مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال چهاردهم، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۸، صفحات ۵۰-۴۱

تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی اکسید نیتریک از هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو توسط آنزیم پپسین

کوثر ذاکری[۱]، محمد قربانی[۲]، علیرضا صادقی ماهونک[۳]، علی مویدی[۴]، یحیی مقصودلو[۵]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۲- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران پست الکترونیکی: moghorbani@yahoo.com
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
۵- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: در این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین دانه کدو (*Cucurbita pepo*) به منظور دستیابی به حداکثر خصوصیات مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: به این منظور غلظت آنزیم پپسین ۱-۳ درصد، دمای ۳۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰-۳۰۰ دقیقه به عنوان سطوح متغیرهای مستقل انتخاب شدند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک، دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۶۱/۵ و غلظت آنزیم به سوبسترا ۳٪ و با قابلیت ضداکسایشی و مهارکنندگی اکسید نیتریک برابر با ۵۴/۶۳٪ و ۸۹/۰۹٪ بود که تا حدود زیادی مشابه با نتایج پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار (۵۶/۰۳٪ و ۹۱/۹۲٪) بود.

نتیجه گیری: بر طبق نتایج به دست آمده پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو از قابلیت ضداکسایشی و مهارکنندگی اکسید نیتریک مناسبی برخوردار بوده است و از این رو می‌تواند به عنوان ترکیبی طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی اکسید نیتریک بالا، جایگزین نگه‌دارنده‌های سنتزی در محصولات غذایی شود.

واژگان کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، پپسین، روش سطح پاسخ، آنتی‌اکسیدانی، مهارکنندگی اکسید نیتریک

• مقدمه

پروتئین‌ها جزء منابع غذایی مهم برای تغذیه بشر به شمار می‌روند، زیرا این ترکیبات تأمین کننده نیتروژن، اسیدهای آمینه و انرژی مورد نیاز برای عملکرد طبیعی بدن می‌باشند (۱). پروتئین‌ها در ایجاد ویژگی‌های حسی و شیمیایی محصول موثرند. بسیاری از این ویژگی‌ها در ارتباط با پپتیدهای زیست‌فعال موجود در ساختار پروتئین‌هاست که در طی هضم در دستگاه گوارش توسط آنزیم‌های هضم‌کننده و پروتئازها تولید می‌شوند (۲).

امروزه پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی گوناگونی شناخته شده‌اند که می‌توانند نقش‌های بیولوژیکی متنوعی را ایفا کنند. این پپتیدها به عنوان ترکیبات ضد میکروب (۳)، ضد فشارخون (۴)، آرامش‌بخش (۵)، ضدکلسترول (۶)، ضداکسایش (۷)، ضدسرطان (۶)، ضدترومبوز (۸) و ... به شمار می‌روند. یکی دیگر از خواص این پپتیدها خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک می‌باشد که به عنوان ترکیب حد واسط در تولید نیتروزآمین‌ها عمل می‌نماید. نمک‌های نیترات و نیتریت که به عنوان یک افزودنی جهت تثبیت رنگ و مهار رشد برخی از میکروارگانسیم‌ها در فرآورده‌های گوشتی استفاده می‌شوند، اکسیدکننده‌های بسیار قوی می‌باشند. در اثر واکنش نیتریت با آمین‌های نوع دوم و سوم، ترکیب سرطان‌زای نیتروزآمین تشکیل می‌شود؛ که اگر در گوشت عمل‌آوری شده ترکیب

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

آنتی‌اکسیدان موجود باشد، خیلی سریع‌تر از آمین‌ها با نیتریت واکنش داده و از تشکیل نیتروزآمین جلوگیری می‌کند (۹).

نتایج حاصل از آزمایشات مختلف نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از هیدرولیز پروتئین کنجاله دانه کدو (۱۰)، کنسانتره پروتئین آب پنیر (۱۱)، پروتئین ماهی (۱۳، ۱۲)، پروتئین هیدرولیز شده‌ی گوشت تراولی زرد (۱۴)، پروتئین سویا (۱۵)، پروتئین‌های شیر مانند آلفالاکتالبومین و بتالاکتوگلوبولین (۱۶)، پروتئین سفیده تخم‌مرغ (۱۷) و پروتئین گلوتن (۱۸) فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان داده‌اند. Li و همکاران (۱۹) پروتئین حاصل از صدف (*Ruditapes philippinarum*) را توسط ۸ آنزیم پروتئاز هیدرولیز کردند و در نهایت به پپتیدهایی با بیشترین خاصیت مهار اکسید نیتریک توسط آنزیم آلکالاز دست یافتند.

دانه کدو (*Cucurbita pepo*) از نقطه نظر تغذیه‌ای حداقل به دلیل میزان پروتئین بالا و مقدار مناسبی از اسیدهای چرب ضروری به ویژه لینولئیک اسید حائز اهمیت است. این دانه یک منبع مغذی از پروتئین، فیتوسترول، بتاکاروتن و مواد معدنی مانند روی، پتاسیم، کلسیم، منیزیم، آهن، مس، فسفر بوده و در کاهش اثرات مخرب مربوط به سوء تغذیه مؤثر است. به علاوه یک منبع سرشار از انرژی است و به عنوان یک ترکیب با پتانسیل بالا برای استفاده در صنایع غذایی و دارویی به شمار می‌رود (۲۰). کنجاله حاصل از روغن‌کشی دانه کدو حاوی درصد بالایی پروتئین است که در حال حاضر فرایند خاصی روی آن انجام نشده است و با قیمت ارزان به مصرف خوراک دام می‌رسد. با توجه به پتانسیل بالای این ماده در تولید پپتیدهای زیست‌فعال، در این پژوهش بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی کنجاله کدو به منظور تولید پپتیدهایی با بیشترین اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و مهارکنندگی اکسید نیتریک توسط آنزیم پپسین مورد مطالعه قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد: کنجاله دانه کدو (*Cucurbita pepo*) از شرکت ابکار گرگان خریداری شد. آنزیم پپسین و رادیکال DPPH از شرکت سیگما و سود، اسید کلریدریک، سولفانیل آمید، فسفریک اسید، سدیم نیتروپروساید و اتانول از شرکت مرک، نفتیل اتیلن دی آمین دی هیدروکلراید از شرکت ریدل آلمان تهیه شدند. تمام مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

روغن گیری از کنجاله دانه کدو: پس از حذف مواد خارجی، کنجاله توسط دستگاه آسیاب (Perten,3100 ساخت آلمان) به آرد تبدیل و از الک با مش ۳۰ عبور داده شد. آرد حاصل به مدت ۱۶ ساعت با حلال هگزان به نسبت ۱:۳ چربی‌گیری، و پس از نگه‌داری به مدت ۴۸ ساعت در دمای محیط جهت خروج کامل بقایای حلال، به یخچال منتقل شد (۲۱).

تهیه آرد کنجاله کدو: کنجاله‌های چربی‌گیری شده در این مرحله توسط دستگاه آسیاب (Perten,3100 ساخت آلمان) آسیاب شدند به طوری که ذرات آرد شده بتوانند از الک با مش ۷۰ عبور کنند. نمونه‌ها در کیسه‌های پلی‌اتیلنی با درب بسته در شرایط دمایی یخچال نگه‌داری شدند (۲۲).

استخراج پروتئین دانه کدو: ابتدا کنجاله دانه کدو چربی‌گیری شده به نسبت ۱ به ۱۰ در آب پراکنده و سپس pH محلول توسط سود ۱ نرمال به pH=۱۰ رسانده و به مدت یک ساعت در دمای اتاق مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰g و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در سانتریفیوژ یخچال‌دار (مدل Combi514R، کره جنوبی) قرار گرفت. سپس سوپرناتانت حاصل به منظور رسوب پروتئین‌های دانه کدو، توسط اسیدکلریدریک ۱ نرمال به pH=۵ رسانده شد و تحت شرایط مشابه سانتریفیوژ گردید. رسوب به دست آمده توسط خشک‌کن انجمادی (مدل FD_4، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی) خشک گردید و سپس جهت انجام آزمایشات بعدی در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد فریزر نگه‌داری شد (۲۳).

هیدرولیز کنسانتره پروتئینی دانه کدو: به این منظور کنسانتره به نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر فسفات با pH برابر با ۲ (حد اپتیمم آنزیم) پراکنده و آنزیم در غلظت ۱٪ تا ۳٪ افزوده شد. سپس هیدرولیز در محدوده دمایی و زمانی ۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد و ۵-۲ ساعت در انکوباتور شیکردار (مدل 8480-VS، کره جنوبی) با دور ۲۰۰ rpm به انجام رسید. در انتها واکنش آنزیمی در ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف و سانتریفوژ کردن برای حذف ترکیبات اضافه در ۵۰۰۰g به مدت ۳۰ دقیقه انجام گرفت (۲۴). سوپرناتانت حاصل جهت انجام مراحل بعدی آزمایشات، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد فریزر نگه‌داری گردید.

بررسی خصوصیات شیمیایی کنجاله کدو: اندازه‌گیری رطوبت، خاکستر و پروتئین به ترتیب توسط روش‌های AACC ۴۴-۱۵، ۰۸-۰۱ و ۴۶-۱۲ و اندازه‌گیری چربی کنجاله به روش سوکسله (۲۵) انجام گرفت.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH: ۱۰۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۰/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۶٪ مخلوط شده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داری و در نهایت جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۶). در نمونه کنترل به جای نمونه پروتئین هیدرولیز شده از ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH =
[جذب شاهد/ (جذب نمونه – جذب شاهد)] *۱۰۰

اندازه‌گیری فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک: ۶۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۶۰ میکرولیتر از سدیم نیتروپروساید در بافر نمکی فسفات (۰/۰۲۵ مولار) مخلوط کرده و درون پلیت‌ها ریخته و به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق درون انکوباتور قرار داده شد. (برای بررسی درستی روش کار از اسید آسکوربیک به عنوان یک نمونه مثبت استفاده شد). سپس به مقدار مساوی (۱۲۰ میکرولیتر) معرف گریس (شامل سولفانیل آمید، نفتیل اتیلن دی هیدروکلراید و فسفریک اسید) به آنها افزوده و مقدار جذب در ۵۴۶ نانومتر اندازه‌گیری شد (۲۷).

درصد مهارکنندگی اکسید نیتریک =
[جذب شاهد/ (جذب نمونه – جذب شاهد)] * ۱۰۰

بهینه‌سازی فرایند: به منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر خواص ضداکسایش و مهارکنندگی اکسید نیتریک از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ (Response Surface Method) با طرح مرکب مرکزی (Central Composite Designs) برای سه متغیر مستقل زمان (X_1)، دما (X_2) و نسبت آنزیم به سوبسترا (X_3) در سه سطح (۱+، ۰، ۱-) استفاده شد. حدود هر کدام از متغیرهای مستقل با توجه به نتایج آزمون‌های آزمایشی به‌دست آمد. پاسخ‌های مورد بررسی خصوصیات مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک بودند. ۲۰ تیمار به‌طور تصادفی با شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم‌افزار انتخاب شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ ارائه شده است. مدل رگرسیونی ۱ و ۲ به منظور پیش‌بینی پاسخ‌های اول و دوم (مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک) توسط معادلات ذیل پیشنهاد شد:

$$_1= b_0 - b_1x_1 - b_2x_2 + b_3x_3 - b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 - b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 + b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (۱)$$

$$R_2= b_0 - b_1x_1 + b_2x_2 + b_3x_3 - b_{12}x_1x_2 + b_{13}x_1x_3 - b_{23}x_2x_3 + b_{11}x_1^2 - b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2 \quad (۲)$$

در معادلات فوق R_1 و R_2 پاسخ یا متغیر وابسته (به ترتیب مربوط به فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک)، b_0 مقدار ثابت و b_1، b_2 و b_3 اثرات خطی (Linear Effects)، b_{11}، b_{22} و b_{33} اثرات درجه دوم (Quadratic Effects) و b_{12}، b_{13} و b_{23} اثرات متقابل (Interaction Effects) می‌باشند.

جدول آنالیز واریانس (ANOVA)، ضرایب رگرسیونی، رسم نمودارها و بهینه‌سازی توسط نرم‌افزار Design Expert انجام گرفت و معنی‌داری آزمون‌ها از طریق محاسبه F-Value در سطح احتمال معنی‌داری ۰/۰۵ بررسی شد.

جدول ۱. سطوح متغیرهای مستقل مورد استفاده برای بهینه سازی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک پروتئین دانه کدو

متغیرهای مستقل	حدود تغییرات		
	+۱	۰	-۱
زمان هیدرولیز (دقیقه)	۳۰۰	۲۱۰	۱۲۰
دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	۴۰	۳۵	۳۰
نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)	۳	۲	۱

• یافته‌ها

ویژگی‌های شیمیایی دانه کدو: ویژگی‌های شیمیایی دانه کدو در جدول ۲ آمده است.

آنالیز سطح پاسخ: با توجه به نقاط تعریف شده توسط RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. نتایج فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک مربوط به هر تیمار در جدول ۳ نشان داده شده است.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH: معادله زیر با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مدنظر (خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH) ارائه شد:

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH = ۴۳/۰۷ + (زمان × ۰/۴۰) - (دما × ۵/۶۴) + (نسبت آنزیم به سوبسترا × ۱/۷۸) - (نسبت آنزیم به سوبسترا× دما × ۶/۰۸) - (نسبت آنزیم به سوبسترا × زمان × ۳/۰۶) + (دما × زمان × ۶/۹۶) - (نسبت آنزیم به سوبسترا × نسبت آنزیم به سوبسترا × ۶/۰۰) + (دما × دما × ۳/۴۲) + (زمان × زمان × ۲/۰۶) + (

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

جدول ۲. ویژگی‌های* شیمیایی کنجاله و کنسانتره پروتئینی دانه کدو

ماده	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
کنجاله چربی‌گیری شده	۵۱/۸ ± ۱/۱۹	۹/۶۵ ± ۰/۱۵	۷/۰۳ ± ۰/۰۹	۷/۶۳ ± ۰/۰۲
کنسانتره پروتئینی دانه کدو	۷۶ ± ۱	۱/۲۹ ± ۰/۴۶	۱۲/۵۶ ± ۰/۰۱	۰/۸۱۵ ± ۰/۰۱۵

*نتایج میانگین سه تکرار هستند.

جدول ۳. تیمارهای تصادفی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو

تیمار	زمان (دقیقه)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)	نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (٪)	فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریت (٪)
۱	۱۲۰	۳۰	۳	۵۵/۹۳	۸۸/۴۲
۲	۲۱۰	۳۵	۲	۴۲/۹۱	۸۶/۴۱
۳	۱۲۰	۴۰	۱	۵۶/۷۹	۹۰/۶۲
۴	۳۰۰	۳۰	۳	۸۴/۵۵	۸۷/۸۲
۵	۱۲۰	۴۰	۳	۵۴/۲۶	۹۲/۶۵
۶	۲۱۰	۳۵	۱	۵۳/۳۶	۸۷/۰۱
۷	۲۱۰	۳۵	۲	۳۸/۷۲	۸۸/۷۳
۸	۳۰۰	۴۰	۳	۳۶/۷۸	۸۷/۸
۹	۳۰۰	۳۰	۱	۵۰/۵۶	۷۲/۰۹
۱۰	۱۲۰	۳۵	۲	۴۶/۰۱	۹۰/۸۱
۱۱	۲۱۰	۴۰	۲	۴۳/۳۹	۷۴/۵۸
۱۲	۲۱۰	۳۵	۳	۴۴/۶۷	۸۷/۸۳
۱۳	۲۱۰	۳۵	۲	۵۱/۲۵	۹۰/۳۹
۱۴	۳۰۰	۴۰	۱	۴۵/۳۳	۷۸/۸۱
۱۵	۱۲۰	۳۰	۱	۵۲/۴۰	۸۲/۳۵
۱۶	۳۰۰	۳۵	۲	۴۴/۱۳	۸۱/۳۶
۱۷	۲۱۰	۳۰	۲	۴۹/۴۸	۶۸/۵۲
۱۸	۲۱۰	۳۵	۲	۴۱/۳۱	۸۴/۵۵
۱۹	۲۱۰	۳۵	۲	۴۱/۵۸	۹۳/۷۶
۲۰	۲۱۰	۳۵	۲	۴۲/۹۱	۹۳/۳۶

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تعیین واقعی (R Square) و تعیین تعدیل شده (Adjusted R Square) و عدم برازش ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. ضریب تعیین یا R^2 معیاری است برای اینکه مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است و هرچه مقدار آن به ۱ نزدیک‌تر باشد مدل بهتر می‌تواند پاسخ را پیش‌بینی کند (۲۸). در این مطالعه میزان ضریب تعیین و ضریب تعیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۸۱۳۵ و ۰/۶۴۵۷ به‌دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود، همچنین فاکتور عدم برازش که معیاری برای مناسب بودن مدل ارائه شده می‌باشد میزان ۰/۱۲۳۶ را به خود اختصاص داده است. ضریب تعیین برابر ۰/۸۱۳۵ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۸۱ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

تأثیر متغیرهای مستقل بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH: اثر متغیرهای مستقل بر قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در شکل ۱ نشان داده شده است.

تأثیر غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر مهار رادیکال DPPH در شکل ۱a آمده است. همان طور که مشاهده می‌شود، در غلظت‌های اولیه آنزیم، افزایش دمای هیدرولیز موجب افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد شد، درحالی که در غلظت‌های بالا عکس این اتفاق رخ داده است و روند کاهشی را دنبال می‌کند، به طوری‌که در غلظت‌های بالا با افزایش دمای

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

هیدرولیز قدرت مهار رادیکال DPPH کاهش یافته است. به این ترتیب که بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و غلظت آنزیم ۱٪ دیده شده است.

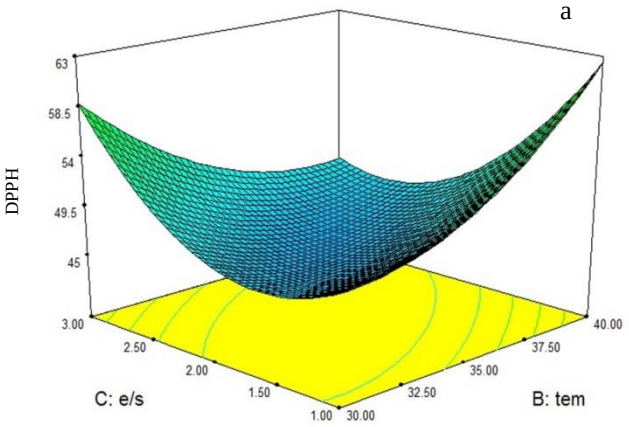
مطابق شکل ۱b اثر متقابل غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بر قدرت مهار رادیکال DPPH نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، افزایش غلظت آنزیم و همچنین افزایش زمان هیدرولیز منجر به کاهش قدرت مهار رادیکال DPPH شده است؛ به این ترتیب که بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد در زمان ۱۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱٪ بوده است.

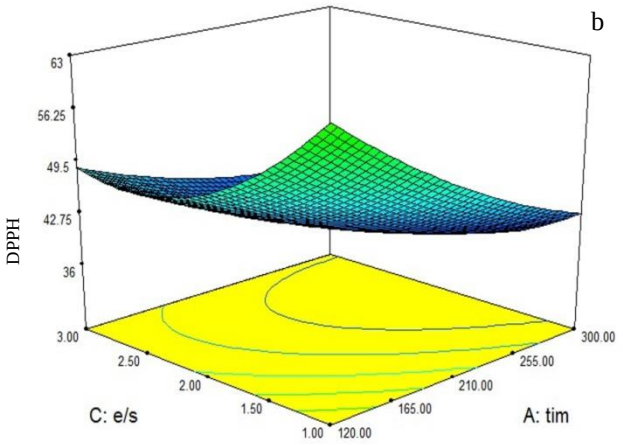
آنچه در شکل ۱c قابل مشاهده است تأثیر متقابل دما و زمان هیدرولیز بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌باشد. مطابق شکل، در زمان‌های اولیه هیدرولیز، افزایش دمای هیدرولیز سیر صعودی در میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد را موجب شده است، در حالی که در زمان‌های پایانی عکس عمل اتفاق افتاده است و افزایش دما منجر به نزول میزان مهار رادیکال آزاد شده است. بدین ترتیب که بالاترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در زمان ۱۲۰ دقیقه و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد دیده شده است.

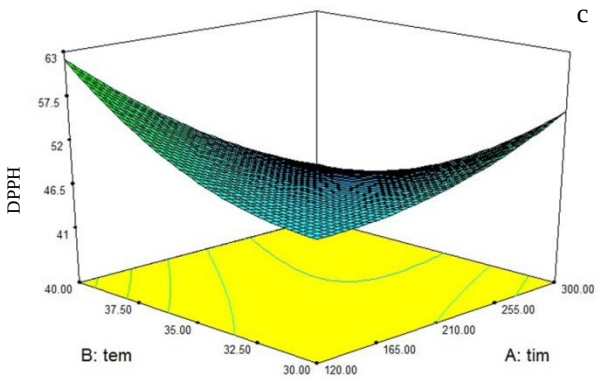
بر اساس نتایج حاصل نمونه تولید شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم پپسین ۱٪، به عنوان نمونه بهینه تولید شده توسط پپسین از لحاظ خاصیت مهار رادیکال DPPH در نظر گرفته شد.

فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک: معادله‌های خطی زیر با در نظر گرفتن ضرایب رگرسیونی برای خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک با توجه به معنی‌داری ضرایب پیشنهاد شد:

فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک = ۸۶/۷۶ + (زمان × ۳/۷۰) + (دما × زمان × ۰/۷۳)- (نسبت آنزیم به سوبسترا × ۳/۳۶) + (دما × ۲/۵۳) × دما × ۱/۳۵) - (نسبت آنزیم به سوبسترا × زمان × ۲/۰۸)+ - (زمان × زمان ×(دما × دما × ۱۱/۰۴) ۳/۴۹) + (نسبت آنزیم به سوبسترا (نسبت آنزیم به سوبسترا × ۴/۸۳) +







نمودار۱. نمودارهای کنترلی اثر متغیرها بر میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH تحت شرایط مختلف هیدرولیز

(a): نسبت آنزیم (٪) و دما (°C)

(b): زمان (دقیقه) و نسبت آنزیم(٪)

(c): زمان (دقیقه) و دما (°C)

ضرایب تعیین و تعیین تعدیل شده برای مدل ارائه شده به ترتیب برابر با ۰/۷۳۵۴ و ۰/۴۹۷۲ محاسبه شد. بالا بودن این ضرایب تعیین نشان‌دهنده توزیع و پراکندگی مناسب داده‌ها بوده است به این معنی که مدل توانسته است ۷۳ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را پیش‌بینی کند. همچنین فاکتور عدم برازش که معیاری برای مناسب بودن مدل ارائه شده می‌باشد، میزان ۰/۱۴۹۸ را به خود اختصاص داد. بالا بودن میزان عدم برازش از سطح احتمال معنی‌داری (۰/۰۵) یا به‌عبارت دیگر بی‌معنی بودن این فاکتور نشان‌دهنده‌ی مناسب بودن مدل پیشنهاد شده و برازش مدل براساس پاسخ‌های در نظر گرفته شده می‌باشد (۱۲).

تأثیر متغیرهای مستقل بر خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک: اثر متقابل غلظت آنزیم و دمای هیدرولیز بر خاصیت مهار اکسید نیتریک در شکل ۲a نشان داده شده است. با توجه به شکل، در یک دمای ثابت، افزایش غلظت آنزیم

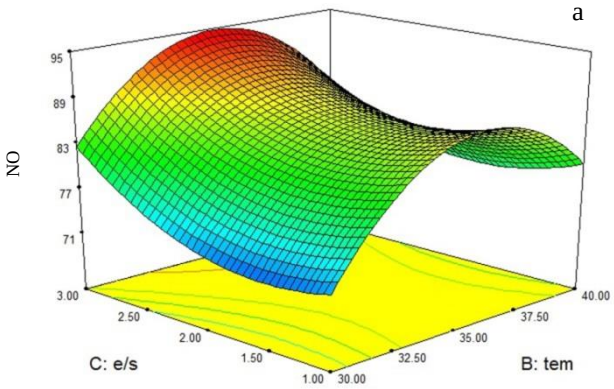
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

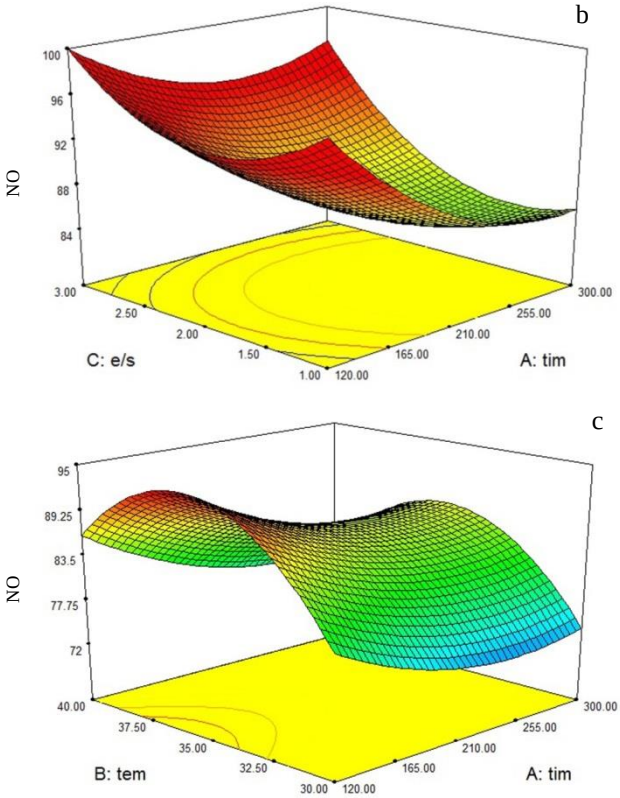
نزدیک به مقدار ۲ درصد، به میزان کمی کاهش قدرت مهارکنندگی و پس مقدار ۲ درصد آنزیم، افزایش بیشتر فعالیت مهارکنندگی را در پی داشته است. از طرفی در یک غلظت ثابت آنزیم، افزایش دمای هیدرولیز تا دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد موجب کاهش میزان خاصیت مهار اکسید نیتریک و پس از دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد افزایش قدرت مهار اکسید نیتریک را موجب شده است. بدین ترتیب که بیشترین میزان خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و غلظت آنزیم ۳ درصد دیده شده است.

در شکل ۲b مشاهده می‌شود در تمامی غلظت‌های آنزیم، با گذشت زمان هیدرولیز نزدیک به زمان ۲۱۰ دقیقه میزان مهارکنندگی کاهش یافته و پس از آن، به‌صورت شیب ملایمی افزایش قدرت مهارکنندگی اکسید نیتریک را به همراه داشته است؛ به طوری‌که بیشترین فعالیت مهارکنندگی در زمان ۱۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۳ درصد دیده شده است.

با توجه به اثر متقابل دما و زمان هیدرولیز در شکل ۲c، در یک دمای ثابت، با افزایش زمان هیدرولیز (قبل از زمان ۲۱۰ دقیقه)، قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد سیر نزولی داشته و پس از گذشت زمان ۲۱۰ دقیقه به میزان کمی سیر صعودی گرفته است. همچنین با در نظر گرفتن یک زمان ثابت، مشاهده می‌شود افزایش دمای هیدرولیز تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد افزایش قدرت مهارکنندگی و پس از آن، کاهش فعالیت مهارکنندگی را موجب شده است. بدین ترتیب که بیشترین میزان فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۲۰ دقیقه مشاهده شده است.

بنابراین با توجه به یافته‌های مذکور برای فعالیت مهارکنندگی رادیکال اکسید نیتریک می‌توان سه مقدار ۱۲۰ دقیقه، ۳۵ درجه سانتی‌گراد و ۳ درصد را به ترتیب برای زمان هیدرولیز، دمای هیدرولیز و غلظت آنزیم پپسین، به عنوان مقادیر بهینه معرفی نمود.





نمودار۲. نمودارهای کنترلی اثر متغیرها بر میزان فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک تحت شرایط مختلف هیدرولیز

(a): نسبت آنزیم (٪) و دما (°C)

(b): زمان (دقیقه) و نسبت آنزیم(٪)،

(c): زمان (دقیقه) و دما (° C) .

• بحث

ویژگی‌های شیمیایی دانه کدو: با توجه به نتایج به‌دست آمده از جدول ۲، کنجاله و کنسانتره پروتئین دانه کدو دارای پروتئین بالایی بوده است. علت این موضوع انجام فرآیند استخراج به کمک قلیا بود که منجر به جداسازی قسمت‌های غیرپروتئینی از کنجاله و تجمع پروتئین در بخش باقی‌مانده گردید (۲۹). میزان چربی موجود در کنسانتره نسبت به کنجاله کمتر بود. علت کاهش چربی در کنسانتره در مقایسه با کنجاله، فرآیند چربی‌گیری انجام شده بر کنجاله دانه کدو قبل از تهیه کنسانتره و فرآیند استخراج پروتئین به روش محلول سازی قلیایی و ترسیب در نقطه ایزوالکتریک بوده است. مقادیر خاکستر و چربی به دست آمده معادل مقادیر گزارش شده توسط نورمحمدی و همکاران (۱۰) و مظلومی و همکاران (۳۰) می‌باشد. میزان رطوبت کنجاله و کنسانتره پروتئین دانه کدو به‌ترتیب ۷/۰۳ و ۱۲/۵۶ به‌دست آمده است که میزان رطوبت کنسانتره پروتئینی نسبت به گزارش منابع مذکور بیشتر بوده است و علت این موضوع می‌تواند نگه‌داری طولانی مدت آن باشد که موجب جذب رطوبت آن شده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

اثر متغیرهای مستقل بر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH: کاهش قابلیت مهارکنندگی رادیکال با افزایش غلظت آنزیم می‌تواند به علت اثر هضم کنندگی 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 ضداکسایش تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد (۳۱).

فعالیت ضداکسایش پپتیدها به میزان انتخابی بودن پروتئاز مورد استفاده، درجه هیدرولیز، ماهیت پپتیدهای آزاد شده و سایر ویژگی‌ها از قبیل قابلیت باند کردن رادیکال‌های آزاد، فعالیت شلاته کنندگی یون‌های فلزی و قدرت الکترون‌دهندگی، توالی آمینواسیدی و وجود آمینواسیدهای خاص در زنجیره پپتیدی آن‌ها وابسته است (۱). از سویی، قدرت ضداکسایش هیدرولیز شده‌های تولیدی بستگی زیادی به آرایش ساختاری و توالی‌های خاص آمینواسیدی موجود در زنجیره پپتیدی دارد. برخی محققان معتقدند که هیستیدین، آمینواسیدهای هیدروفوب و پپتیدهایی با توالی پرولین- هیستیدین- هیستیدین دارای قدرت ضداکسایش می‌باشند (۳۲).

کاهش مقدار فعالیت مهارکنندگی توسط پروتئین هیدرولیز شده، با زیاد شدن زمان هیدرولیز می‌تواند ناشی از، پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده پروتئینی باشد که این موضوع باعث شکستن زنجیرهٔ برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تشکیل شده در مراحل اولیهٔ هیدرولیز و کاهش آن‌ها می‌شود (۲۸). آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای آبگریز مانند لوسین و آمینواسیدهای آروماتیک مانند فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر آمینواسیدها می‌گردد و اعتقاد بر این است که گروه فنیل در انتهای باقیمانده زنجیره پپتیدی دارای قابلیت مهار رادیکال می‌باشد (۳۳). کاهش در قدرت مهار رادیکال با افزایش زمان هیدرولیز توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (۳۱).

در تحقیقی که توسط Sun و همکاران بر خواص ضداکسایش پپتیدهای حاصل از هیدرولیز هموگلوبین خوک توسط فلاورزیوم، پاپائین، آلکالاز، پپسین و تریپسین انجام گرفت، بیشترین قدرت مهار رادیکال DPPH (۶۷٪) مربوط به هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین پس از ۶۰ دقیقه هیدرولیز بود (۳۳). WiriyapHan و همکاران پس از هیدرولیز ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین اعلام کردند که الزاما رابطه مستقیمی میان درجه هیدرولیز و قدرت ضداکسایش پپتیدهای تولیدی وجود ندارد. بنابر گزارش این محققین، هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ دارای بالاترین قدرت ضداکسایش بودند، در حالی که پپتیدهای تولیدی توسط آلکالاز و تریپسین به ترتیب با درجات هیدرولیز ۲۷٪ و ۱۱٪ دارای اثر قابل مقایسه و کمتر از هیدرولیز شده‌های تولیدی توسط پپسین بودند (۳۴).

اثر متغیرهای مستقل بر خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک: با توجه به این‌که تاکنون پژوهشی در زمینه‌ی اثر پروتئین‌ها بر مهارکنندگی اکسید نیتریک صورت نگرفته، بنابراین امکان مقایسه و تفسیر بر اساس پژوهش‌های مشابه ندارد. اما با توجه به مطالعات فراوانی که در زمینه تأثیر ترکیبات فنلی بر مهار رادیکال اکسید نیتریک صورت گرفته، در این بخش به بعضی از آن‌ها اشاره شده است.

در پژوهش انجام گرفته توسط Yu و همکاران دریافتند، عصاره فنلی پوست نوعی کاج خاصیت مهار رادیکال نیتریت بالایی داشته است، به گونه‌ای که با افزایش غلظت عصاره، میزان مهار اکسید نیتریک افزایش می‌یابد (۳۵). همچنین Zhonggao و همکاران ویژگی مهار رادیکال نیتریت را در عصاره شاه‌توت بررسی کردند و نشان دادند که ظرفیت به دام اندازی رادیکال‌های نیتریت در غلظت‌های پایین ناچیز بوده و به تدریج با افزایش غلظت عصاره، قدرت آن بیشتر شده است (۳۶).

در پژوهشی دیگر، نیکخواه و همکاران قدرت مهارکنندگی نیتریک اکسید آنتوسیانین‌های سه گونه توت را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که قدرت مهارکنندگی توسط عصاره آنتوسیانینی توت‌ها همزمان با افزایش غلظت عصاره افزایش می‌یابد (۳۷).

همچنین تأثیر مثبت عصاره سه گیاه دارویی *Phyllunthus freternus*، *Triumfetta rhomboidae* و *Casuarina littorea* (۳۸) و گیاه *pinus densiflora* (۳۹) بر مهار رادیکال اکسید نیتریک ثابت شده است. در پژوهش انجام گرفته توسط Lee و همکاران (۴۰) و Shrestha و همکاران (۴۱) به ترتیب بر روی عصاره فنلی میوه *Actinidia arguta* و *Rhus parviflora* ، ثابت شده این ترکیبات خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک بالایی داشته‌اند.

بهینه‌سازی واعتبارسنجی (Validation) مدل: شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به دست آمدند. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت بهینه مهار رادیکال DPPH و مهار اکسید نیتریک مطابق با شرایط دمای ۳۹/۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم به سوبسترا ۱٪ به‌دست آمد که منطبق با قابلیت ضداکسایشی و مهارکنندگی اکسید نیتریک برابر با ۵۶/۰۳٪ و ۹۱/۹۲٪ بود.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

به منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده توسط نرم افزار، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش‌بینی شده توسط مدل اجرا گردید که قابلیت ضداکسایش و مهارکنندگی اکسید نیتریک به‌ترتیب برابر با ۵۴/۶۳٪ و ۸۹/۰۹٪ به‌دست آمد. مقادیر آزمایشی به طور نزدیک مطابق با شرایط پیش‌بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی اکسید نیتریک از پروتئین دانه کدو می‌باشد.

نتیجه‌گیری: هرساله میلیون‌ها تن محصولات جانبی با ارزش از تولید و فرایند کردن محصولات غذایی ایجاد می‌شود. یکی از این محصولات جانبی کنجاله دانه کدو می‌باشد که تاکنون مصرف عمده آن در خوراک دام بوده است. به منظور ارزش‌افزایی برای این محصول که از نظر اقتصادی دارای اهمیت بوده و به علت غنی بودن این ماده از نظر پروتئین با ترکیب اسیدآمینه مناسب، در این مطالعه تلاش شد تا از کنجاله به عنوان منبع پروتئینی مناسب استفاده به عمل آید. مطالعه پیش رو نشان داد که با ایجاد شرایط بهینه با استفاده از آنزیم پپسین می‌توان به طور قابل توجهی نسبت به مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و کاهندگی رادیکال اکسید نیتریک اقدام نمود. روش سطح پاسخ، به عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای دستیابی به حداکثر خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH و مهارکنندگی اکسید نیتریک، دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۶۱/۵ دقیقه و غلظت آنزیم به سوبسترا ۳٪ برای پروتئین دانه کدو بوده است. از این رو پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو می‌تواند به عنوان ترکیبی طبیعی با خواص آنتی‌اکسیدانی و مهارکنندگی اکسید نیتریک بالا، جایگزین نگه‌دارنده‌های سنتزی در محصولات غذایی از جمله فرآورده‌های گوشتی شود.

• References

1. Torruco-Uco J, Chel-Guerrero L, Martínez-Ayala A, Dávila-Ortíz, G, Betancur-Ancona D. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from Phaseolus lunatus and Phaseolus vulgaris seeds. LWT-Food Science and Technology 2009; 42(10): 1597-1604.
2. Fritz M, Vecchi B, Rinaldi G, Cristina Anon M. Amaranth seed protein hydrolysates have in vitro antihypertensive activity. Food Chemistry 2011; 126: 878-884.
3. Marshall SH, Arenas G. Antimicrobial peptids: A natural alternative to chemical antibiotics and a potential biotechnology. Electronic Journal of Biotechnology 2003; 6: 271-284.
4. Sharma S, Singh R, Rana S. Bioactive peptides: a review. International Journal of Bioautomation 2011; 15: 223-50.
5. Ohinata K, Agui S, Yoshikawa M. Soymorphins, novel mu opioid peptides derived from soy β-conglycinin β subunit, have anxiolytic activities. BioScientific, Biotechnology, Biochemistry 2007; 71: 2618 2621.
6. Cho SJ, Juillerat MA, Lee CH. Identification of LDL-receptor transcription stimulating peptides from soybean hydrolysate in human hepatocytes. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2008; 56: 4372-4376.
7. Kou X, Gao J, Xue Z, Zhang Z, Wang H, Wang X. Purification and identification of antioxidant peptides fromchickpea (*Cicer arietinum L.*) albumin hydrolysates. LWT-Food Science and Technology 2013; 50: 591–598.
8. Rajapakse N, Yung W, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. Life Sciences 2005; 76: 2607-2619.
9. Hauser E,Yam I, Yerman P. Nitrosamine in leben esmitteln. Swiss Food 1980; 2: 13-22.
10. Nourmohammadi E, Sadeghi mahoonak AR, 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. Journal of Food Science and Technology 2017; 61(13): 135-142. [in Persian]
11. Piri S, Sadeghi mahoonak A R, Ghorbani M, Alami M. Production and study on antioxidant activity of protein hydrolysate from whey protein. Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology 2016; 3(4): 272-282. [in Persian]
12. Mehrgan nikoo A, Sadeghi mahoonak AR, Ghorbani M, Taheri A, Aalami M. Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (Carassius carassius) protein hydrolysate by response surface methodology. Food Processing and Preservation Journal 2014; 1: 95-110. [in Persian]
13. Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology 2008; 151: 410-419.
14. Klompong V, Benjakul S, Yachai M, Visessanguan W, Shahidi F, Hayes KD. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). Journal of Food Science 2009; 74: 126-133.
15. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-Conglycinin. Journal of Agricultural and Food Chemistry 1995; 43: 574-578.
16. Hernandez-Ledesma B, Davalos A, Bartolome B, Amigo L. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b- actoglobulin. Identification of active peptides by HPLC–MS/MS. Journal of Agricultural and Food Chemistry 2005; 53: 588-593.
17. Davalos A, Miguel M, Bartolome B, Lopez-Fandino R. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Protection 2004; 67: 1939-1944.
18. Maria DC, Antonella F, Iolanda A, Rosa CB, Agustin OA, Dolfo MR. In vitro release of angiotensinconverting

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

enzyme inhibitors, peroxyl-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. Journal of Cereal Science 2007; 45: 327-334.

19. Li GH, Qu MR, Wan JZ, You JM. Antihypertensive effect of rice protein hydrolysate with in vitro angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in spontaneously hypertensive rats. Asia Pacific Journal of Clining Nutrition 2007; 16: 275–280.

20. Reham M, Reham R, Lamiaa A. Effect of substituting pumpkin seed protein isolate for casein on serum liver enzymes, lipid profile and antioxidant enzymes in CC14-intoxicated rats. Advances in Biological Research 2009; 3: 9-15.

21. Kaur M, Singh N. Characterization of protein isolates from different Indian chickpea (*Cicerarietinum L.*) cultivars. Food Chemistry 2007; 102: 366-374.

22. Glew RH, Glew RS, Chuang LT, Huang YS, Millson M, Constans D, et al. Amino Acid, Mineral and Fatty Acid Content of Pumpkin Seeds (*Cucurbita spp*) and Cyperus esculentus Nuts in the Republic of Niger. Plant Foods for Human Nutrition 2006; 61: 51–56.

23. Živanović I, Vaštag Z, Popović, S., Popović, L., Peričin, D. Hydrolysis of hull-Less pumpkin oil cake protein isolate by Pepsin. International Journal of Biological and Life Sciences 2011; 7: 30-34.

24. Villanueva A, Vioque J, Sánchez-Vioque R, Clemente A, Pedroche J, Bautista J, et al. Peptide Characteristics of Sunflower Protein Hydrolysates. Journal of the American Oil Chemists' Society 1999; 76: 1455-1460.

25. Parvaneh V. Quality control and chemical analysis of foods. Tehran Univ. Press 2004; 332p. [in Persian]

26. 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 Chemistry 2009; 114: 1198-1205.

27. Tsai PJ, Tsai TH, Yu CH, Ho SC. Comparison of No-scavenging and NO-suppressing activity of different herbal teas with those of green tea. Food Chemistry 2007; 103: 181-187.

28. Taheri A, Abedian Kenari A, Motamedzadegan A, Habibi-Rezaei M. Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering 2011; 7(5): 1556-3758. [in Persian]

29. Khantaphant S, Benjakula S, Kishimurab H. Antioxidative and ACE inhibitory activities of proteinhydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper preparedusing pyloric caeca and commercial proteases. Process Biochemistry 2011; 46(1): 318-327.

30. Mazloomi SN, Sadeghi Mahoonak AR. Characterization of Nutritional properties of protein Isolate of pumpkin (*Cucurbita pepo* Con. Pepo Var *Styriaca*) seeds. Journal of Food Science and Technology 2017; 70(14): 13-25. [in Persian]

31. Meshkinfar N, Sadeghi Mahoonak AR, Ziaiifar AM, Ghorbani M, Kashani Nejad M. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. Tabriz, Journal of Food Researches 2014; 24(2): 215-225.

32. Phelan M, Aherne A, FitzGerald R, O'Brien N. Casein-derived bioactive peptides: biological effects, uses, safety aspects and regulatory status. International Dairy Journal 2009; 19(11): 643-654.

33. Sun Q, Shen H, Luo Y. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. Journal of food science and technology 2011; 48(1): 53-60.

34. WiriyapHan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chemistry 2012; 132: 104-111.

35. Yu L, Zhao M, Wang JS, Cui Ch, Yang, B, Jiang Y, et al. Antioxidant, immunomodulatory and anti-breast cancer activities of pHenolic extract from pine (*Pinus massoniana Lamb.*) bark. *Innovative* Food Science and Emerging Technologies 2007; 9: 122-125.

36. Zhonggao C, Felgines O, Texier C, Besson DJ, Liu J, Wang S. Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries. Food Technology and Biotechnology 2005; 43(1): 97-102.

37. Nikkhah A, Khayami M, Heidari R. Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins from black berry (*Morus nigra L.*), strawberry (*Fragaria vesca L.*) and berry (*Morus alba L. Var. nigra*) extracts. Scientific & Research Journal of Iranian Medicinal & Aromatic Plants 2011; 25(1): 120-128. [in Persian]

38. Parul R, Kundu SK, Saha P. In Vitro Nitric Oxide Scavenging Activity Of Methanol Extracts Of Three Bangladeshi Medicinal Plants. The Pharma Innovation 2013; 12(1): 83-88.

39. Kwon JH, Kim JH, Choi SE, Park KH, Lee MW. Inhibitory Effects of Phenolic Compounds from Needles of *Pinus densiflora* on Nitric Oxide and PGE2 Production. Archives Pharmacal Research 2010; 33(12): 2011-2016.

40. Lee J, Sowndhararajan K, Kim M, Kim J, Kim D, Kim S, Kim G, Kim S, Jhoo J. Antioxidant, inhibition of a-glucosidase and suppression of nitric oxide production in LPS-induced murine macrophages by different fractions of *Actinidia arguta* stem. Saudi Journal of Biological Sciences 2014; 1-7.

41. Shrestha S, Lee DY, Park JH, Cho JG, Lee DS, Li B, Kim YC, Kim GS, Bang MH, Baek NI. Phenolic components from *Rhus parviflora* fruits and their inhibitory effects on lipopolysaccharideinduced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. Natural Product Research 2013; 27(30): 2244–2247.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]

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

Zakeri K[1], Ghorbani M[2], Sadeghi Mahoonak AR[3], Moayedi A[4], Maghsoudlou Y[5]*

1- MSc Student, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

*2-*Corresponding author: Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: moghorbani@yahoo.com*

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

4- Assistant Prof, Dept. of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

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

Received 31 May, 2018 **Accepted 26 Sept, 2018**

Background and Objectives: In this study, hydrolysis condition optimization of the pumpkin (*Cucurbita pepo*) seed proteins was carried out achieve maximum DPPH radical scavenging and nitric-oxide inhibition properties using Design Expert Software and response surface methodology.

Materials & Methods: In general, 1–3% concentrations of pepsin enzyme, 30–40 °C temperature and 120–100 min time were selected as the independent variables.

Results: Results showed that the optimum conditions for achieving maximum DPPH radical scavenging and nitric-oxide inhibition activities included temperature of 32 °C, time of 161.5 min and an enzyme-substrate ratio of 3% with antioxidant and nitric-oxide inhibitory activities of 54.63 and 89.09%, respectively. These results were largely similar to the results suggested by the software (56.03 and 91.92%, respectively).

Conclusion: Based on the results, hydrolyzed proteins of the pumpkin seeds include good antioxidant and nitric-oxide inhibitory activities and can therefore be used as natural compounds for replacing synthetic preservatives in food products.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Pepsin, Response surface method, Antioxidant, nitric-oxide inhibition

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2025-07-12]