Cucurbita pepo* L) oil cake protein. *Int J Food Prop*. 2017; 20:3244-3255.
- Moayed A, Hashemi M, Safari M. 'Valorization of tomato waste proteins through production of antioxidant and antibacterial hydrolysates by proteolytic *Bacillus subtilis*: optimization of fermentation conditions'. *J Food Sci Tech*. 2016;53 (1):391-400.
- Castro RJS, De Sato HH. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. *Food Bioprod Process*. 2014;92(1):80-88.
- Fan J, Zhang Y, Chang X, Saito M, Li Z. Changes in the radical scavenging activity of bacterial-type douchi, a traditional fermented soybean product, during the primary fermentation process. *Biosci, Biotechnol, Biochem*. 2009;73:2749- 2753.
- Taha SF, Mohamed SS, Wagdy MS, Mohamed FG. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Appl Sci J*. 2013; 2:651-658.
- FAO UNCTAD. From FAO data sited from: UNCTAD from FAO data. 2004.
- Mohamed B, El-Shenawi M. Functional properties and In-vitro digestibility of bitter orange (*Citrus aurantium*) seed flour. *MRJASSS*. 2013; 1(3):042- 047.
- Samia El-Safy F, Rabab H, Abd El-Ghany ME. Chemical and Nutritional Evaluation of Different Seed Flours as Novel Sources of Protein. *World Journal of Dairy & Food Sciences*. 2012;7(1): 59-65.
- AOAC Method 983.23. Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In *Official methods of analysis*. Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists. 1990;15:101-101
- Horax R, Hettiarachchy N, Over K, Chen P, Gbur E. Extraction, fractionation and characterization of Bitter Melon seed proteins. *J Agr Food Chem*. 2010; 58:1892-1897.
- Matsuoka T, Kawashima T, Nakamura T, Kanamaru Y, Yabe T. Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, *Apis mellifera*. *Apidologie*. 2012; 43:685-697.

24. Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY, Xu YF. Purification and characterization of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel *Mytilus edulis* protein hydrolysate. *Food Chem.* 2013;138(2):1713-1719.
25. Umayaparvathia S, Meenakshia S, Vimalraj V, Arumugama M, Sivagami G, Balasubramanian T. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition.* 2014;4:343-353.
26. Chang-Feng Ch, Fa-Yuan H, Bin W, Tao L, Guo-Fang D. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Funct Foods.* 2015; 15:301-313.
27. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Anal Biochem.* 1999;269:337-341.
28. Sun Q, Shen H, Leu Y. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *J Food Sci and Technol.* 2011;21:6646-6652.
29. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Da'vila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein. *LWT - Food Sci Technol.* 2009; 42:1597-1604.
30. Guerar F, Guimas I, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B-Enzyme.* 2002;19:489-498.
31. Oveisipour M, Abedian AM, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chem.* 2009; 115:238-242.
32. Yan QJ, Huang LH, Sun Q, Jiang ZQ, Wu X. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolysed by multiple proteases. *Food Chem.* 2015; 179:290-295.
33. Jin DX, Liu X, Zheng X, Wang X, He J. Preparation of antioxidative corn protein hydrolysates, purification and evaluation of three novel corn antioxidant peptides. *Food Chem.* 2016;204: 427-436.
34. Qian ZJ, Jung WK, Byun HG, Kim SK. Protective effect of an antioxidant peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresource Technol.* 2008;99:3365-3371.
35. Shuguo S, Meihu M, Qinlu L, Tao Y, Huihui N. Systematic Investigation of Antioxidant Activity of Egg White Protein Hydrolysates Obtained by Pepsin. *J Food Sci Technol.* 2013;5(1):57-62.
36. Ildirim A, Mavi, A, Kara, A. Determination of antioxidant and antimicrobial activity of *Rumex crispus*. *J Agr Food Chem.* 2001;49:4083-4089.
37. Je JY, Lee MH, Lee Kh, Ahn CB. Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 2009; 42:1266-1272.
38. Oveisipour M, Abedian AM, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chem.* 2009; 115: 238-242.
39. Lassoued I, Mora L, Nasri R, Aydi M, Toldrá F, Aristoy MC, et al. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Proteomics.* 2015;115:28- 37.
40. Yang B, Yang H, Li J, Li Z, Jiang Y. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chem.* 2011;124: 551-555.
41. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Da'vila-Ortiz G, Betancur-Ancona D. Angiotensin converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein. *LWT - Food Sci Technol.* 2009; 42:1597-1604.
42. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 2009; 114:1198-1205.

## Processing Optimization of Production of Hydrolyzed Protein from Orange Seed Waste with Pepsin Enzyme

Mazloomi N<sup>1</sup>, Sadeghi Mahoonak AR<sup>\*2</sup>, Ghorbani M<sup>3</sup>, Toldrá F<sup>4</sup>, Gholamreza Houshmand Gh<sup>5</sup>

1- Phd in Food Science, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- \*Corresponding author: Prof, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: Sadeghiaz@gau.ac.ir

3- Associated Prof, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4- Assistant Professor, Institute of Agrochemistry and Food Technology, Valencia, Spain

5- Assistant Prof, Dept. of Physiology & Pharmacology, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Received 15 Feb, 2019

Accepted 25 May, 2019

**Background and Objectives:** The results of observations and studies over the years have shown that health and nutrition are highly related with each other. Bioactive peptides are defined as hydrolyzed proteins, which have the ability to stimulate the desired activities. In this study, the effect of adding pepsin enzyme on orange seed protein was investigated to obtain the hydrolyzed protein, and the antioxidant properties of the hydrolyzed protein were evaluated.

**Materials & Methods:** In the present study, the orange seed protein concentrate was extracted, and then hydrolyzed using different concentrations of pepsin enzyme (1- 3% W/W) and the hydrolysis time of (2-5 hours) at the temperature range of 45-55 °C. Optimal conditions for production of hydrolyzed proteins with the highest antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, radical OH scavenging activity, ferric reducing activity, and total antioxidant) were evaluated.

**Results:** Optimum treatment at determined conditions (temperature 33 °C, time 4 hr and enzyme to substrate ratio of 2.35 % w/w) with antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity (59/63%), radical OH scavenging activity (48/12%), ferric reducing activity (57/83%) and total antioxidant (87/59%) was obtained, and antioxidant tests were performed on the optimal treatment for confirmation of the values proposed by software.

**Conclusion:** The results showed that the hydrolyzed protein derived from orange seed could be used in formulation of foods as a natural additive with the antioxidant ability. It can also be used as a nutraceutical.

**Keywords:** Orange seed, Antioxidant properties, Bioactive peptides, Pepsin enzyme, Optimization