

تأثیر پیش تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima L.*) توسط تریپسین و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی 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
sadeghiaz@yahoo.com

شناسه اراکید

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۷/۶

چکیده

سابقه و هدف: در این پژوهش، تأثیر پیش تیمار مایکروویو در بهینه سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو (*Cucurbita maxima L.*) با استفاده از آنزیم تریپسین، جهت دستیابی به حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها: 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 سوپسترای پروتئینی در بازه زمانی ۲۰ تا ۱۹۰ دقیقه، دما و pH ایتیم تریپسین انجام شد. قدرت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش های مهار رادیکال آزاد DPPH و فعالیت کیلیت کنندگی (Chelate) آهن و آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ارزیابی شد.

یافته ها: بیشینه مهار رادیکال آزاد DPPH ۵۶/۵ درصد، کیلیت کنندگی آهن ۹۶/۹ درصد، آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ۱/۰۳ و درجه هیدرولیز ۲۲/۳ درصد در شرایط بدون اعمال پیش تیمار، طی زمان ۱۹۰ دقیقه و نسبت E/S ۱/۱/۵ بدست آمد. این درحالی است که با اعمال پیش تیمار مایکروویو، بیشینه مهار رادیکال آزاد DPPH ۵۵/۳ درصد، فعالیت کیلیت کنندگی آهن ۹۴/۵ درصد، آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) ۱/۰۷ و درجه هیدرولیز ۲۵/۸ درصد طی زمان ۱۰۵ دقیقه و نسبت E/S ۱/۵ درصد بدست آمد. این نتایج تا حد زیادی مشابه نتایج ارائه شده توسط نرم افزار (به ترتیب، بدون اعمال پیش تیمار در زمان ۱۶۵/۱ دقیقه و ۱/۶۵ درصد E/S، ۵۵/۱، ۹۵/۵، ۱/۰۲، ۲۱/۳۵ درصد و با اعمال پیش تیمار در زمان ۱۰۶ دقیقه و ۱/۳۷ درصد E/S، ۵۱/۱، ۹۳/۷، ۱/۰۵، ۲۴/۹ درصد) می باشد.

نتیجه گیری: اعمال پیش تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین های دانه کدو با استفاده از آنزیم تریپسین ضمن کاهش قابل توجه زمان هیدرولیز، موجب تولید هیدرولیزات هایی با فعالیت آنتی اکسیدانی مناسب شده که می توانند جایگزین نگهدارنده های مصنوعی در محصولات غذایی شوند.

واژگان کلیدی: پیش تیمار مایکروویو، هیدرولیز آنزیمی، تریپسین، فعالیت آنتی اکسیدانی، پروتئین دانه کدو

• مقدمه

مصرف می شوند و بخش دیگر آن ها جزء ضایعات کشاورزی محسوب می شوند. دانه کدو (*Cucurbita sp.*) یکی از منابع غنی پروتئین می باشد که بخش اصلی آن را پروتئین های ذخیره ای گیاهی، گلوبولین های S۱۲ تشکیل می دهند و مشابه گلاسینین های سویا، لگومین حبوبات و کروسیفرین های کانولا، گلوبولین های S۱۲ دانه کدو را کوکوروبیتین می نامند.

گیاهان به طور مستقیم یا غیرمستقیم، ۹۵ درصد غذای مردم جهان را تشکیل می دهند، دانه ها و غلات بیش از ۵۰ درصد پروتئین اساسی مورد نیاز بدن انسان را تأمین می کنند. محتوای پروتئین دانه های روغنی دو تا چهار برابر بیشتر از غلات است، پروتئین دانه های روغنی کیفیت غذایی بالاتری نسبت به غلات دارند (۱). با این وجود فقط بخشی از دانه ها بصورت آجیل

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 (نور صنعت فردوس، ایران) با سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه به مدت ۴ ساعت مخلوط شد. عمل حذف روغن تا کاهش آن به حدود ۵ درصد ادامه یافت. حلال باقیمانده در کنجاله در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت توسط آون تحت خلأ (Memmert، آلمان) جدا شد. کنجاله حاصل به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) در آب-مقطر پخش شد و pH محلول به منظور 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. پس از آن عمل سانتریفیوژ (Combi-514R، کره جنوبی) به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد توسط سانتریفیوژ یخچال دار انجام شد و با جمع آوری محلول رویی یا سوپرناتانت، باقی مانده در آب مقطر حل شده و استخراج سوپرناتانت دوباره تکرار شد. سوپرناتانت ها جمع آوری و با یکدیگر مخلوط شدند و با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال pH آن روی ۴ تنظیم شد، عمل سانتریفیوژ مجدداً به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه تکرار شد. در نهایت رسوب حاصل توسط خشک کن انجمادی (FDB 5503، کره جنوبی) خشک شده و در ظروف دربسته و محیط خشک و خنک نگهداری شد (۱۱).

آزمون های شیمیایی

محتوای پروتئین نمونه: ۲ گرم از نمونه به همراه ۲۰ میلی لیتر اسید سولفوریک غلیظ و یک عدد قرص کدال (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 به کمک اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تا ارغوانی شدن نمونه در حضور معرف متیل رد 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 نرمالیه اسید کلریدریک، V_1 حجم اسید مصرفی برای نمونه، V_2 حجم اسید مصرفی برای شاهد و m وزن نمونه بر حسب

کوکوربیتین ها با آلومین های S_2 همراه هستند که مجموعاً ۵۹ درصد کل محتوای پروتئین خام در دانه های کدو را تشکیل می دهند (۲). اصلاح پروتئین ممکن است منجر به بهبود ارزش تغذیه ای پروتئین شود (۳) و بنابراین هیدرولیز آنزیمی می تواند به این منظور کمک کند. هیدرولیز آنزیمی موجب شکستن پیوندهای پپتیدی در یک پروتئین می شوند. هیدرولیزات های تولید شده، اندازه مولکولی کوچکتر و ساختار ثانویه کمتری نسبت به پروتئین اولیه را دارند (۴). امروزه، هیدرولیزات های حاصل از هیدرولیز پروتئین های مختلف رژیم غذایی دارای نقش های بیولوژیکی مختلفی مانند کاهش فشار خون (۵)، آرامش بخش (۶)، ضد کلسترول (۷)، آنتی اکسیدان (۸) و ضد سرطان (۹) می باشند. پروتئین حاصل از دانه کدو (*Cucurbita pepo*) سرشار از فعالیت آنتی اکسیدانی است و در کاهش اثرات بدخیم سوء تغذیه مؤثر می باشد (۱۰). مطالعات نشان دادند که هیدرولیزات های حاصل از پروتئین دانه کدو دارای خواص آنتی-اکسیدانی (۱۱-۱۳) می باشند. در مطالعاتی دیگر بیان شد که پروتئین های حاصل از دانه کدو دارای خواص آنتی اکسیدانی و کیلیت کنندگی مناسبی هستند (۱۴-۱۶). پیش تیمار مایکروویو پروتئین ها قبل از هیدرولیز آنزیمی جهت بهبود انتشار هیدرولیز شده ها از پروتئین های مختلف عمل می کند. این روش موجب باز شدن ساختار ۳ بعدی پروتئین و افزایش دسترسی آنزیم ها به پیوندهای پپتیدی می گردد (۱۷). Gazikalović و همکاران (۲۰۲۱) بیان کردند که پیش تیمار مایکروویو تأثیر قابل توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی زدایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، در نهایت هیدرولیزات های پروتئینی با خواص آنتی اکسیدانی مناسب تولید می کند (۱۸). این مطالعه با هدف بررسی تأثیر پیش تیمار مایکروویو در هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه کدو و ارزیابی فعالیت آنتی-اکسیدانی هیدرولیزات ها انجام شد.

• مواد و روش ها

تهیه مواد اولیه: ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima L.*) از بازار محلی آستانه اشرفیه در استان گیلان خریداری شد و پس از جداسازی دانه ها به صورت دستی، در دمای ۵۰ درجه سانتی-گراد به مدت ۷۲ ساعت در آون خشک شد (۱۳). آنزیم تریپسین مورد استفاده از منشا پانکراس خوک، دارای فعالیت پروتئازی ۴۰ U/mg و از برند مرک بود. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایشات از شرکت های معتبر (سیگما آلد ریچ، مرک و مجللی) تهیه شدند.

تولید کنسانتره پروتئینی: دانه های کدو خشک شده، بدون پوست گیری با پرس سرد روغن کشی شده و کنجاله حاصل

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 سوپسترا در آزمایشات هیدرولیز آنزیمی مورد استفاده 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 سوپسترای 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 به مدت 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 آب مقطر 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 طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis اندازه‌گیری شد. شاهد،

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

محتوای رطوبت نمونه: مقدار ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و در داخل آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه قرار گرفت و پس از ۱۵ دقیقه سرد شدن در داخل دیسکاتور، توزین انجام شد. این عمل چندین بار تکرار شد تا محتوای رطوبت نمونه به مقدار 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 ۵۵۰-۶۰۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶ ساعت انتقال یافت و حرارت‌دهی تا سفید شدن رنگ خاکستر ادامه یافت. در نهایت 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. در نهایت برای خارج کردن حلال باقیمانده، بالن محتوی نمونه به آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد انتقال یافت سپس بالن مجدداً 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 (۱۰۰ (Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ (pH 7.4) تهیه شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه هم‌زده شد و در معرض انرژی مایکروویو با توان

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

متغیرهای مستقل	$+\alpha$	$+1$	0	-1	$-\alpha$
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 کنسانتره پروتئین کدو: تأثیر متغیرهای مستقل زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا 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

مدل	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
A	۰/۳۷۲۰	۰/۰۰۰۹	۵
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 A²، B² و B تأثیر معنی‌داری بر روی درجه هیدرولیز می‌گذارند ($p < 0/05$). متغیر B²، نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر

حاوی ۸۰۰ میکرولیتر متانول و ۲۰۰ میکرولیتر DPPH (۱/۵ میلی‌مولار) است. توانایی مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۶ محاسبه شد (۲۲).

معادله ۶

$100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد مهار رادیکال آزاد DPPH}$

فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن: ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه بهینه، با ۱۰ میکرولیتر FeCl₂ (۲ میلی‌مولار) و ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، مخلوط شد. سپس ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (ferrozine) (۵ میلی‌مولار) به مخلوط اضافه شد و به مدت ۲ دقیقه به شدت 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 آب مقطر، ۱۰ میکرولیتر FeCl₂ و ۲۰ میکرولیتر محلول فروزین (۵ میلی‌مولار) است. درصد کیلیت-کنندگی با استفاده از معادله ۷ محاسبه شد (۲۲).

معادله ۷

$100 \times \text{جذب شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}) = \text{درصد کیلیت‌کنندگی}$

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 مولیدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده 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 سوپسترا (X₁) و زمان هیدرولیز (X₂) در پنج سطح ($+\alpha$ ، $+1$ ، 0 ، -1 ، $-\alpha$) و سه نقطه مرکزی آزمایش شدند. پاسخ‌های 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 ویژگی‌های 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.

آهن می‌گذارند ($P < 0.05$). متغیر B^2 ، نسبت به سایر متغیرها تأثیرگذارتر می‌باشد. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($P < 0.05$)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0.9569$ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد 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

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

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) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۰/۸ درصد E/S بود.

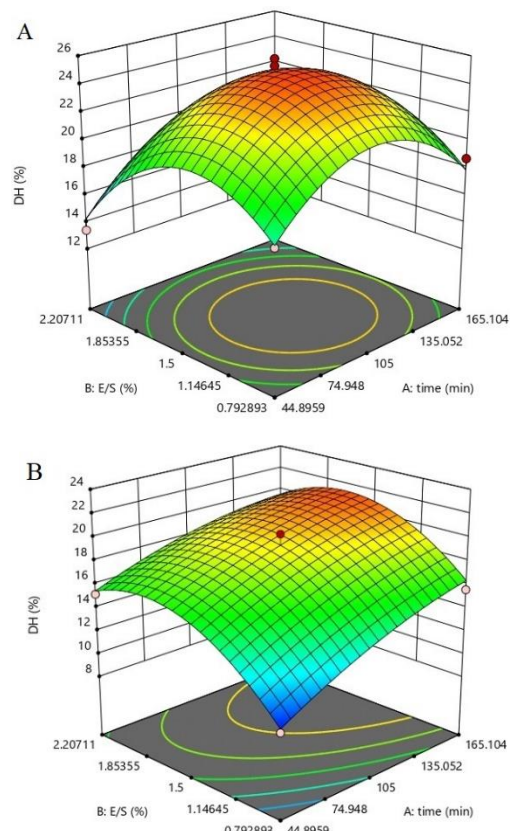
تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH: توجه به مقادیر عدد P جدول ۵، می‌توان بیان نمود که متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تأثیرگذار می‌باشند ($P < 0.05$). معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($P < 0.05$)، بیانگر این موضوع است که مدل به خوبی با داده‌های مربوط به فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مطابقت دارد. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0.8982$ می‌باشد. که نشان می‌دهد مدل توانسته ۸۹/۸۲ درصد از کل

معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش ($P < 0.05$)، بیانگر مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی دامنه متغیرهای مورد بررسی است. رابطه درجه هیدرولیز با متغیرهای مستقل، بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2 = 0.9693$ توانایی خوب مدل در پیش‌بینی تأثیر متغیرهای مستقل بر متغیرهای وابسته را نشان می‌دهد 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 و 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

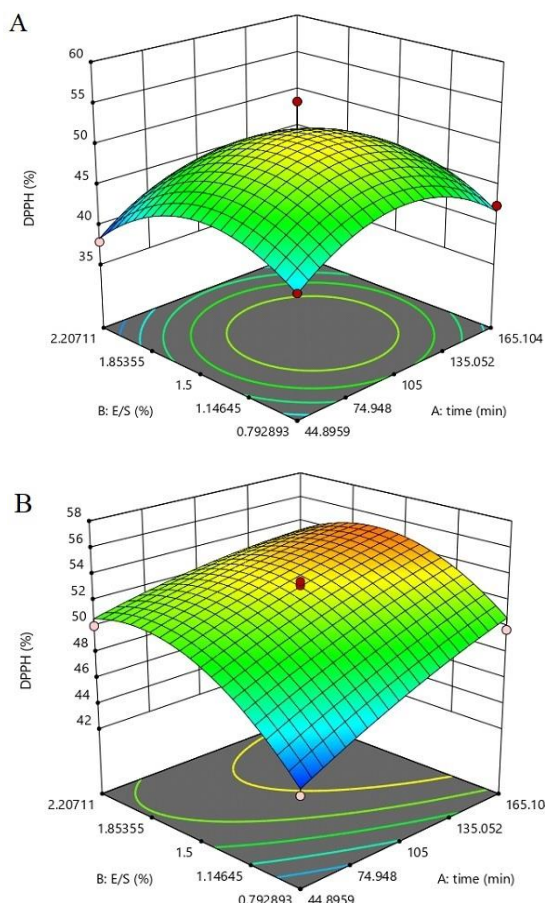
تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن: توجه به مقادیر عدد P در جدول ۴ استنباط می‌شود، مقادیر A^2 ، B^2 و B تأثیر معنی‌داری بر روی فعالیت کیلیت‌کنندگی

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

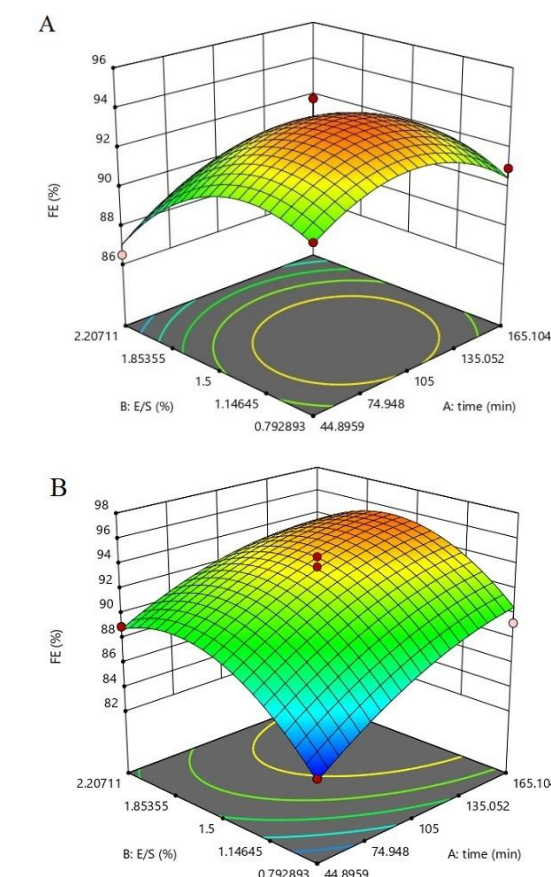
$$51.03-5.34A^2-5.42B^2$$

معادله ۱۰

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) متعلق به زمان ۴۵ دقیقه و نسبت ۲/۲ E/S 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) متعلق به 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 پیش تیمار میکروویو / شکل ۳-ب، تأثیر زمان و نسبت E/S بر مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین دانه کدو



شکل ۲. الف، تأثیر زمان و نسبت E/S بر فعالیت کیلیت‌کنندگی آهن با اعمال پیش تیمار میکروویو / 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 میکروویو

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

A: زمان

B: E/S

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 A²، B² بر فعالیت آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) تأثیر گذار 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 آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مطابقت دارد. رابطه فعالیت آنتی-اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) با متغیرهای مستقل،

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

مدل	ضریب رگرسیون	عدد P	درجه آزادی
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 چربی زدایی از کنجاله، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و ترسیب پروتئین ها در نقطه ایزوالکتریک آن ها می باشد (۲۴). کمترین میزان رطوبت مربوط به کنسانتره پروتئینی است که دلیل آن استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد جهت حذف هگزان باقیمانده پس از فرایند چربی زدایی و استفاده از خشک کن انجمادی به منظور خشک کردن رسوب پروتئینی بعد از فرایند استخراج می باشد (۲۵). کمترین میزان خاکستر مربوط به کنسانتره پروتئینی می باشد 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 کنسانتره 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 در گونه های مورد استفاده است.

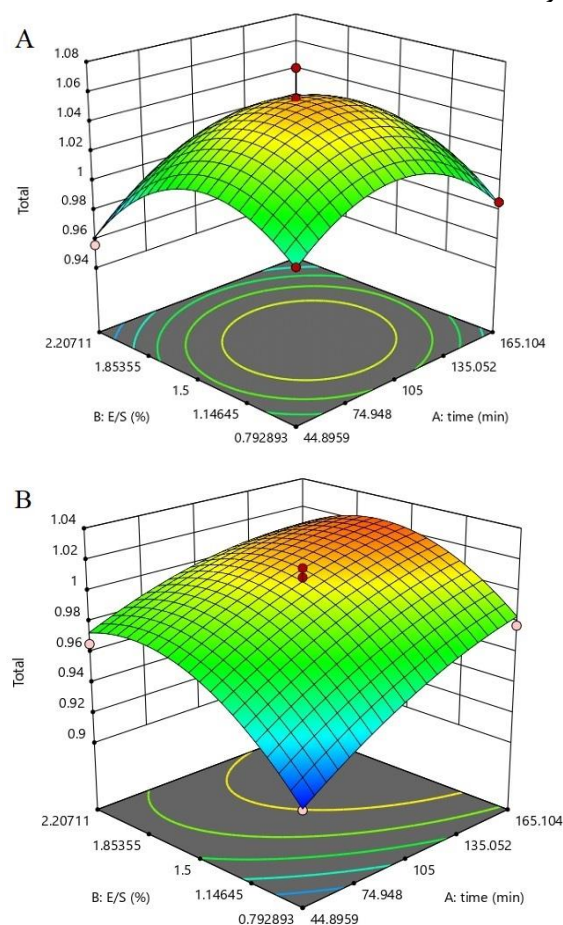
با توجه به شکل ۱-الف و ب، در هر دو حالت، درجه هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم کاهش یافت و از سوی دیگر، با اعمال پیش تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه موجب افزایش درجه هیدرولیز شد و افزایش بیشتر زمان تأثیر منفی داشت. کاهش میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان و نسبت آنزیم به سوستر، احتمالاً تحت تأثیر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

بصورت درجه دوم و با ضریب همبستگی $R^2=0.9342$ می باشد. که نشان می دهد مدل توانسته ۹۳/۴۲ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش بینی کند. معادله ۱۱ روابط بین متغیرهای واکنش و فعالیت آنتی اکسیدانی کل را نشان می دهد.

معادله ۱۱

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

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



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

می‌گردد (۳۴). Yang و همکاران (۲۰۲۲) اثر پیش تیمار 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، به کمک مایکروویو با توان ۳۰۰ وات بالاترین مقدار می‌باشد (۳۵). Dong و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند پیش تیمار مایکروویو با توان ۴۰۰ وات سبب بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) کاسته شده است. از طرف دیگر، با اعمال پیش تیمار، افزایش زمان تا ۱۰۵ دقیقه سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی 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 آنتی اکسیدانی کل می‌شود. ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ nm) پروتئین هیدرولیز شده به میزان درجه هیدرولیز و نوع آنزیم پروتئازی به کار رفته بستگی دارد (۳۷). این نتایج مشابه با یافته‌های مظلومی و همکاران (۲۰۱۹) و الوند و همکاران (۲۰۲۲) بود که به ترتیب 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 پیش تیمار مایکروویو سبب کاهش چشمگیر زمان هیدرولیز شده، لذا نمونه‌های حاصل از پیش تیمار به عنوان بهینه انتخاب شدند. شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم افزار، 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 آنتی اکسیدانی کل (۱/۰۷) و درجه هیدرولیز (۲۵/۸ درصد) پیشنهاد شد. جهت اعتبار سنجی مدل

یافته‌های You و همکاران (۲۰۰۹) و یاسمی و همکاران (۲۰۱۳) که به ترتیب 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 آب پنیر 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 پیش تیمار، 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 به دلیل تولید ترکیبات بازدارنده آنزیم طی هیدرولیز طولانی باشد؛ همچنین هیدرولیز پپتیدهای کیلیت‌کننده 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 قابل توجهی بر ساختار گلوتن و آلرژی‌زایی دارد و در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی، هیدرولیزات‌های پروتئینی با ویژگی آنتی اکسیدانی مناسب تولید می‌کند (۱۸). Nguyen و همکاران (۲۰۱۷) گزارش کردند که هیدرولیز آنزیمی به همراه پیش تیمار مایکروویو یک روش مناسب برای تولید هیدرولیزات‌های پروتئین ماهی با ویژگی‌های آنتی اکسیدانی 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 پیش تیمار، 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 ضد اکسایشی به شمار می‌آیند (۳۳). کاهش قابلیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت آنزیم می‌تواند 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 ضد اکسایشی تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز

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

در زمان و نسبت E/S پیشنهادی، مجدداً 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

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 pyrogalllic 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 T, 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].

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, Ziaifar 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.

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 Z¹, 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