مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هجدهم، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۱۱۳-۱۰۳

تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima L.*) توسط تریپسین و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش سطح پاسخ

زینب نوشی منجیلی[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]

۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com

شناسه ارکید

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۶

چکیده

سابقه و هدف: در این پژوهش، تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو در بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima L.*) با استفاده از آنزیم تریپسین، جهت دستیابی به حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: محلول محتوی کنسانتره پروتئین دانه کدو در معرض انرژی مایکروویو با توان ۹۰۰-۴۵۰ وات و زمان ۹۰-۳۰ ثانیه قرار گرفت. هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم تریپسین، با غلظت ۲/۵ تا ۰/۵ درصد نسبت به سوبسترای پروتئینی در بازه زمانی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه، دما و pH اپتیمم تریپسین انجام شد. قدرت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از روش‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و فعالیت کیلیت‌کنندگی (Chelate) آهن و آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ارزیابی شد.

یافته‌ها: بیشینه مهار رادیکال آزاد DPPH ۵۶/۵ درصد، کیلیت‌کنندگی آهن ۹۶/۹ درصد، آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ۱/۰۳ و درجه هیدرولیز ۲۲/۳ درصد در شرایط بدون اعمال پیش‌تیمار، طی زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت ٪۱/۵ E/S بدست آمد. این درحالی است که با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو، بیشینه مهار رادیکال آزاد DPPH ۵۵/۳ درصد، فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن ۹۴/۵ درصد، آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ۱/۰۷ و درجه هیدرولیز ۲۵/۸ درصد طی زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵درصد E/S بدست آمد. این نتایج تا حد زیادی مشابه نتایج ارائه شده توسط نرم‌افزار (به‌ترتیب، بدون اعمال پیش‌تیمار در زمان ۱۶۵/۱ دقیقه و ۱/۶۵ درصد E/S، ۵۵/۱ ، ۹۵/۵، ۱/۰۲، ۲۱/۳۵ درصد و با اعمال پیش‌تیمار در زمان ۱۰۶ دقیقه و ۱/۳۷ درصد E/S، ۵۱/۱، ۹۳/۷، ۱/۰۵، ۲۴/۹ درصد) می‌باشد.

نتیجه‌گیری: اعمال پیش‌تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های دانه کدو با استفاده از آنزیم تریپسین ضمن کاهش قابل‌توجه زمان هیدرولیز، موجب تولید هیدرولیزات‌هایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب شده که می‌توانند جایگزین نگهدارنده‌های مصنوعی در محصولات غذایی شوند.

واژگان کلیدی: پیش‌تیمار مایکروویو، هیدرولیز آنزیمی، تریپسین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پروتئین دانه کدو

• مقدمه

گیاهان به طور مستقیم یا غیرمستقیم، ۹۵ درصد غذای مردم جهان را تشکیل می دهند، دانه‌ها و غلات بیش از ۵۰ درصد پروتئین اساسی مورد نیاز بدن انسان را تأمین می‌کنند. محتوای پروتئین دانه‌های روغنی دو تا چهار برابر بیشتر از غلات است، پروتئین دانه‌های روغنی کیفیت غذایی بالاتری نسبت به غلات دارند (۱). با این وجود فقط بخشی از دانه‌ها بصورت آجیل مصرف می‌شوند و بخش دیگر آن‌ها جزء ضایعات کشاورزی محسوب می‌شوند. دانه کدو (*Cucurbita sp.*) یکی از منابع غنی پروتئین می‌باشد که بخش اصلی آن را پروتئین‌های ذخیره‌ای گیاهی، گلوبولین‌های S۱۲ تشکیل می‌دهند و مشابه گلایسینین‌های سویا، لگومین حبوبات و کروسیفرین‌های کانولا، گلوبولین‌های S۱۲ دانه کدو را کوکوربیتین می‌نامند.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

کوکوربیتین‌ها با آلبومین‌های S2 همراه هستند که مجموعاً ۵۹ درصد کل محتوای پروتئین خام در دانه‌های کدو را تشکیل می‌دهند (۲). اصلاح پروتئین ممکن است منجر به بهبود ارزش تغذیه‌ای پروتئین شود (۳) و بنابراین هیدرولیز آنزیمی می‌تواند به این‌منظور کمک کند. هیدرولیز آنزیمی موجب شکستن پیوندهای پپتیدی در یک پروتئین می‌شوند. هیدرولیزات‌های تولید شده، اندازه مولکولی کوچکتر و ساختار ثانویه کمتری نسبت به پروتئین اولیه را دارند (۴). امروزه، هیدرولیزات‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های مختلف رژیم‌غذایی دارای نقش‌های بیولوژیکی مختلفی مانند کاهش فشار خون (۵)، آرامش‌بخش (۶)، ضد کلسترول (۷)، آنتی‌اکسیدان (۸) و ضد سرطان (۹) می‌باشند. پروتئین حاصل از دانه کدو (*Cucurbita pepo*) سرشار از فعالیت آنتی‌اکسیدانی است و در کاهش اثرات بدخیم سوء تغذیه مؤثر می‌باشد (۱۰). مطالعات نشان دادند که هیدرولیزات‌های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی (۱۱-۱۳) می‌باشند. در مطالعاتی دیگر بیان شد که پروتئین‌های حاصل از دانه‌ی کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و کیلیت‌کنندگی مناسبی هستند (۱۴-۱۶). پیش‌تیمار مایکروویو پروتئین‌ها قبل از هیدرولیز آنزیمی جهت بهبود انتشار هیدرولیز شده‌ها از پروتئین‌های مختلف عمل می‌کند. این روش موجب باز شدن ساختار ۳ بعدی پروتئین و افزایش دسترسی آنزیم‌ها به پیوندهای پپتیدی می‌گردد (۱۷). Gazikalović و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که پیش‌تیمار مایکروویو تأثیر قابل توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زدایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، در نهایت هیدرولیزات‌های پروتئینی با خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب تولید می‌کند (۱۸). این مطالعه با هدف بررسی تأثیر پیش‌تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو و ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌ها انجام شد.

• مواد و روش‌ها

تهیه مواد اولیه: ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima L.*) از بازار محلی آستانه اشرفیه در استان گیلان خریداری شد و پس از جداسازی دانه‌ها به‌صورت دستی، در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شد (۱۳). آنزیم تریپسین مورداستفاده از منشا پانکراس خوک، دارای فعالیت پروتئازی ۴۰ U/mg و از برند مرک بود. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات از شرکت‌های معتبر (سیگما آلدریچ، مرک و مجللی) تهیه شدند.

تولید کنسانتره پروتئینی: دانه‌های کدو خشک‌شده، بدون پوست‌گیری با پرس سرد روغن‌کشی شده و کنجاله حاصل توسط آسیاب (چین ,500 A)، کاملاً پودر شده و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی- وزنی) به پودر اضافه شد و توسط شیکر (نورصنعت فردوس، ایران) با سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت مخلوط شد. عمل حذف روغن تا کاهش آن به‌حدود ۵ درصد ادامه یافت. حلال باقیمانده در کنجاله در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت توسط آون تحت خلأ (Memmert، آلمان) جدا شد. کنجاله حاصل به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی- حجمی) در آب- مقطر پخش‌شد و pH محلول به‌منظور باز شدن ساختمان پروتئین، توسط سود ۱ نرمال به ۱۱ رسانیده شد و سپس به مدت ۱ ساعت در دمای آزمایشگاه توسط همزن مغناطیسی (Jenway، انگلستان) مخلوط شد. پس‌ازآن عمل سانتریفیوژ (Combi-514R، کره جنوبی) به‌مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار انجام شد و با جمع‌آوری محلول رویی یا سوپرناتانت، باقی‌مانده در آب مقطر حل‌شده و استخراج سوپرناتانت دوباره تکرار شد. سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط شدند و با استفاده از اسیدکلریدریک ۱ نرمال pH آن روی ۴ تنظیم شد، عمل سانتریفیوژ مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل توسط خشک‌کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) خشک شده و در ظروف دربسته و محیط خشک و خنک نگه‌داری شد (۱۱).

آزمون‌های شیمیایی

محتوای پروتئین نمونه: ۲ گرم از نمونه به‌همراه ۲۰ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کلدال (کاتالیزور) به درون لوله هضم افزوده شد و به عنوان شاهد از یک لوله هضم بدون نمونه و فقط حاوی اسید و کاتالیزور استفاده شد. عملیات هضم با توان ۸۰ دستگاه به مدت ۱۲۰ دقیقه تا شفاف شدن محتویات دستگاه انجام شد. بعد از خنک شدن و خارج شدن بخارات اسیدی با استفاده از دستگاه تقطیر، توسط سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد، تقطیر انجام شد و سپس تیتراسیون نمونه به‌کمک اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی شدن نمونه در حضور معرف متیل‌رد ادامه یافت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله ۱ محاسبه شد (۱۹).

معادله ۱

$$\text{درصد ازت نمونه} = 1.4\times N\times(V_1-V_2)/m\times 100$$

N نرمالیته اسیدکلریدریک، V_1حجم اسید مصرفی برای نمونه، V_2 حجم اسید مصرفی برای شاهد و m وزن نمونه بر حسب

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

گرم می‌باشد. برای محاسبه درصد پروتئین نمونه، ازت کل را در فاکتور پروتئینی (۶/۲۵) ضرب می کنیم.

محتوای رطوبت نمونه: مقدار ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و در داخل آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی گراد به‌مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه سردشدن در داخل دیسکاتور، توزین انجام شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا محتوای رطوبت نمونه به‌مقدار ثابتی رسید. سپس مقدار رطوبت طبق معادله ۲ محاسبه شد (۱۹).

معادله ۲:

$$\text{درصد رطوبت} = (W_1-W_2)/m\times 100$$

W_1 وزن ظرف و نمونه قبل خشک کردن، W_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m وزن نمونه می‌باشد.

محتوای خاکستر نمونه: در بوته‌چینی با وزن مشخص مقدار ۲ گرم نمونه توزین شد. ابتدا روی هیتر سوزانده شد و پس از آن بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی با دمای ۶۰۰-۵۵۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۶ ساعت انتقال یافت و حرارت‌دهی تا سفید شدن رنگ خاکستر ادامه یافت. درنهایت بعد از ۱۵ دقیقه خنک شدن بوته در دیسکاتور، توزین انجام شد. میزان خاکستر از طریق معادله ۳ محاسبه شد (۱۹).

معادله ۳:

$$\text{درصد خاکستر} = (W_1-W_2)/m\times 100$$

W_1 وزن بوته و خاکستر، W_2 وزن بوته و m وزن نمونه می‌باشد.

محتوای چربی نمونه: ۳ گرم از نمونه روی کاغذ صافی توزین و در داخل کارتوش گذاشته شد. کارتوش به قسمت استخراج دستگاه سوکسله انتقال یافت. بالن با وزن مشخص تا نیمه با حلال هگزان پر شد و سپس به دستگاه متصل شد. عملیات استخراج به مدت ۴ ساعت انجام شد. درنهایت برای خارج کردن حلال باقیمانده، بالن محتوی نمونه به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت سپس بالن مجداً توزین شد. درصد چربی با معادله ۴ محاسبه شد (۱۹).

معادله ۴:

$$\text{درصد چربی} = (W_1-W_2)/m\times 100$$

W_1 وزن بالن و نمونه، W_2 وزن بالن و m وزن نمونه می‌باشد.

پیش‌تیمار مایکروویو: محلول پروتئینی کنسانتره پروتئین دانه کدو با نسبت ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۱ مولار (gr/L ۱۰۰) (Na_2HPO_4-NaH_2PO_4, pH 7.4) تهیه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد و در معرض انرژی مایکروویو با توان ویژه ۹۰۰-۴۵۰ وات به مدت ۹۰-۳۰ ثانیه برای هر تیمار قرار گرفت. لازم به ذکر می‌باشد بعد از اندازه‌گیری قدرت آنتی-اکسیدانی کل، توان ۶۰۰ وات و زمان ۳۰ ثانیه به‌عنوان پیش-تیمار بهینه انتخاب و اعمال شد. محلول پروتئینی پیش‌تیمار شده با مایکروویو به‌عنوان محلول سوبسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی مورداستفاده قرار گرفت (۲۰).

هیدرولیز آنزیمی: به‌منظور بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی، از روش سطح پاسخ استفاده شد. آنزیم تریپسین از منشا پانکراس خوک، در نسبت‌های ۰/۵ تا ۲/۵ درصد نسبت به سوبسترای پروتئینی اضافه شد و زمان هیدرولیز به‌عنوان یک فاکتور مستقل برای هر یک، طی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه در انکوباتور شیکردار با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه انجام گرفت. دما و pH هیدرولیز، مطابق دمای اپتیمم (۳۵ درجه سانتی‌گراد) و pH اپتیمم (pH=7.4) در نظر گرفته شد. به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبگرم با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس هیدرولیزات‌ها (مایع رویی) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده، خشک شد و تا زمان استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۱).

تعیین درجه هیدرولیز: مبنای این روش درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰٪ به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. به‌این منظور ۱۰ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰٪ مخلوط و پس از هم‌زدن به‌مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۷۵۰ دور در دقیقه طی ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش کجلدال اندازه‌گیری و میزان درجه-هیدرولیز (DH) توسط معادله ۵ محاسبه شد (۱۱).

معادله ۵:

$$\text{درجه هیدرولیز} = \frac{\text{نیتروژن محلول در TCA 10\%}}{\text{کل نیتروژن نمونه}}$$

اندازه‌گیری قدرت آنتی‌اکسیدانی

مهار رادیکال آزاد DPPH : هیدرولیزات‌ها، در آب‌مقطر با غلظت بهینه (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل شدند. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه با ۶۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH(۰/۱۵ میلی‌مولار در متانول) مخلوط شد. به مدت ۲ دقیقه به‌شدت تکان داده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی، در دمای اتاق نگهداری شد. جذب، در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد. شاهد،

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

حاوی ۸۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۰/۱۵ میلی‌مولار) است. توانایی مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد (۲۲).

معادله ۶

۱۰۰×جذب شاهد / (جذب نمونه - جذب شاهد) = درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن: ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بهینه، با ۱۰ میکرولیتر $FeCl_2$ (۲ میلی‌مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (ferrozine) (۵ میلی‌مولار) به مخلوط اضافه‌شد و به‌مدت ۲ دقیقه به‌شدت مخلوط شد. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. کاهش رنگ، به دلیل کیلیت‌شدن آهن، با اندازه‌گیری جذب در ۵۶۲ نانومتر ثبت شد. نمونه شاهد حاوی ۸۰۰ میکرولیتر آب‌مقطر، ۱۰ میکرولیتر $FeCl_2$ و ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) است. درصد کیلیت-کنندگی با استفاده از معادله ۷ محاسبه شد (۲۲).

معادله ۷

۱۰۰×جذب شاهد / (جذب نمونه - جذب شاهد) = درصد کیلیت‌کنندگی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر): در این روش ۰/۱ ml از نمونه بهینه با ۱ ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب‌مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بالاتر است (۲۳).

بهینه‌سازی فرایند: شرایط هیدرولیز با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۱ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی بهینه‌سازی شد. متغیرهای مستقل، نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (X_1) و زمان هیدرولیز (X_2) در پنج سطح ($+\alpha$، ۱+، ۰، ۱-، $-\alpha$) و سه نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ-های مورد بررسی فعالیت کیلیت‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) و درجه هیدرولیز بودند. اثر متغیرهای مستقل بر ویژگی-های آنتی‌اکسیدانی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۶ ارزیابی شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مقایسه شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ ارائه شده است.

جدول ۱. سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین دانه کدو

متغیرهای مستقل	$+\alpha$	۱+	۰	۱-	$-\alpha$
E/S	۲/۵	۲/۲	۱/۵	۰/۸	۰/۵
زمان	۱۹۰	۱۶۵	۱۰۵	۴۵	۲۰

• یافته‌ها

ترکیبات شیمیایی: میزان رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲. ترکیبات شیمیایی موجود در دانه کامل، کنجاله چربی-گیری شده و کنسانتره پروتئین دانه کدو

نمونه	پروتئین	چربی	خاکستر	رطوبت
دانه کامل	۳۳/۹۲	۳۱/۵۷	۶/۹	۸/۴۶
کنجاله چربی‌گیری شده	۵۹/۵	۵/۱۲	۴/۶۵	۷/۶۵
کنسانتره پروتئین دانه کدو	۶۵/۶۲	۲/۲۹	۱/۴۵	۵/۴۵

نتایج میانگین‌ها ۳ تکرار هستند.

بهینه‌سازی هیدرولیز کنستانتره پروتئین کدو: تأثیر متغیرهای مستقل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا تحت پیش-تیمار مایکروویو بر درصد کیلیت‌کنندگی، مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و درجه هیدرولیز با تجزیه و تحلیل ضرایب رگرسیونی و واریانس ذکر شده در جداول ۳ تا ۶ مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۳. تأثیر زمان و نسبت E/S بر درجه هیدرولیز با اعمال مایکروویو

	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
مدل	۲۴/۸۷	۰/۰۰۰۹	۵
A	۰/۳۷۲۰	۰/۳۶۷۸	۱
B	-۱/۴۷	۰/۰۱۱۴	۱
AB	۰/۲۵۰۰	۰/۶۵۷۹	۱
A^2	-۴/۱۱	۰/۰۰۰۳	۱
B^2	-۴/۴۴	۰/۰۰۰۲	۱
Pred-R^2	۰/۸۵۹۲		
adj-R^2	۰/۹۳۸۷		
Lack of fit		۰/۶۶۵۳	۳

A: زمان، B: E/S

تأثیر زمان هیدرولیز و نسبت E/S بر درجه هیدرولیز: با توجه به مقادیر عدد P در جدول ۳ استنباط می‌شود، مقادیر A^2، B^2 و B تأثیر معنی‌داری بر روی درجه هیدرولیز می‌گذارند ($p<۰/۰۵$). متغیر B^2، نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر

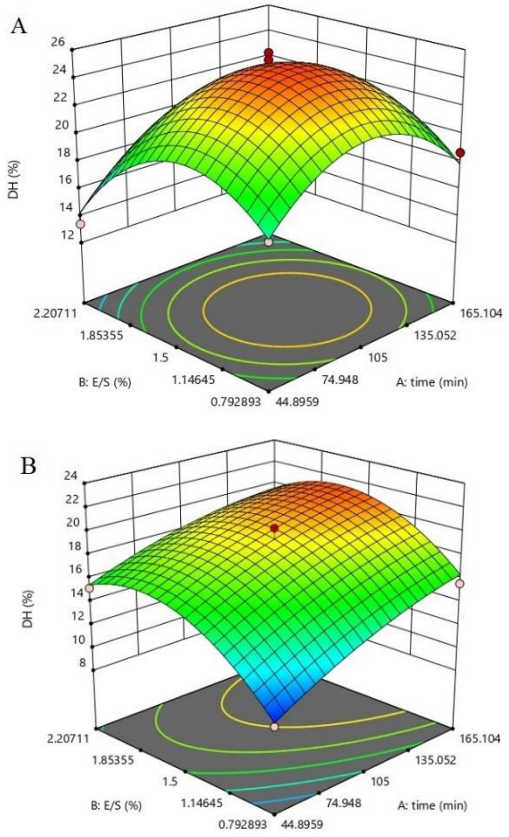
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

می‌باشد. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش (p<۰/۰۵)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه درجه هیدرولیز با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۶۹۳ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می دهد که از معادله ۸ پیروی می‌کند.

معادله ۸

$$24.87-1.47B-4.11A^2-4.44B^2$$

طبق شکل ۱-الف، بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۲۵/۸ درصد) مربوط به زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S است و کمترین میزان آن (۱۳/۴ درصد) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S می‌باشد. از طرف دیگر، طبق شکل ۱-ب، بالاترین میزان درجه هیدرولیز (۲۲/۳ درصد) در زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S و کمترین آن (۹/۸ درصد) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه نسبت ۰/۸ درصد E/S بود.



شکل ۱. الف، تأثیر زمان و نسبت E/S بر درجه هیدرولیز با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو/ شکل ۱-ب، تأثیر زمان و نسبت E/S بر درجه هیدرولیز پروتئین دانه کدو

تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن: با توجه به مقادیر عدد P در جدول ۴ استنباط می‌شود، مقادیر A^2، B^2 و B تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن می‌گذارند (P<۰/۰۵). متغیر B^2، نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر می‌باشد. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش (P<۰/۰۵۰)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه کیلیت‌کنندگی یون آهن با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=۰/۹۵۶۹ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می دهد که از معادله ۹ پیروی می‌کند.

معادله ۹

$$93.47-1.50B-1.96A^2-2.34B^2$$

جدول ۴. تأثیر زمان و نسبت E/S بر شلاته‌کنندگی یون آهن با اعمال مایکروویو

	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
مدل	۹۳/۴۷	۰/۰۰۲۰	۵
A	۰/۲۴۷۰	۰/۳۹۳۷	۱
B	-۱/۵۰	۰/۰۰۲۲	۱
AB	۰/۴۰۰۰	۰/۳۲۶۵	۱
A^2	-۱/۹۶	۰/۰۰۱۴	۱
B^2	-۲/۳۴	۰/۰۰۰۶	۱
Pred-R^2	۰/۸۲۱۰		
adj-R^2	۰/۹۱۳۸		
Lack of fit		۰/۷۵۴۹	۳

A: زمان، B: E/S

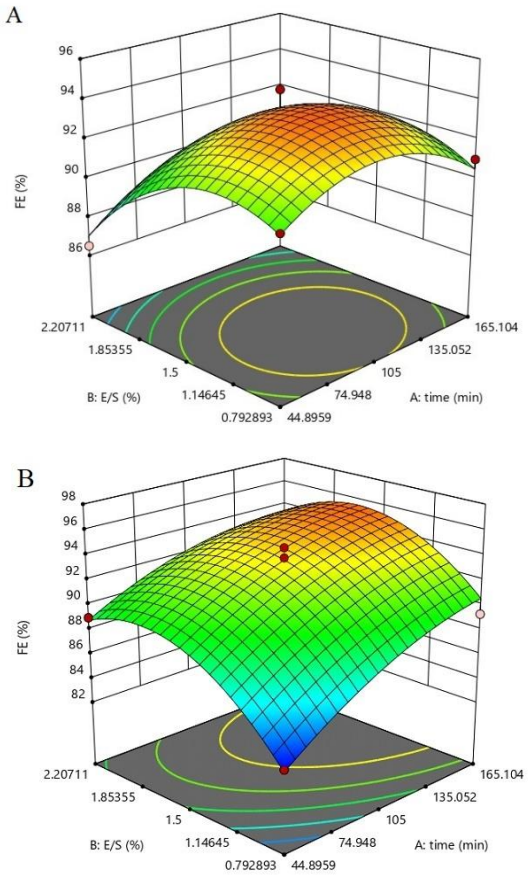
طبق شکل ۲-الف، بیشترین میزان فعالیت کیلیت‌کنندگی (۹۴/۵ درصد) مربوط به زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S است و کمترین میزان آن (۸۶/۵ درصد) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ درصد E/S می‌باشد. از طرف دیگر، طبق شکل ۲-ب، بالاترین میزان فعالیت کیلیت‌کنندگی (۹۶/۹ درصد) در زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S و کمترین آن (۸۳/۲ درصد) متعلق‌به زمان ۴۵ دقیقه نسبت ۰/۸ درصد E/S بود.

تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH : با توجه به مقادیر عدد P جدول ۵، می‌توان بیان نمود که متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تأثیرگذار می‌باشند (P<۰/۰۵). معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش (P<۰/۰۵)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی گی R^2=۰/۸۹۸۲ می-باشد. که نشان می‌دهد مدل توانسته ۸۹/۸۲ درصد از کل

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۱۰ رابطه بین متغیرهای واکنش و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH را نشان می‌دهد.

معادله ۱۰ $51.03-5.34A^2-5.42B^2$



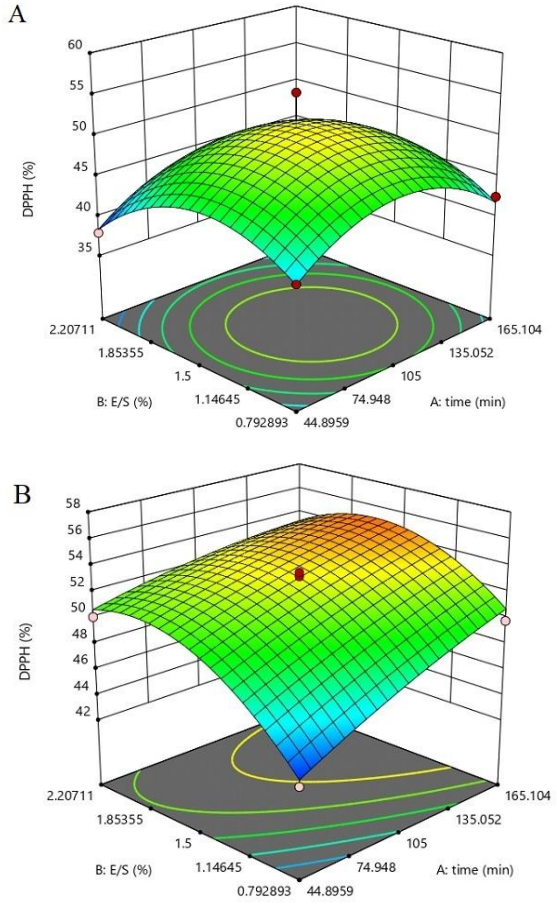
شکل ۲. الف، تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو / شکل ۲-ب، تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن پروتئین دانه کدو

جدول ۵. تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال مایکروویو

	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
مدل	۵۱/۰۳	۰/۰۱۶۱	۵
A	۰/۳۹۷۹	۰/۶۶۷۴	۱
B	-۱/۳۴	۰/۱۸۶۲	۱
AB	۰/۲۲۵۰	۰/۸۶۲۴	۱
A^2	-۵/۳۴	۰/۰۰۳۶	۱
B^2	-۵/۴۲	۰/۰۰۳۴	۱
Pred-R^2	۰/۷۴۶۵		
adj-R^2	۰/۷۹۶۳		
Lack of fit		۰/۹۸۹۱	۳

A: زمان
B: E/S

با توجه به شکل ۳-الف، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۵/۳ درصد) در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S است و کمترین میزان آن (۳۷/۹ درصد) متعلق‌به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد می‌باشد. از طرف دیگر، طبق شکل ۳-ب، بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۶/۵ درصد) در زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S و کمترین آن (۴۳/۵ درصد) متعلق‌به زمان ۴۵ دقیقه نسبت ۰/۸ درصد E/S بود.



شکل ۳. الف، تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو/ شکل ۳-ب، تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین دانه کدو

تأثیر زمان هیدرولیز و نسبت E/S بر فعالیت آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر): با توجه به مقادیر عدد P جدول ۶، مقادیر A^2، B^2 بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) تأثیرگذار می‌باشند ($P<0/05$). معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($P<0/05$)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مطابقت دارد. رابطه فعالیت آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) با متغیرهای مستقل،

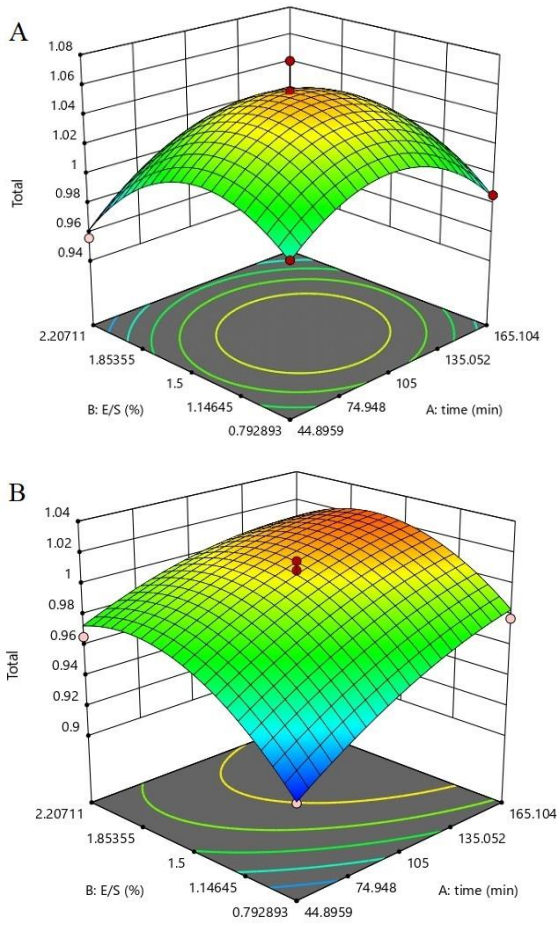
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی R^2=0.9342 می‌باشد. که نشان می‌دهد مدل توانسته ۹۳/۴۲ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. معادله ۱۱ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل را نشان می‌دهد.

معادله ۱۱

$$1.06-0.0365A^2-0.0405B^2$$

با توجه به شکل ۴-الف، بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) (۱/۰۷ درصد) در زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S است و کمترین میزان آن (۰/۹۵۶درصد) متعلق‌به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت E/S ۲/۲ درصد می‌باشد. از طرف دیگر، طبق شکل ۴-ب، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) (۱/۰۳ درصد) در زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت ۱/۵ درصد E/S و کمترین آن (۰/۹۱۴درصد) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه نسبت ۰/۸ درصد E/S بود.



شکل ۴. الف، تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) با اعمال پیش‌تیمار مایکروویو/ شکل ۴-ب، تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) پروتئین دانه کدو

جدول ۶. تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) با اعمال مایکروویو

	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
مدل	۱/۰۶	۰/۰۰۵۶	۵
A	۰/۰۰۰۶	۰/۹۱۶۲	۱
B	-۰/۰۱۱۲	۰/۰۷۴۷	۱
AB	۰/۰۰۵۳	۰/۴۸۹۹	۱
A^2	-۰/۰۳۶۵	۰/۰۰۱۷	۱
B^2	-۰/۰۴۰۵	۰/۰۰۱۰	۱
Pred-R^2	۰/۸۱۶۰		
adj-R^2	۰/۸۶۸۳		
Lack of fit		۰/۹۶۲۵	۳

A: زمان، B: E/S

• بحث

با توجه به جدول ۲ کاهش چشمگیری در میزان چربی کنسانتره پروتئینی نسبت به دانه کامل اتفاق افتاده است که دلیل آن، در ابتدا استفاده از پرس سرد برای خروج میزان قابل توجهی روغن از دانه اولیه و سپس استفاده از حلال هگزان جهت چربی‌زدایی از کنجاله، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و ترسیب پروتئین‌ها در نقطه ایزوالکتریک آن‌ها می‌باشد (۲۴). کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد جهت حذف هگزان باقیمانده پس از فرایند چربی‌زدایی و استفاده از خشک‌کن انجمادی به منظور خشک کردن رسوب پروتئینی بعد از فرایند استخراج می‌باشد (۲۵). کمترین میزان خاکستر مربوط به کنستانتره پروتئینی می‌باشد که دلیل آن فرایند استخراج پروتئین و حذف مقادیر زیادی ترکیبات غیر پروتئینی است. مقدار پروتئین و چربی در دانه کامل کدو مشابه گزارشات Rezig و همکاران (۲۰۱۲) بود (۲۶). مقدار پروتئین و چربی کنستانتره کمی متفاوت از مقدار گزارش داده شده توسط ذاکری و همکاران (۲۰۱۹) بود (۲۷). البته لازم به ذکر است که این اختلاف در گزارشات، ناشی از تفاوت درگونه‌های مورد استفاده است.

با توجه به شکل ۱-الف و ب، در هر دو حالت، درجه هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم کاهش یافت و از سوی دیگر، با اعمال پیش‌تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه موجب افزایش درجه هیدرولیز شد و افزایش بیشتر زمان تأثیر منفی داشت. کاهش میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا، احتمالا تحت تأثیر تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس جهت هیدرولیز و همچنین غیرفعال شدن آنزیم پروتئازی می‌باشد (۲۸). همچنین این نتایج در تطابق با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

یافته‌های You و همکاران (۲۰۰۹) و یاسمی و همکاران (۲۰۱۳) که به‌ترتیب در هیدرولیز پروتئین ضایعات پس از پخت ماهی هوور، ماهی تیان و امعاء و احشاء ماهی کپور سرگنده، گزارش کردند که میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز کاهش یافته است (۲۹, ۳۰). Uluko و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که استفاده از انرژی مایکروویو باعث افزایش درجه هیدرولیز (DH) و پایداری هیدرولیزات‌های پروتئین آب‌پنیر می‌شود (۱۷).

با توجه به شکل ۲-الف و ب، با افزایش غلظت آنزیم از میزان فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن کاسته شده است. از طرف دیگر، با اعمال پیش‌تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه سبب افزایش فعالیت کیلیت‌کنندگی شده و افزایش بیشتر زمان تأثیر منفی گذاشته است. کاهش فعالیت کیلیت‌کنندگی یون آهن با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز می‌تواند به‌دلیل تولید ترکیبات بازدارندهٔ آنزیم طی هیدرولیز طولانی باشد؛ همچنین هیدرولیز پپتیدهای کیلیت‌کننده‌ی یون آهن که در اوایل فرآیند هیدرولیز تولید شده‌اند، می‌تواند دلیل دیگری بر کاهش فعالیت کیلیت‌کنندگی یون آهن طی هیدرولیز در زمان‌های طولانی و با غلظت بیش از حد آنزیم باشد (۳۱). Gazikalović و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که مایکروویو تأثیر قابل‌توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیزات‌های پروتئینی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی مناسب تولید می‌کند (۱۸). Nguyen و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که هیدرولیز آنزیمی به‌همراه پیش‌تیمار مایکروویو یک روش مناسب برای تولید هیدرولیزات‌های پروتئین ماهی با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌باشد (۳۲).

مطابق شکل ۳-الف و ب، با افزایش نسبت E/S از میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته شده است. همچنین، با اعمال پیش‌تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه سبب افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH شده و افزایش بیشتر زمان تأثیر منفی گذاشته است. از خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH برای بررسی قابلیت هیدروژن‌دهندگی هیدرولیزات‌های پروتئین استفاده می‌شود. نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم و شرایط هیدرولیز از فاکتورهای مؤثر بر فعالیت ضداکسایشی به شمار می‌آیند (۳۳). کاهش قابلیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت آنزیم می تواند به علت اثر هضم‌کنندگی آنزیم بر پپتیدهای تولیدی باشد. با افزایش غلظت آنزیم، امکان اثر بیشتر بر ماده پروتئینی افزایش یافته و این امر منجر به شکسته شدن تعدادی از پپتیدهای ضداکسایشی تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد (۳۴). Yang و همکاران (۲۰۲۲) اثر پیش‌تیمار مایکروویو بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیزات‌های پروتئین شیر را مورد مطالعه قرار دادند و بیان کردند تمام پیش-تیمارهای مایکروویو هیدرولیزات‌های پروتئین شیر، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH بالاتری را در مقایسه با شاهد نشان دادند و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، به‌کمک مایکروویو با توان ۳۰۰ وات بالاترین مقدار می‌باشد (۳۵). Dong و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند پیش‌تیمار مایکروویو با توان ۴۰۰ وات سبب بالاترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هیدرولیزات‌های کنجاله آفتابگردان می‌شود. این تفاوت در توان‌های مورد استفاده در مطالعات مختلف ممکن است به میزان حلالیت مواد پروتئینی، مرتبط باشد. هیدرولیزات‌های پروتئین شیر در مقایسه با پروتئین نامحلول با توان مایکروویو کمتری تحت تأثیر قرار می‌گیرند (۳۶).

با توجه به شکل ۴-الف و ب، با افزایش غلظت آنزیم از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) کاسته شده است. از طرف دیگر، با اعمال پیش‌تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) شده و افزایش بیشتر زمان، تأثیر منفی گذاشته است. افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز و یا غلظت آنزیم می‌تواند باعث افزایش نامناسب هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت الکترون-دهندگی شود که در نتیجه باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌شود. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) پروتئین هیدرولیز شده به‌میزان درجه هیدرولیز و نوع آنزیم پروتئازی به‌کار رفته بستگی دارد (۳۷). این نتایج مشابه با یافته‌های مظلومی و همکاران (۲۰۱۹) و الوند و همکاران (۲۰۲۲) بود که به‌ترتیب در مورد هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال و دانه خربزه ترکمنی پژوهش کردند. آنها گزارش کردند که افزایش بیش از حد زمان و غلظت آنزیم تأثیری منفی بر ظرفیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات‌های تولیدی داشت (۱۱, ۲۵).

انتخاب تیمار بهینه و اعتبار سنجی مدل: با توجه به نتایج، استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو سبب کاهش چشمگیر زمان هیدرو لیز شده، لذا نمونه‌های حاصل از پیش‌تیمار به عنوان بهینه انتخاب شدند. شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار، زمان ۱۰۶ دقیقه و نسبت ۱/۳۷ درصد E/S بود که با درجه مقبولیت ۸۲/۷ درصد جهت دست‌یابی به بیشینه فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن (۹۴/۵ درصد)، مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۵/۳ درصد)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (۱/۰۷) و درجه هیدرولیز (۲۵/۸ درصد) پیشنهاد شد. جهت اعتبار سنجی مدل

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

در زمان و نسبت E/S پیشنهادی، مجددا آزمون‌های آنتی-اکسیدانی انجام شد و نتایج بیانگر میزان ۹۲/۴۸ درصد فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن، ۴۹/۵ درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ۰/۹۹۶ فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و درجه هیدرولیز ۲۳/۴۵ درصد بود. نتایج، توانایی خوب مدل را در بررسی تأثیر متغیرهای مستقل بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئین دانه کدو، نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری

یافته‌ها بیانگر این است که استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو موجب کاهش چشمگیر زمان دستیابی به هیدرولیزات‌های با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌شود. مطابق نتایج، هیدرولیزات-های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است که می‌توانند در فرمولاسیون مواد غذایی مختلف به عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد استفاده قرار گیرند و سبب ارتقا سطح سلامت مواد غذایی شوند.

• References

1. Marcone MF, Kakuda Y, Yada RY. Salt-soluble seed globulins of various dicotyledonous and monocotyledonous plants—I. Isolation/purification and characterization. Food Chemistry. 1998;62(1):27-47.
2. Fruhwirth GO, Hermetter A. Seeds and oil of the Styrian oil pumpkin: Components and biological activities. European Journal of Lipid Science and Technology. 2007;109(11):1128-40.
3. Moure A, Sineiro J, Domínguez H, Parajó JC. Functionality of oilseed protein products: A review. Food research international. 2006;39(9):945-63.
4. Yalçın E, Çelik S. Solubility properties of barley flour, protein isolates and hydrolysates. Food chemistry. 2007;104(4):1641-7.
5. Li G-H, Qu M-R, Wan J-Z, You J-M. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition. 2007;16(S1):275-80.
6. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Soymorphins, novel μ opioid peptides derived from soy β-conglycinin β-subunit, have anxiolytic activities. Bioscience, biotechnology, and biochemistry. 2007;71(10):2618-21.
7. Cho S-J, Juillerat MA, Lee C-H. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. Journal of agricultural and food chemistry. 2008;56(12):4372-6.
8. Kou X, Gao J, Xue Z, Zhang Z, Wang H, Wang X. Purification and identification of antioxidant peptides from chickpea (Cicer arietinum L.) albumin hydrolysates. LWT-Food Science and Technology. 2013;50(2):591-8.
9. Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. Current pharmaceutical design. 2003;9(16):1289-96.
10. Mohamed RA, Ramadan RS, Ahmed LA. Effect of substituting pumpkin seed protein isolate for casein on serum liver enzymes, lipid profile and antioxidant enzymes in CCl4-intoxicated rats. Advances in Biological Research. 2009;3(1-2):9-15.
11. Mazloomi-Kiyapey SN, Sadeghi-Mahoonak A, Ranjbar-Nedamani E, Nourmohammadi E. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. Arya Atherosclerosis. 2019;15(5):218.
12. Nourmohammadi E, SADEGHI MA, Ghorbani M, Alami M, Sadeghi M. Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. 2016 [in Persian].
13. Sitohy MZ, Desoky E-SM, Osman A, Rady MM. Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on Phaseolus vulgaris by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. Scientia Horticulturae. 2020;271:109495.
14. Nkosi C, Opoku A, Terblanche S. Effect of pumpkin seed (Cucurbita pepo) protein isolate on the activity levels of certain plasma enzymes in CCl4-induced liver injury in low-protein fed rats. Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives. 2005;19(4):341-5.
15. Sarkar SK, Hossain MT, Uddin MB, Absar N. Purification, Characterization and Physico-Chemical Properties of Three Galactose-Specific Lectins from Pumpkin (Cucurbita Maxima) Seed Kernels. Journal of the Chinese Chemical Society. 2007;54(6):1433-42.
16. Yang C, Wang B, Wang J, Xia S, Wu Y. Effect of pyrogallic acid (1, 2, 3-benzenetriol) polyphenol-protein covalent conjugation reaction degree on structure and antioxidant properties of pumpkin (Cucurbita sp.) seed protein isolate. Lwt. 2019;109:443-9.
17. Uluko H, Zhang S, Liu L, Tsakama M, Lu J, Lv J. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. Journal of Functional Foods. 2015;18:1138-46.
18. Gazikalović I, Mijalković J, Šekuljica N, Jakovetić Tanasković S, Đukić Vuković A, Mojović L, Knežević-Jugović Z. Synergistic effect of enzyme hydrolysis and microwave reactor pretreatment as an efficient procedure for gluten content reduction. Foods. 2021;10(9):2214.
19. Horwitz W, Latimer G. Association of official analytical chemists. Gaithersburg, MD, USA. 2000.
20. Gohi BFCA, Du J, Zeng H-Y, Cao X-j, Zou KM. Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the Lotus seed protein. Bioengineering. 2019;6(2):28.
21. Nourmohammadi E, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Alami M, Sadeghi M. The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 2017;13(1):14-26. [in Persian].

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

22. Kanbargi KD, Sonawane SK, Arya SS. Encapsulation characteristics of protein hydrolysate extracted from Ziziphus jujube seed. International journal of food properties. 2017;20(12):3215-24.

23. Zhu W, Yang W, Ying B, Li X, Li J, Li Y. Optimization of ultra high pressure coupled with enzymatic hydrolysis technology and its effect on the taste of hydrolysate of pollock bone. Sci Technol Food Ind. 2019;40:214-9.

24. Kaveh S, Sadeghi MA, Ghorbani M, Jafari M, Sarabandi K. Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019;14(1). [in Persian].

25. Alvand M, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Shahiri Tabarestani H, Kaveh S. Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase. Food Engineering Research. 2022;21(2):75-90 [in Persian].

26. Rezig L, Chouaibi M, Msaada K, Hamdi S. Chemical composition and profile characterisation of pumpkin (Cucurbita maxima) seed oil. Industrial Crops and Products. 2012;37(1):82-7.

27. Zakeri K, Ghorbani M, Mahoonak AS, Moayedi A, Maghsoudlou Y. Determination of optimum conditions for the production of peptides with antioxidant and nitric-oxide inhibition properties from protein hydrolysis of pumpkin seed meals using pepsin enzyme. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 2019;14(3). [in Persian].

28. Guérard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. 2002;19:489-98.

29. Yasemi M, Ghomi Marzdashti M, Darnahal T, Mohammadzadeh B, Amini H. Yield of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from Bighead Carp (Aristichthys nobilis) by using enzymes. 2013[in Persian].

30. You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. Innovative food science & emerging technologies. 2009;10(2):235-40.

31. Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Food chemistry. 2009;115(1):238-42. [in Persian].

32. Nguyen E, Jones O, Kim YHB, San Martin-Gonzalez F, Liceaga AM. Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout Oncorhynchus mykiss by-products. Fisheries science. 2017;83:317-31.

33. Mehregan Nikoo A, Sadeghimahoonak A, Ghorbani M, Taheri A, Aalami M, Kamali F. Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (Carassius carassius). Research and Innovation in Food Science and Technology. 2014;2(4):351-64 [in Persian].

34. Meshginfar N, Sadeghi-Mahoonak A, Ziaiifar AM, Ghorbani M, Kashaninejad M. Study of antioxidant activity of sheep visceral protein hydrolysate: Optimization using response surface methodology. ARYA atherosclerosis. 2014;10(4):179. [in Persian].

35. Yang X, Ren X, Ma H. Effect of Microwave Pretreatment on the Antioxidant Activity and Stability of Enzymatic Products from Milk Protein. Foods. 2022;11(12):1759.

36. Dong C, Li F, Wang L, Ma X, Xu J, Kong L. Microwave pretreatment of sunflower meal protein preparation of antioxidant peptides. Sci Technol Food Ind. 2015;36:308-11.

37. Ktari N, Fakhfakh N, Balti R, Ben Khaled H, Nasri M, Bougatef A. Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (Sepia officinalis) by-products. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2013;22(5):436-48.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]

Effects of Microwave Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of Pumpkin Seed Protein (*Cucurbita maxima* L.) Using Trypsin and Investigation of the Protein Antioxidant Activity Using Response Surface Methodology

Nooshi Manjili Z[1], Sadeghi Mahoonak A[2]*

1- Ph.D. student of food chemistry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

*2- *Corresponding author: Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email:sadeghiaz@yahoo.com*

Received 5 Jul, 2023 **Accepted 28 Sep, 2023**

Background and Objectives: In this study, effects of microwave pretreatment in optimizing conditions of enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein (*Cucurbita maxima* L.) was investigated using enzyme trypsin to achieve the maximum antioxidant activity using Design Expert software and response surface methodology.

Materials and Methods: The solution containing pumpkin seed concentrate was exposed to microwave energy with power of 450–900 W and time of 30–90 s. Enzymatic hydrolysis was carried out using trypsin enzyme with quantities of 0.5 to 2.5% per substrate, time intervals of 20 to 190 min and the optimum temperature and pH of trypsin. Antioxidant activity was assessed using DPPH free radical scavenging method, iron chelation activity and total oxidant activity (absorbance in 695 nm).

Results: The maximum DPPH free radical scavenging of 56.5%, iron chelation activity of 96.9%, total oxidant activity (absorbance in 695 nm) of 1.03 and hydrolysis degree of 22.3% in condition without pretreatment were achieved within 190 min at 1.5% E/S ratio. Using microwave pretreatment, the maximum DPPH free radical scavenging of 55.3%, iron chelation activity of 94.5%, total oxidant activity (absorbance in 695 nm) of 1.07 and hydrolysis degree of 25.8% were achieved within 105 min at 1.5% E/S ratio. These results were largely similar to those presented by the software (respectively without pretreatment in 165.1 min and 1.65% E/S 55.1%, 95.5%, 1.02, 21.35 and with pretreatment in 106 min and 1.37% E/S 51.1%, 93.7%, 1.05, 24.9).

Conclusion: Microwave pretreatment in enzymatic hydrolysis of pumpkin seed proteins using trypsin enzyme has resulted in production of hydrolysates with appropriate antioxidant activity in addition to significant decreases of the hydrolysis time, which can be replaced by artificial preservatives in nutritional products as natural compounds.

Keywords: Microwave pretreatment, Enzymatic hydrolysis, Trypsin, Antioxidant activity, Pumpkin seed protein

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-10]