مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال پانزدهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۹، صفحات ۴۸-۳۵

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

سیده نرگس مظلومی [۱]، علیرضا صادقی ماهونک [۲]، محمد قربانی [۳]، فیدل تولدرا [۴]، غلامرضا هوشمند [۵]

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 غذای، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران، پست الکترونیکی:Sadeghiaz@gau.ac.ir
۳- دانشیار علوم و صنایع غذای، 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 دریافت: ۹۷/۱۱/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۴

چکیده

سابقه و هدف: نتایج حاصل از مشاهدات و مطالعات درطول سال‌های متوالی، نشان داده است که سلامت و تغذیه بسیار به‌هم 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 دمای۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد، پروتئین هسته پرتقال هیدرولیز شد و شرایط بهینه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای بهترین ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (قدرت مهار کنندگی رادیکال DPPH، قدرت مهار کنندگی رادیکال OH، قدرت احیا کنندگی 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 مقادیر۵۹/۶۳ 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

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 (۲، ۱). فعالیت‌های بیولوژیکی ناشی از این پپتیدها، شامل فعالیت ایمنی‌زایی، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابتی، ضد فشارخون، ضد میکروبی، ضد ترومبوتیک، چلاته کنندگی فلزات (نظیر آهن)، قدرت اتصال دهندگی به مواد معدنی می‌باشند (۴، ۳). این ترکیبات زیست فعال اغلب در مولکول‌های پروتئین اولیه خود به‌صورت غیر - 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 (۶، ۵). WiriyapHan 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-

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

هـای آلکـالاز و پروتئـاز، پپتیـدهایی کـه دارای وزن مولکـولی پایین و در حـدود ۵ کیلودالتـون مـی‌باشـند، دارای بیشـترین فعالیـت آنتـی‌اکسـیدانی در مهـار کـردن رادیکـال DPPH و رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای یون آهن مـی‌باشـند (۸).

Bougatef و همکـاران (۲۰۱۰) در بررسـی خـواص آنتـی-اکسیدانی پروتئین هیـدرولیز شـده‌ی سـاردین بـا اسـتفاده از آنزیم‌های پروتئازی، به این نتیجه دست یافتند که بـا افـزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نیز افزایش می‌یابد و پپتیدهای بـا وزن مولکـولی پـایین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز هستند (۹). نتـایج حاصـل از هیدرولیز گونه‌ای از ماهی نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسـیدانی با افـزایش درجـه هیـدرولیز تـا ۴۰٪ افـزایش مـی‌یابـد (۱۰).

Lahart و همکاران (۲۰۱۱) به این نتیجـه دسـت یافتنـد کـه طـی هیـدرولیز پـروتئین، وزن مولکـولی ترکیبـات حاصـل از هیدرولیز کاهش می‌یابد و هیدرولیزات‌هـای بـا وزن مولکـولی کمتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان مـی‌دهنـد (۱۱). نتایج حاصل از آزمایشات نشان داده است که هیـدرولیز پروتئین گوشت گوسفند در حضور آنزیم‌های آلکالاز، پپسین و کیموتریپسین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نیز می‌باشـد. بـه-طورکلی این ویژگـی را مـی‌تـوان بـه‌حضـور مقـادیر بـالایی از اسـیدهای آمینـه هیسـتیدین و لوسـین نسـبت داد. بیشـتر محققان بر این باورند که آب‌گریـزی نقـش بسـیار کلیـدی در پپتیدهای زیست فعال چند منظـوره از جملـه: خاصـیت ضـد فشـارخون بـالا و آنتـی‌اکسـیدانی دارد (۱۲). نورمحمـدی و همکاران (۲۰۱۷) در بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و پروفایـل اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده‌ی کـدو تخـم کاغـذی (*Cucurbita pepo*) توسط دو آنزیم آلکالاز و ترپسین، بـه ایـن نتایج دست یافتند که هیدرولیز شده‌های پروتئینی تولید شده توسط آنـزیم آلکـالاز، از نظـر مهـار کـردن رادیکـال‌هـای آزاد DPPH، چلاته کنندگی یون آهن و آنتی‌اکسیدانی کـل، دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت بـه هیـدرولیز شـده‌هـای تولید شده توسط آنزیم ترپسین می‌باشند و یک رابطه مستقیم میان خاصیت آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌های هیدرولیز شده و اسـیدهای آمینـه هیـدروفوب وجـود دارد (۱۳). مویـدی و همکاران (۲۰۱۶) با استفاده از روش تخمیر میکروبـی (توسـط باسیلوس سوبتلیس A) بر فـرآورده ی جـانبی کارخانـه ی رب شامل تفاله و دانه‌ی باقی مانده حاصل از مرحله‌ی رب گیـری، اقدام به تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی با ارزش افزوده کردند. در این تحقیق آن‌ها اثر شرایط مختلف شامل دمای گرم خانـه و زمان تخمیر و میزان pH را بر فعالیت پروتئازی آنـزیم هـای این کشت میکروبی و همچنین بر رهایش پپتیدهایی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی ارزیابی کردند. نتایج بیانگر ایجـاد ۷۰٪ فعالیـت مهار رادیکال آزاد DPPH و ۶۹/۸٪ فعالیت احیا کنندگی یـون آهـن سـه ظرفیتـی بـود (۱۴). Castro و همکـاران (۲۰۱۴) مطالعه ای در رابطه با اثر تقویـت کننـده‌ی چنـدین پـروتئین هیدرولیز شده شامل ایزوله ی پروتئین سویا، پـروتئین سـرمی گاو و پروتئین سفیده‌ی تخم مرغ انجام دادند. هیدرولیز توسط پروتئاز فلاورزایم انجام شد. نتایج آزمون‌هـای آنتـی‌اکسـیدانی نشان داد مخلوط پروتئین‌هـای هیـدرولیز شـده کـه بـا مـدل آمـاری طـرح میکسـچر (Mixture) در سـطوح مشخصـی بـا یکدیگر مخلوط شده بودند باعث افزایش حدود سه برابـر مهـار رادیکال آزاد DPPH گردیـد و نتـایج بـه کـارگیری هیـدرولیز شده‌های پروتئینی از منابع مختلف پروتئینی را به عنوان منبع غنی جهت کنترل و کاهش واکنش‌های اکسیداسیون پیشنهاد کردند (۱۵). نتایج حاصل از مشـاهدات نشـان داده اسـت کـه پروتئین‌هـای هیـدرولیز شـده‌ی بـه‌دسـت آمـده از هیـدرولیز پروتئین سویای تخمیر شـده توسـط بـاکتری لاکتوباسـیلوس سوبتیلیس در غلظت ۱۰mg/ml دارای فعالیت بازدارنـدگی بـر رادیکال‌های سوپراکسید (۶۲٪) و هیدروکسیل (۹۶٪) نیز می-باشد (۱۶). به‌طورکلی نتـایج حاصـل از مطالعـات انجـام شـده نشان داده است که پـروتئین‌هـای هیـدرولیز شـده بـه‌عنـوان جایگزین پروتئین‌های هیدرولیز نشده به‌کار گرفته می‌شـوند و نتایج نیز نشان داده است کـه ایـن ترکیبـات زیسـت فعـال در درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله: بیماری‌های کبدی، فنیـل کتونوریا، فشارخون، دیابت تا حدودی موثر می‌باشند و نیز بـه-طور موفقیت آمیزی در رژیم غذایی افراد میان‌سال و ورزشکار، به عنوان ترکیبات فراسودمند و انرژی زا جهت تولید فـرآورده-های غنی شده با پپتیدهای زیست فعال به‌کار گرفته می‌شـوند (۱۷).

میـوه پرتقـال، از گونـه مرکبـات (*citrus*) و خـانواده (*Rutaceae*) می‌باشد که در کشورهای مدیترانـه‌ای بـه میـزان قابل توجهی تولید می‌گـردد (۱۸). نتـایج حاصـل از مطالعـات نشان داده است که هسته مرکبات منابع غنـی و بـا ارزشـی از پروتئین و روغن‌های گیاهی و خوراکی می‌باشـد و ایـن میـزان پروتئین در مقادیر ۲۶/۵-۱۷/۹٪ بر اساس وزن خشک متغیـر است (۱۹). هم‌چنین براساس نتایج حاصل از تحقیقـات انجـام شده، مشـخص شـده اسـت کـه هسـته پرتقـال دارای مقـادیر مناسبی از مواد معدنی، از جمله کلسیم و روی نیز می‌باشد؛ در نتیجه از آرد چربی‌گیری شده حاصل از هسته پرتقال می‌تـوان به‌عنوان مواد افزودنـی مـوثر در غـذاها اسـتفاده کـرد (۲۰). از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

طرفی مقدار ترکیبات ضد تغذیه‌ای موجود در هسته پرتقال، از جمله: اسید فیتیک، تانین، بازدارنده تریپسین و اگزالات به ترتیب ۱۰/۷۱میلی‌گرم، 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 آبگریز 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 شده‌ی هسته پرتقال: ابتدا پوست و مقادیر باقی مانده‌ی پالپ از تفاله هسته پرتقال جدا گردید؛ سپس هسته پرتقال پس از تمیز شدن وخشک 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 ۱به۱۰ چربی‌گیری و پس از نگه‌داری به مدت ۴۸ ساعت دردمای محیط به منظورخروج کامل بقایای حلال، مجددا 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 نگه داری شد.

تولید کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده: به منظور تهیه‌ی کنسانتره‌ی پروتئینی هسته پرتقال، ابتدا آرد چربی‌گیری شده‌ی هسته‌ی پرتقال به نسبت۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط شد و در دمای محیط با سدیم هیدروکسید یک نرمال به بیشینه pHحلالیت رسانده شد (pH=۱۰). سپس نمونه حاصل به مدت یک ساعت در دمای محیط هم زده شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دورrpm۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ (Hanil, combi 514R, Korea) گردید. سوپرناتانت حاصل جداسازی شده و با اسیدکلریدریک ۱ نرمال به نقطه ایزوالکتریک (pH=۳) رسانده شد و به مدت۳۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت. در مرحله بعد سوسپانسیون حاصل در دمای۴ درجه سانتی‌گراد با دورrpm۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوبات حاصل با ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو و توسط خشک کن انجمادی (مدل FD_4، 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 منظورحذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن در rpm۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی-گراد انجام شد و در نهایت سوپرناتانت حاصل پس از جمع آوری جهت انجام آزمون‌های بهینه سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد در فریزر نگه‌داری گردید (۲۳).

بهینه‌یابی فرآیند جهت دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت ضد اکسیدانی: به منظور بهینه یابی فرایند 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 افزارDesign Exper پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

جدول ۱. سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه یابی فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال

حدود تغییرات		حد بالا (+۱)	حد متوسط (۰)	حد پایین (-۱)
متغیرهای مستقل				
نسبت آنزیم به سوبسترا(درصد وزنی- وزنی)	X_1	۱	۲	۳
زمان (ساعت)	X_2	۲	۳/۵	۵
دمای هیدرولیز برای آنزیم پپسین(°C)	X_3	۳۰	۳۵	۴۰

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 رادیکالOH، 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} و 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 (ساعت)
۱	۱	۳۰	۲
۲	۱	۳۰	۵
۳	۲	۳۰	۳/۵
۴	۳	۳۰	۲
۵	۳	۳۰	۵
۶	۱	۳۵	۳/۵
۷	۲	۳۵	۲
۸	۲	۳۵	۳/۵
۹	۲	۳۵	۳/۵
۱۰	۲	۳۵	۳/۵
۱۱	۲	۳۵	۳/۵
۱۲	۲	۳۵	۳/۵
۱۳	۲	۳۵	۳/۵
۱۴	۲	۳۵	۵
۱۵	۳	۳۵	۳/۵
۱۶	۱	۴۰	۲
۱۷	۱	۴۰	۵
۱۸	۲	۴۰	۳/۵
۱۹	۳	۴۰	۲
۲۰	۳	۴۰	۵

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 مهار کنندگی 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 مهار کنندگی 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. سپس۱۰۰ میکرولیتر از محلول $FeSo_4.7H_2O$ 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 مهار کنندگی رادیکال هیدروکسیل از رابطه‌ی ۶ زیر محاسبه شد (۲۶).

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

رابطه ۱: مدل رگرسیونی قدرت مهار رادیکال DPPH :

$$Y= b0 + b1x1 - b2x2 + b3x3 - b12x1x2 + b13x1x3 + b23x2x3 + b11x12 + b22x22 + b33x32$$

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^{3+}:

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

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:

درصد بازدارندگی = (جذب نمونه - جذب کنترل) / جذب کنترل ×۱۰۰

رابطه ۶:

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) می‌باشد.

Ab= جذب نمونه بلانک که شامل تمام ترکیبات بالا (به جز نمونه پروتئین هیدرولیز شده و H2O2) می‌باشد.

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 اندازه گیری گردید (۲۷).

تجزیه و تحلیل آماری: به‌منظور بهینه‌یابی فرآیند هیدرولیز کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده شد و ترسیم نمودارها توسط نرم افزارDesign 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 نقطه ی 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 (۳-۱٪) 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 چلاته کنندگی یون آهن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بود. تجزیه تحلیل مربوط به دیگر نتایج پژوهش در قالب طرح فاکتوریل صورت گرفت و مقایسه 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. همانطورکه در جدول مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت هسته پرتقال چربی‌گیری شده،۰/۵۲ ± ۷/۱۳ 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 (۰/۱۵ ± ۵/۴۶) و (۰/۱۷ ± ۲/۶۶) بود؛ که به ترتیب کمتر و بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشند (۲۰). میزان پروتئین آرد کامل چربی‌گیری شده حدود۳/۵۱ ± ۲۲/۴۷ درصد و این مقدار در کنسانتره پروتئینی حدود۱/۴۱ ± ۷۵/۱۲ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج حاصل، با اعمال فرایند روغن‌گیری، میزان پروتئین بیشتری به‌دست آمد و عمل چربی گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی کنسانتره پروتئین شد (۴۳/۳۸٪ به ۵/۴۶٪). 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

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

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

*اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.
*میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

فعالیت ضداکسیدانی 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.

بهینه‌یابی فرآیند به منظور دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی

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 به‌کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۷۴۶۵ و ۰/۶۱۸۴ به‌دست آمد که اعداد به‌دست 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 به‌دست آمده را توضیح دهد.

معادله ۷:

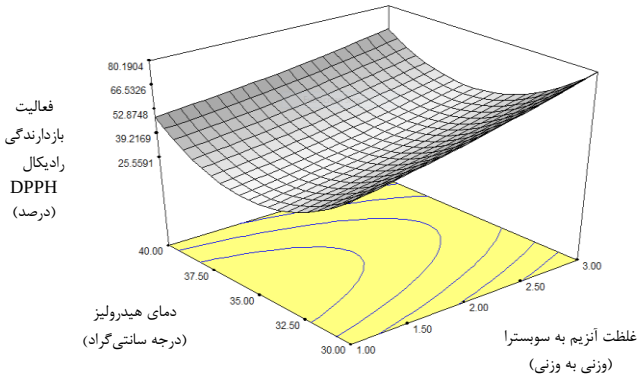
$$\text{فعالیت مهار رادیکال} = 35.82+11.98\,(X_1) -3.66\,(X_2) + 8.18\,(X_3) - 3.04\,(X_1X_2) + 0.015\,(X_1X_3) + 5.34\,(X_2X_3) + 1.71\,X_1^2 + 23.98\,X_2^2 + 4.30\,X_3^2$$

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

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

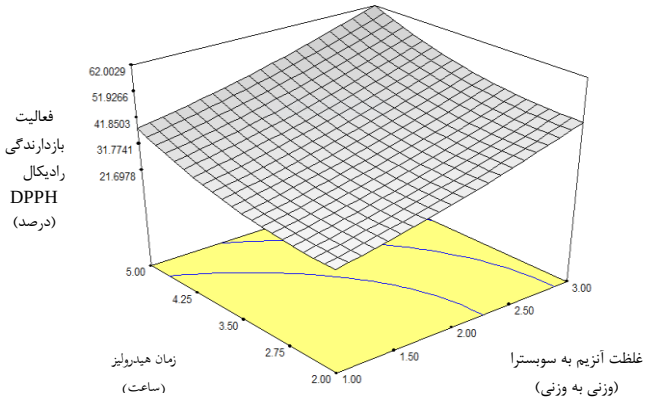
اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH: نمودار سه بعدی تأثیر دما و غلظت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در شکل ۱ نشان می‌دهد که افزایش دما و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، تأثیر مثبت بر افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکالDPPH داشت و منجر به افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال گردید. بنابراین بهتر است جهت دستیابی به بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکالDPPH، از دما (محدوده ۳۷- ۳۵ درجه سانتی‌گراد) و غلظت آنزیم بالاتر در زمان ثابت استفاده نمود.



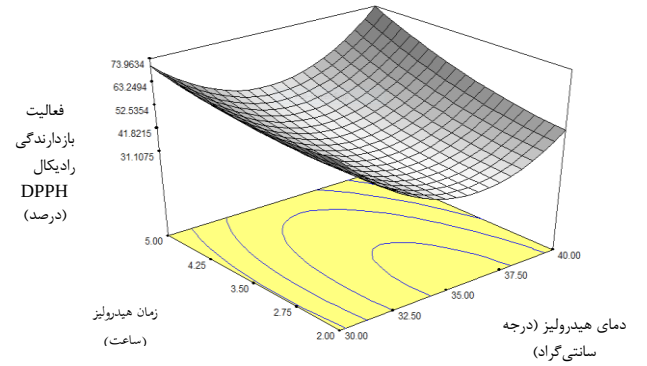
شکل ۱. نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قدرت مهار کنندگی رادیکال DPPH (زمان در حد بهینه ۳/۵ ساعت فرض شده است).

نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در دمای بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکالDPPH، 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، 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 مهار کنندگی رادیکال DPPH (دما در حد بهینه ۳۵ درجه سانتی‌گراد فرض شده است).



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

بررسی قدرت مهار کنندگی رادیکال OH: معادله ۸ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (قدرت مهارکنندگی رادیکالOH) ارائه شد:

معادله ۸:

فعالیت مهار رادیکال = 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.

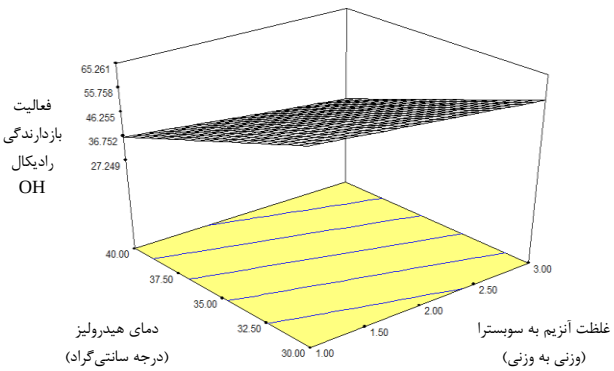
آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به‌کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده به ترتیب برابر با ۰/۶۸۵۲ و ۰/۶۳۴۱ به‌دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تعیین برابر۰/۶۸۵۲ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۶۸ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به‌دست 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 بهینه۳/۵ ساعت) بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال OH در شکل ۴ نشان می‌دهد که افزایش دما و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا، یک تأثیر منفی بر افزایش فعالیت مهارکنندگی رادیکال OH داشت. اما تغییرات دمایی تأثیر منفی بیشتری بر فعالیت مهار-کنندگی رادیکال OH داشت و بیشترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال OH، در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۱ درصد آنزیم مشاهده شد.

به‌طورکلی تفاوت در میزان مهارکنندگی 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:

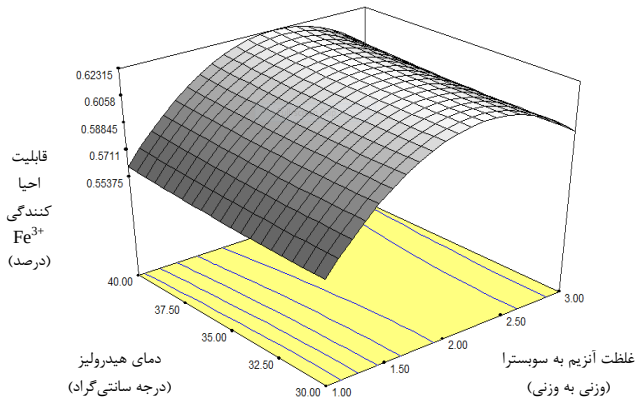
معادله ۹:

$$\text{فعالیت مهار رادیکال} = 0.62 + 0.019\,(X_1) + 3.1\,(X_2) - 0.022\,(X_3) - 2.5\,(X_1X_2) - 0.016\,(X_1X_3) - 8.25\,(X_2X_3) - 0.042\,X_1^2 + 1.5\,X_2^2 - 0.027\,X_3^2$$

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.

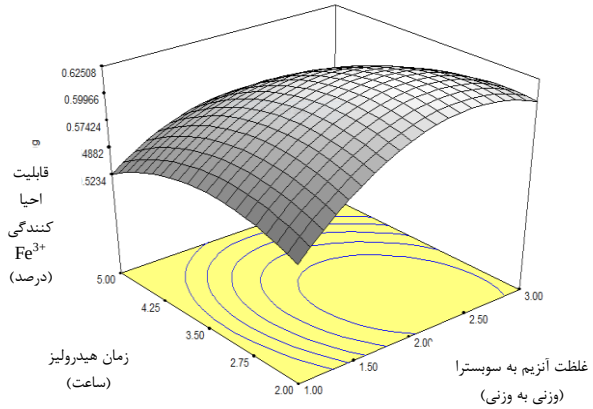
آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به‌کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده به ترتیب برابر با ۰/۷۹۵۳ و ۰/۶۳۱۰ به‌دست آمد که اعداد به‌دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تبیین برابر۰/۷۹۵۳ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۷۹ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به‌دست 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 بهینه۳/۵ ساعت) بر فعالیت احیاکنندگی 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).

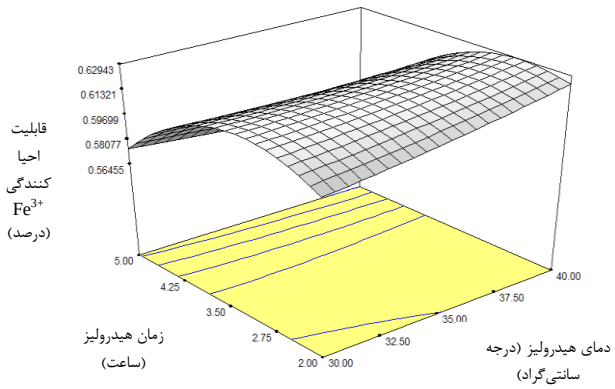
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]



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 شکل۶ 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).

بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی کل: معادله ۱۰ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) ارائه شد:

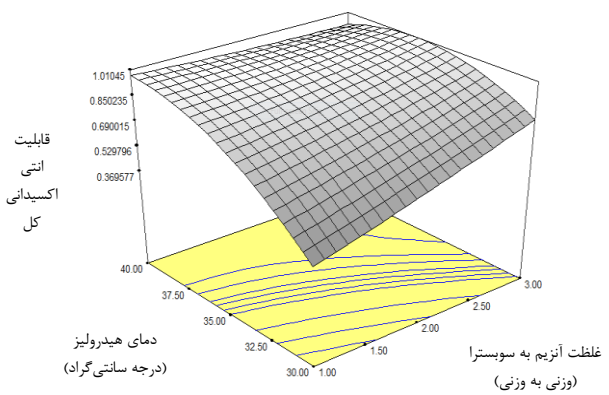
معادله ۱۰:

$$\text{قدرت آنتی‌اکسیدانی کل} = 0.20 - 0.25\,(X_1) - 0.65\,(X_2) - 0.092\,(X_3) - 0.11\,(X_1X_2) + 3.5\,(X_1X_3) - 0.041\,(X_2X_3) + 0.013\,X_1^2 - 0.14\,X_2^2 - 5.318\,X_3^2$$

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 به‌کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۹۶۰۶ و ۰/۹۲۵۱ به‌دست آمد که اعداد به‌دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تعیین برابر۰/۹۶۰۶ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۹۶ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به‌دست آمده را توضیح دهد.

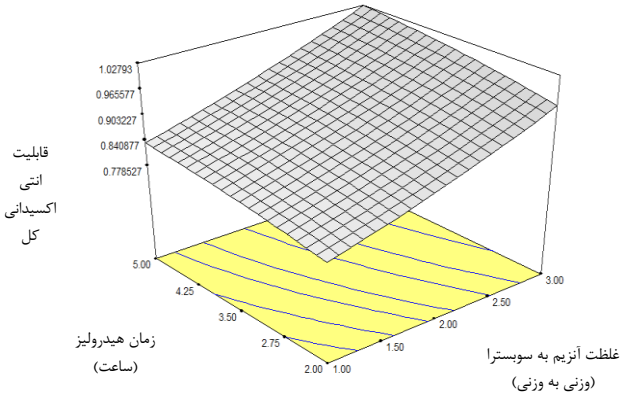
اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت آنتی‌اکسیدانی کل: نمودار سه بعدی ۸ تأثیر دما و نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا (در زمان بهینه ۳/۵ ساعت) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان می‌دهد که دمای هیدرولیز و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا یک تأثیر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت و این اثر افزایشی، در نمودار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

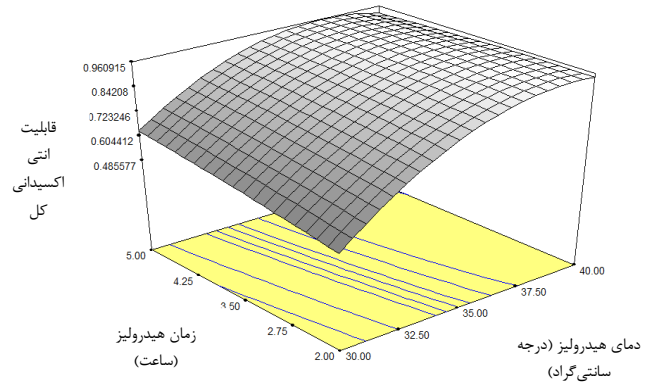
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

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 پروتئین هسته پرتقال با فعالیت بهینه (قدرت مهارکنندگی رادیکالDPPH، 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 احیاکنندگی Fe^{3+} و۸۵/۷۹ 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 مقادیر۵۹/۶۳ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ۴۸/۱۲ درصد برای قدرت مهار رادیکال‌های OH، ۵۷/۸۳ درصد برای قدرت احیاکنندگی Fe^{3+} و۸۷/۵۹ 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 ضداکسیدانی 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 گروه-های 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 ضداکسیدانی و قابلیت هیدروژن دهندگی 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 ضداکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها، به نوع پروتئاز بکار برده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

شده جهت هیدرولیز، درجه هیدرولیز، وزن مولکولی، توالی اسیدهای آمینه و ساختار پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز وابسته است (۲۹).

Guerar 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 به‌کار 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 به‌کار 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 ۳-۱ 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). به‌طورکلی 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، می‌توانند به عنوان اهداکننده‌ی موثر الکترون جهت کاهش رادیکال هیدروکسیل در نظر گرفته شوند (۳۵). به‌طورکلی 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 اندازه گیری 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). به‌طورکلی 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 پپیتیدها، 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: اسیدآمینه 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

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 mg/ml ۳ آنزیمی گزارش شد (۴۲).

تحقیق حاضر نشان داد که از طریق بهینه کردن شرایط هیدرولیز امکان تولید پپتیدهایی با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا و قابل‌استفاده 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.

• References

1. Danquah MK, Agyei D. Pharmaceutical applications of bioactive peptides. OA BioTech. 2012; 1:1-5.
2. Korhonen H, Pihlanto A. Bioactive peptides: Production and functionality. Int Dairy J. 2006; 16:945-960.
3. Power O, Jakeman P, FitzGerald RJ. Antioxidative peptides: Enzymatic production, in vitro and in vivo antioxidant activity and potential applications of milkderived antioxidative peptides. Amino Acids. 2013; 44:797-820.
4. Korhonen H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. J Funct Foods. 2009; 1:177-187.
5. 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.
6. Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive Peptides: A Review. Int J Bioautomation. 2011;15:223-250.
7. WiriyapHan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chem. 2012; 132:104-111.
8. Chen MS, Ouyang HC, Zhou SY, Li JY, Ye YB. PLGA nanoparticle mediated delivery of anti-OX40 monoclonal antibody enhances anti-tumor cytotoxicT cell responses. Immunology and Cell Biology. 2014; 287:91-99.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. 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.
14. Moayedi 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. FAO UNCTAD. From FAO data sited from: UNCTAD from FAO data. 2004.
19. Mohamed B, El-Shenawi M. Functional properties and In-vitro digestibility of bitter orange (Citrus aurantium) seed flour. MRJASSS. 2013; 1(3):042- 047.
20. 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.
21. 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
22. 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.
23. 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

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 Mytilusedulis protein hydrolysate. Food chem. 2013;138(2):1713-1719.

25. Umayaparvathia S, Meenakshia S, Vimalrajb V, Arumugama M, Sivagamic G, Balasubramaniana 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 Technolog. 2011;21:6646-6652.

29. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martı´nez-Ayala A, Da´vila-Ortı´z 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 l, 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 andsynthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolysed bymultiple 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 ant oxidative 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 proteinhydrolysates 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, Martı´nez-Ayala A, Da´vila-Ortı´z 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]

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

Mazloomi N[1], Sadeghi Mahoonak AR[2], Ghorbani M[3], Toldrá F[4],Gholamreza Houshmand Gh[5]*

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-Assocated 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-14]