بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ

پریا شعبانی[a]، بهروز اکبری آدرگانی[*b]

[a] دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم دارویی، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
[b] دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۵/۱۰/ ۱۵ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۶/۰۸/۰۳

چکیده

مقدمه: پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. از مهمترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی و افزایش دهنده سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. هدف از انجام این پژوهش، بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از آرد پنبه دانه توسط آنزیم پپسین به روش سطح پاسخ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی با سطوح متغیرهای مستقل: دما (۳۰-۴۰°C)، زمان (۵-۲ ساعت)، نسبت آنزیم به سوبسترا (۲٪-۰/۵) انتخاب گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پنبه‌دانه توسط چهار آزمون مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاء کنندگی و شلاته کنندگی یون آهن بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اثر متغیرهای واکنش بر پاسخ های آزمایش معنی‌دار است ($P<0/05$). شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل دمای ۳۱/۱°C، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷۵٪ حاصل شد و تحت این شرایط میزان مهار رادیکال آزاد ۸۳٪، قدرت احیاء کنندگی ۰/۱۵۸ انگستروم، شلاته کنندگی ۷۰٪، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۱/۹۹ میلی‌مول آلفاتوکوفرول بر میلی‌لیتر و درجه هیدرولیز در شرایط بهینه ۳۱/۷۵ ٪ تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا می‌باشد و می‌تواند به عنوان آنتی اکسیدانی طبیعی در مواد غذایی استفاده شود. بنابراین استفاده از این پروتئین‌های هیدرولیز شده در فرمولاسیون مواد غذایی توصیه می‌شود.

واژه‌های کلیدی: *پروتئین هیدرولیز شده، پنبه دانه، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی اکسیدانی*

[*] نویسنده مسئول مکاتبات email: analystchemist@yahoo.com

مقدمه

پروتئین‌ها به طور گسترده در صنعت غذا قابل استخراج و استفاده هستند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش‌های مورد استفاده جهت بهبود ویژگیهای کاربردی و تغذیه‌ای پروتئین‌های غذایی است. اکسیداسیون چربی‌ها یکی از موارد نگران کننده در صنایع غذایی است زیرا از جمله عوامل ایجاد کننده طعم و بوی نامطلوب و برخی بیماری‌ها در بدن هستند که عامل آن‌ها پراکسیداسیون لیپیدها و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مرحله‌ی نهایی اکسیداسیون می‌باشند(Li *et al.*, 2008)، از این رو استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در سال‌های گذشته در صنایع غذایی رایج بوده اما باتوجه به نگرانی‌های شایع مصرف کنندگان در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و به خطر افتادن سلامتی بدن، تحقیقاتی در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در دهه‌ی اخیر انجام شده است. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی فعالیت قوی‌تری دارند اما به دلیل سمیت این ترکیبات شیمیایی استفاده از آن‌ها محدود شده است (Ito *et al.*, 1986). با توجه به علاقه‌ی بیشتری که محققان برای بررسی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در سال‌های اخیر از خود نشان داده‌اند، تحقیقات زیادی روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال انجام شده است که مشخص شده است جهت به تأخیر انداختن فساد مواد غذایی و دارویی، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی جایگزین مناسبی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی می‌باشد. پپتیدهای زیست‌فعال با جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ کیلودالتون، در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه می‌باشند. پپتیدهای زیست فعال اغلب به عنوان اجزاء پروتئینی مورد مطالعه قرار می‌گیرند، این پپتیدها در ساختار اصلی غیرفعال بوده و پس از آزاد شدن به وسیله‌ی هیدرولیز آنزیمی، عملکرد فیزیولوژیکی مختلفی از خود نشان می‌دهند(Sarmadi & Ismail, 2010). توانایی آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال به تأثیرات چندگانه نسبت داده می‌شوند که برخی از این ویژگی‌ها از قبیل قابلیت آن‌ها به عنوان شلاته کننده‌ی فلزات واسطه، مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون آهن، فعالیت ضدسرطانی، کاهش فشار خون و ... می‌باشد (Li *et al.*, 2008). تاکنون بیشترین مطالعات پیرامون تاثیر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ویژگی‌های هیدرولیز شده‌های تولید شده از پروتئین‌های کازئین، آب پنیر و سویا انجام گرفته است (Cho *et al.*, 2004). محققان زیادی نشان دادند که پپتیدهای زیست‌فعال تولید شده در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها دارای اثرات ضداکسایش هستند (Samaranayaka & Li-Chan, 2011; Erdmen *et al.*, 2008).

نتایج Wiriyaphanو همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که هیدرولیز آنزیمی ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین و پپتیدهای تولید شده توسط آنزیم پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ بیشترین قابلیت ضد اکسایشی را به خود اختصاص دادند. در مطالعه‌ای پیرامون تأثیر سویا و پپتیدهای آن نشان داده شده که مصرف وعده‌های حاوی ۲۰٪ پروتئین هیدرولیز شده سویا تأثیر ممانعت کننده بر تنش اکسایشی در موشها داشته است (Takenaka *et al.*, 2003). کازئین شیر گوسفند هیدرولیز شده توسط آلکالاز، پپسین، تریپسین و کیموتریپسین نیز فعالیت ضداکسایش قوی نشان داد که در ارتباط با وجود مقدار زیادی هیستیدین و لوسین در زنجیره پپتیدی بود(Silva and Malcata, 2004). در تحقیقی که توسط Cumby و همکاران (۲۰۰۸) گزارش شده، بر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا، آنزیم‌های آلکالاز، یک اندو پپتیداز و فلیورزایم با فعالیت اندو و اگزو پپتیدازی جهت هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفتند و هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستم‌های مدل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های مؤثر به ویژه با زدودن رادیکالهای آزاد و عمل به عنوان عامل احیا کننده عمل نمودند. این اثر وابسته به غلظت و نیز تحت تأثیر نوع آنزیم به کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیزشده بود. هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیورزایم بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را در بین تمامی نمونه ها از خود نشان داد درحالیکه هیدرولیزشده‌ی حاصل از مخلوط آلکالاز و فلیورزایم در کارایی آنتی‌اکسیدانی در قیاس با هیدرولیزشده‌های حاصل از آنزیم آلکالاز تفاوت معنی‌داری از خود نشان نداد. همچنین مشخص شد که هیدرولیز شده‌ها در افزایش ظرفیت نگهداری آب و بازدهی پخت مؤثر بودند.

پروتئین پنبه دانه برای نخستین بار در سال ۱۸۷۶ به عنوان منبع پروتئینی در رژیم‌های غذایی کم نشاسته به

منظور استفاده انسان معرفی شد. سطح زیر کشت پنبه در ایران و جهان به ترتیب ۳۰/۴۶ و ۹۰۰۰۰ هکتار، عملکرد ۷۳۴ کیلوگرم و ۳۶۲۱/۴۱ در هکتار و تولید ۱۰۲/۷۴ میلیون پوند و ۳۰۰۰۰۰ تن و تولید جهانی کنجاله‌ی پنبه دانه ۱۳/۹۶ میلیون تن می‌باشد (کوشکی و همکاران، ۱۳۹۰).

پنبه دانه دارای ٪۲۶ درصد چربی است و کنجاله‌ی حاصل از فرآیند روغن کشی آن دارای ٪۴۵ پروتئین است. پروتئین‌های پنبه دانه به دو گروه کلی ذخیره‌ای و غیر ذخیره‌ای تقسیم‌بندی می‌شوند. پروتئین‌های ذخیره ای در بذر گیاه و درون دانه‌های آلرون قرار دارند و وزن مولکولی آن‌ها زیاد است و با داشتن نقطه‌ی ایزو الکتریک ۷ در حلال‌های قلیایی محلول می‌باشند ولی پروتئین غیر ذخیره‌ای با نقطه‌ی ایزوالکتریک ۴ و وزن مولکولی زیاد جزء پروتئین‌های فعال سیتوپلاسم بوده و سبب چسباندن سلول‌ها به یکدیگر می‌شوند. از مهم‌ترین خواص پروتئین فرآورده‌های پنبه دانه می‌توان به طعم شیرین، رنگ روشن، زیاد بودن ارزش تغذیه‌ای، برخورداری از خاصیت آنتی‌اکسیدانی، قابلیت جذب آب و بهبود رنگ محصولات تولیدی، خاصیت امولسیفایری و قابلیت جذب روغن اشاره کرد. بنابراین پروتئین پنبه‌دانه یکی از مهم‌ترین فرآورده‌های جانبی حاصل از روغن گیری پنبه دانه می‌باشد که می‌تواند به عنوان جایگزین جدید و یک منبع ارزان قیمت پروتئین با کیفیت بالا محسوب شود. به منظور ارزش افزایی برای این محصول که از نظر اقتصادی دارای اهمیت فراوان است و به علت غنی بودن این ماده از نظر پروتئین با ترکیب اسید آمینه مناسب، در این تحقیق تلاش خواهد شد تا از آن به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای هیدرولیز آنزیمی استفاده شود و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی آن با استفاده از آنزیم پپسین مورد بررسی قرار گرفته است. در واقع هدف از این مطالعه بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از پنبه دانه به روش سطح پاسخ و با استفاده از آنزیم پپسین می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- مواد

در این تحقیق جهت بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی از آنزیم پپسین ساخت شرکت سیگما-آلدریچ (Luis, USA) استفاده شد. واکنشگر DPPH[1] از کمپانی سیگما-آلدریچ (Luis, USA) استفاده شد. اتانول، بافر فسفات، فری سیانید پتاسیم، تری‌کلرو استیک اسید (TCA)[2]، اسید سولفوریک، آمونیم مولیبدات، سدیم دی-هیدروژن فسفات و فروزین از شرکت مرک (Dortmond, Germany) همگی با درجه آزمایشگاهی و خلوص بالای ٪۹۹/۹۹ خریداری شدند.

- روش‌ها

- ارزیابی خصوصیات شیمیایی کنجاله‌ی پنبه دانه

کنجاله‌ی چربی‌گیری شده پنبه دانه به صورت آماده از یک کارخانه تولید پنبه تهیه شد. جهت اندازه‌گیری مقدار چربی کنجاله از روش سوکسله ویژه مواد با کمتر از یک درصد چربی، با به کارگیری ۲۰ میلی‌لیتر حلال استخراجی هگزان استفاده شد (پروانه، ۱۳۸۵). برای تعیین مقدار پروتئین کنجاله از روش کجلدال AACC 46-12 استفاده شد (AACC، ۱۹۹۹).

- آماده سازی کنسانتره پروتئین از کنجاله پنبه دانه

کنجاله پنبه دانه آسیاب و پس از غربال شدن با مش ۶۰ در آب مقطر با نسبت (w/v) ۱:۱۵ مخلوط شد و سپس با سود ۱ مولار pH آن روی عدد ۱۰/۵ تنظیم شد. مخلوط حاصل با دستگاه همزن مغناطیسی (IKA RH B2, Germany) به مدت دو ساعت با دور ۹۰ دور بردقیقه هم زده شد. سپس با گرانش ۸۰۰۰g برای ۱۵ دقیقه سانتریفوژ(Heidolph, Germany) شد. رسوب حاصل با آب مقطر (w/v ۱:۵) مخلوط وpH محلول روی عدد ۱۰/۵ تنظیم شد. سپس مطابق با مرحله قبلی سانتریفوژ گردید و محلول فوقانی نیز طی دو مرحله سانتریفوژ و به منظور ایجاد رسوب، pH آن با اسید کلریدریک ۱ مولار روی عدد ۴/۳ تنظیم شد. در ادامه، محلول فوقانی حاصل لیوفیلیزه شده و در ۲۰°C- نگهداری شد (Gao *et al.*, 2010). تمام آزمون‌های تنظیم pH با دستگاه pH متر دیجیتال (GLP, Barcelona, Spain) انجام شد.

[1] 1,1-Diphenyl-2-Picrylhyrazyl radical, 2,2-Dipheny l-1-(2,4,6-trinitrophenyl) Hydrazyl
[2] Trichloro Acetic Acid

- مراحل هیدرولیز پروتئین پنبه دانه

ابتدا یک محلول پروتئین با استفاده از هم زدن مداوم (IKA RH B2, Germany) تهیه شد و پس از تنظیم pH بهینه هر آنزیم، پروتئاز در غلظت‌های انتخابی افزوده شد و هیدرولیز در زمان‌ها و دماهای مورد نظر برای هر آنزیم در انکوباتورهای شیکردار (Heidolph, Germany) و در دما و pH ثابت انجام گرفت. در انتها واکنش آنزیمی در ۹۰°C پس از ۱۰ دقیقه متوقف شد. برای حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژکردن در ۸۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و محلول بالایی پس از جمع‌آوری با خشک‌کن انجمادی (FDB-5503, Korea)، خشک شد(Gao *et al.*, 2010).

- تعیین درجه هیدرولیز

برای تعیین درجه هیدرولیز نقطه بهینه، به حجمی برابر از محلول بالایی، تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰٪ اضافه گردید و سپس در دور ۶۷۰۰ g و دمای ۱۰°C به مدت ۲۰ دقیقه به منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪، سانتریفوژ گردید. درجه هیدرولیز بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید (Hoyle and Merritt, 1994).

$$\text{درجه هیدرولیز (٪)} = \frac{\text{میزان نیتروژن در } 10\%\ TCA}{\text{نمونه نیتروژن کل}} \times ۱۰۰$$

- اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH

برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه در غلظت‌های مختلف با ۵۰۰ میکرولیتر از اتانول ۹۹/۵٪ و ۲۵ میکرولیتر از DPPH ۰/۰۲٪ در اتانول ۹۹/۵٪ مخلوط شدند. مخلوط برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگهداری شد و احیاء رادیکال DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil, United Kingdom) ارزیابی گردید. فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به رابطه (۱) محاسبه شد. نمونه شاهد به طریق مشابه تهیه شد با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید (Bougatef *et al.*, 2009).

$$\%DPPH = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}$$ معادله (۱)

- آزمون قدرت احیاء کنندگی

برای این منظور، قدرت پروتئین هیدرولیزشده در احیای آهن III مورد ارزیابی قرار گرفت. در این آزمون، یک میلی‌لیتر از محلول هر کدام از نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (۶/۶ =pH) با ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول فری سیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط شدند. مخلوط حاصل در دمای ۵۰°C به مدت ۳۰ دقیقه گرمخانه‌گذاری گردید و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول(TCA w/v) ۱۰٪ به آن اضافه شد. مخلوط حاصل در گرانش ۱۶۵۰g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از محلول حاصل در فاز فوقانی محلول، با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر از محلول (w/v) ۰/۱٪ کلرید آهن مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش جذب محلول حاصل در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد (Bougatef *et al.*, 2009).

- فعالیت شلاته کنندگی

مقدار ۴/۷ میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده با ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن II و ۰/۲ میلی لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار مخلوط گردید و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس شدت جذب نور در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت گردید. در نمونه شاهد به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. فعالیت مهارکنندگی ازطریق رابطه‌ی (۲) به دست آمد (Hmidet *et al.*, 2011):

$$\text{درصد فعالیت شلاته‌کنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}$$ معادله (۲)

- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

معرف مورد نیاز برای تهیه ظرفیت آنتی اکسیدانی از انحلال ۰/۳۸۶ گرم سدیم دی هیدروژن فسفات و ۰/۴۹۴ گرم آمونیم مولیبدات در ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر حاصل شد. به محلول حاصل ۳/۲۶ میلی‌لیتر اسید سولفوریک غلیظ اضافه شد و سپس با آب مقطردر یک بالن ژوژه ۱۰۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد. برای انجام آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، به ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه ۱ میلی‌لیتر معرف اضافه کرده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۰°C گرمخانه‌گذاری شد و سپس شدت جذب نور توسط دستگاه

اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۹۵ نانومتر قرائت شد. نمونه‌ی شاهد شامل ۱ میلی لیتر نمونه و ۰/۱ میلی لیتر آب مقطر می‌باشد (Bougatef *et al.*, 2009).

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق به منظور دستیابی به شرایط بهینه فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌حاصل ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Design Expert نسخه ۱۰ طرح آزمایشی مربوط به متغیرهای مستقل تعیین شد. در این مطالعه، طرح مرکب مرکزی با سه متغیر مستقل شامل دما ($X_1{}^0C$)، نسبت آنزیم به سوبسترا ($X_2\%$) و زمان (X_3h) در سه سطح (۱+، ۰، ۱-) یک بلوک و شش تکرار در نقطه مرکزی طرح (جهت محاسبه تکرارپذیری فرآیند) مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). سپس در شرایط مذکور هیدرولیز انجام شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۲۴ و آزمون آنالیز واریانس ANOVA برای تحلیل کافی بودن مدل پاسخ سطح برازش شده برای توضیح کل تغییرات در دامنه مورد مطالعه، استفاده شده است.

جدول ۱- سطوح متغیرهای مستقل در طرح مرکب مرکزی

متغیرهای مستقل	سطوح		
	-۱	۰	۱
X_1 دما (°C)	۳۰	۳۵	۴۰
X_2 نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)	۰/۵	۱/۲۵	۲/۰
X_3 زمان (ساعت)	۲	۳/۵	۵/۰

تغییرات اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH (٪)، آزمون قدرت احیاء کنندگی، فعالیت شلاته‌کنندگی (٪) و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل(α-tocopherol mmol/ml) در برابر سه متغیر دما (°C)، نسبت آنزیم به سوبسترا (٪) و زمان (ساعت) با استفاده از یک مدل چند متغیره درجه دوم مطالعه گردید. مدل مذکور به صورت معادله زیر می باشد:

معادله (۳)

$$\gamma = \beta_0 + \sum_{i=1}^{K} \beta_i X_i + \sum_{i=1}^{k} \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i}^{K-1} \sum_{j}^{K} \beta_{ij} X_i X_j$$

در معادله (۳)، Y پاسخ پیش بینی شده، β_0 ضریب ثابت، β_1، β_2، β_3 (β_i) ضرایب خطی، β_{11}، β_{22}، β_{33} (β_{ii}) اثرات مربعی و β_{12}، β_{13} و β_{23} (β_{ij}) اثرات متقابل می‌باشند.

یافته‌ها

با توجه به نقاط تعریف شده در طرح RSM، آزمون‌های مربوطه انجام شد. در جدول ۲ نتایج آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی) ارائه شده است. در مرحله بعدی داده های به دست آمده از آزمون‌های مختلف توسط روش سطح پاسخ آنالیز گردید. ضرایب رگرسیونی تخمین زده شده و جدول تجزیه واریانس برای هر یک از پاسخ‌ها مطابق جداول ۳ و ۴ بود.

نتایج آزمون تعیین میزان پروتئین کنجاله پنبه دانه (با سه تکرار) نشان داد که میزان پروتئین آن ٪۴۷/۶۱ می‌باشد. نتیجه میانگین اندازه‌گیری چربی در این نمونه با سه تکرار آزمون ٪۰/۹۸ می‌باشد.

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات[1] به منظور پیش بینی مدل چند جمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ تعیین شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ۳) مدل‌های پیشنهادی زیر ارائه گردید:

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH = $83.26 + 15.12\ X_1 + 6.52\ X_2 + 5.58\ X_3 - 4.66\ X_1X_2 - 3.21\ X_1X_3 + 1.31\ X_2X_3 - 10.04\ X_1^2 + 0.36\ X_2^2 - 11.14\ X_3^2$

معادله (۴)

قدرت احیاء کنندگی = $0.1 + 0.035\ X_1 + 9.2\ X_2 + 0.015\ X_3 - 1.125\ X_1X_2 - 7.125\ X_1X_3 - 1.62\ X_2X_3 + 6.364\ X_1^2 + 0.043\ X_2^2 - 7.364\ X_3^2$

معادله (۵)

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل = $1.29 + 0.2\ X_1 + 0.075\ X_2 + 0.32\ X_3 - 0.18\ X_1X_2 - 0.21\ X_1X_3 - 0.18\ X_2X_3 - 0.021\ X_1^2 - 0.25\ X_2^2 + 0.095\ X_3^2$

معادله (۶)

[1] Least Square Method

جدول ۲- طرح مرکب مرکزی سه متغیر مستقل و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدولیز شده کنجاله پنبه دانه

Run	زمان (X_1) (h)	دما (X_2) (°C)	نسبت آنزیم به سوبسترا (X_3)	DPPH radical-scavenging assay (%)	Reducing power assay (A)	Total antioxidant capacity (α-tocopherol mmol/ml)	Metal-chelating activity (%)
۱	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۲/۰	۰/۱۰۶	۱/۴۵۵	۷۹/۷
۲	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۳/۵	۰/۰۹۴	۱/۲۰۲	۸۲/۳
۳	۵/۰۰	۴۰/۰	۰/۵۰	۷۸/۸	۰/۱۷۵	۰/۷۹۸	۴۰/۳
۴	۲/۰۰	۴۰/۰	۲/۰۰	۶۸/۲	۰/۱۲۳	۱/۰۷۸	۴۳/۰
۵	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۴/۸	۰/۱۰۰	۱/۳۶۹	۶۸/۶
۶	۵/۰۰	۳۰/۰	۰/۵۰	۷۵/۰	۰/۱۶۱	۰/۶۸۹	۵۲/۰
۷	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۴/۵	۰/۰۸۸	۱/۲۳۱	۷۵/۰
۸	۲/۰۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۶۶/۵	۰/۰۷۸	۰/۹۱۶	۷۰/۷
۹	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۶/۰	۰/۱۰۳	۱/۲۶۹	۷۳/۸
۱۰	۲/۰۰	۳۰/۰	۰/۵۰	۲۷/۲	۰/۰۷۵	۰/۷۹۶	۴۸/۱
۱۱	۳/۵۰	۳۵/۰	۲/۰۰	۷۶/۵	۰/۱۰۵	۱/۸۵۳	۷۶/۵
۱۲	۲/۰۰	۳۰/۰	۲/۰۰	۴۰/۵	۰/۱۲۰	۰/۹۹۸	۴۸/۱
۱۳	۵/۰۰	۴۰/۰	۲/۰۰	۸۴/۵	۰/۱۸۵	۰/۱۱۸	۶۵/۰
۱۴	۳/۵۰	۴۰/۰	۱/۲۵	۸۹/۵	۰/۱۷۸	۱/۱۶۹	۶۴/۹
۱۵	۵/۰۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۸۰/۲	۰/۱۲۱	۱/۶۸۸	۷۸/۶
۱۶	۳/۵۰	۳۰/۰	۱/۲۵	۷۸/۰	۰/۱۰۵	۰/۹۷۸	۷۷/۷
۱۷	۲/۰۰	۴۰/۰	۰/۵۰	۴۵/۰	۰/۰۷۷	۰/۹۵۳	۴۳/۹
۱۸	۳/۵۰	۳۵/۰	۱/۲۵	۷۸/۳	۰/۱۲۵	۱/۰۶۹	۸۰/۴
۱۹	۵/۰۰	۳۰/۰	۲/۰۰	۸۰/۱	۰/۱۸۵	۲/۳۹۳	۵۷/۱
۲۰	۳/۵۰	۳۵/۰	۰/۵۰	۶۸/۰	۰/۰۷۸	۰/۹۸۳	۶۳/۴

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی} = 78.52 + 3.92\ X_1 - 2.59\ X_2 + 4.20\ X_3 + 0.69\ X_1X_2 + 3.84\ X_1X_3 - 2.34\ X_2X_3 - 6.69\ X_1^2 - 10.04\ X_2^2 - 11.39\ X_3^2$$

معادله (۷)

نتایج حاصل از آزمون آماری ANOVA (جدول ۴) نشان داد که مدل چند جمله ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ با ضرایب مشخص می‌باشد. مقادیر ۰/۹۱، ۰/۸۳، ۰/۸۸ و ۰/۹۵ = R^2 بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ٪۹۵، ٪۸۸ ، ٪۸۳ و ٪۹۱ به ترتیب از کل تغییرات در دامنه مقادیر فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به مهار رادیکال‌های آزاد، قدرت احیاءکنندگی، فعالیت شلاته‌کنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل را توضیح دهد. نتایج نشان داده شده در جدول ۳ حاکی از آن است که اثرات خطی هر ۳ فاکتور، اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، اثرات مربع دما و زمان در آزمون مهار رادیکال‌های آزاد DPPH معنادار می‌باشد ($p<0.05$). در آزمون قدرت احیاءکنندگی اثرات خطی فاکتورهای دما و زمان و تنها اثر مربع نسبت آنزیم به سوبسترا معنادار می‌باشد ($p<0.05$) و اثرات متقابل هیچکدام بر قدرت احیاءکنندگی معناداری نبوده است. در ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مطابق با جدول ۳، اثرات خطی دما و زمان، اثر متقابل نسبت آنزیم به سوبسترا و دما معنادار بوده است ($p<0.05$). در بررسی فعالیت شلاته کنندگی اثرات خطی تنها دو فاکتور زمان و دما بر فعالیت شلاته کنندگی معنادار می باشد ($p<0.05$) و اثرات متقابل و درجه دوم بر فعالیت شلاته کنندگی معنادار نمی‌باشد.

جدول ۳- جدول تجزیه و تحلیل واریانس(ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ

	DPPH radical-scavenging assay (%)					Reducing power (A)					Total antioxidant capacity (α-tocopherol mmol/ml)					Metal-chelating activity (%)				
source	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of square	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value	Sum of Squares	df	Mean Square	p-value	F-value
Model	٥٠٤٢/٧٢	٩	٥٦٠/٣٠	٠/٠٠٠	٢٤/٨٧	٠/٠٢٤	٩	٢/٦٣٨	٠/٠٠١	٨/١٥	٢/٥٧	٩	٠/٢٩	٠/٠٠٦	٥/٦٤	٣٤٨٥/٧	٩	٣٨٧/٣١	٠/٠٠٠٢	١٢/٦٣
X_1	٢٢٨٦/١٤	١	٢٢٨٦/١٤	٠/٠٠٠	١٠١/٤٦	٠/٠١٣	١	٠/٠١٣	٠/٠٠٠١	٣٨/٧٢	٠/٣٨	١	٠/٣٨	٠/٠٢٠	٧/٥٢	١٥٣/٦٦	١	١٥٣/٦٦	٠/٠٤٩	٥/٠١
X_2	٤٢٥/١٠	١	٤٢٥/١٠	٠/٠٠١٥	١٨/٨٧	٨/٤٦	١	٨/٤٦٤	٠/١٣٦٩	٢/٦٢	٠/٠٥٦	١	٠/٠٥٦	٠/٣١٩	١/١٠	٦٧/٠٨	١	٦٧/٠٨	٠/١٧٠	٢/١٩
X_3	٣١١/٣٦	١	٣١١/٣٦	٠/٠٠٤٠	١٣/٨٢	٢/٣١٠	١	٢/٣١٠	٠/٠٢٣٤	٧/١٤	١/٠٣	١	١/٠٣	٠/٠٠١	٢٠/٣٣	١٧٦/٤٠	١	١٧٦/٤٠	٠/٠٣٧	٥/٧٥
X_1X_2	١٧٣/٩١	١	١٧٣/٩١	٠/٠١٩٥	٧/٧٢	١/٠١٢	١	١/٠١٢	٠/٨٦٣١	٠/٠٣١	٠/٢٥	١	٠/٢٥	٠/٠٥١	٤/٩١	٣/٧٨	١	٣/٧٨	٠/٧٣٢	٠/١٢
X_1X_3	٨٢/٥٦	١	٨٢/٥٦	٠/٠٨٤٦	٣/٦٦	٤/٠٦١	١	٤/٠٦١	٠/٢٨٨٨	١/٢٥	٠/٣٦	١	٠/٣٦	٠/٠٢٤	٧/٠٢	١١٧/٨١	١	١١٧/٨١	٠/٠٧٨	٣/٨٤
X_2X_3	١٣/٧٨	١	١٣/٧٨	٠/٤٥٢٣	٠/٦١	٢/١١٢	١	٢/١١٢	٠/٨٠٣٥	٠/٠٦٥	٠/٢٦	١	٠/٢٦	٠/٠٤٥	٥/١٩	٤٣/٧١	١	٤٣/٧١	٠/٢٦٠	١/٤٣
X_1^2	٢٧٧/١٣	١	٢٧٧/١٣	٠/٠٠٥٧	١٢/٣٠	١/١١٤	١	١/١١٤	٠/٩٥٤٤	٣/٤٤	١/٢٣٩	١	١/٢٣٩	٠/٨٧٨	٠/٠٢٤	١٢٣/١١	١	١٢٣/١١	٠/٠٧٣	٤/٠١
X_2^2	٠/٣٦	١	٠/٣٦	٠/٩٠٢٠	٠/٠١٦	٤/٩٩٩	١	٤/٩٩٩	٠/٠٠٢٨	١٥/٤٥	٠/١٧	١	٠/١٧	٠/٠٩٥	٣/٣٨	٢٧٧/٢٥	١	٢٧٧/٢٥	٠/١٣٢	٩/٠٤
X_3^2	٣٤١/١٩	١	٣٤١/١٩	٠/٠٠٣٠	١٥/١٤	١/٤٩١	١	١/٤٩١	٠/٥١٢٧	٠/٤٦	٠/٠٢٥	١	٠/٠٢٥	٠/٠٥٠	٠/٤٩	٣٥٦/٨٢	١	٣٥٦/٨٢	٠/٠٠٦	١١/٦٣
Residual	٢٢٥/٣٢	١٠	٢٢/٥٣			٣/٢٣٧	١٠	٣/٢٣٧			٠/٥١	١٠	٠/٠٥١			٣٠٦/٧	١٠	٣٠/٦٧		
Lack of Fit	١٨٧/٨٥	٥	٣٥/٥٧	٠/٠٥٠٧	٥/٠١	٢/٤٢٩	٥	٤/٨٥٩	٠/١٢٦٠	٣/٠١	٠/٤٢	٥	٠/٠٨٣	٠/٠٥٩	٤/٦١	١٧٥/٧٦	٥	٣٥/١٥	٠/٣٧٧	١/٣٤
Pure Error	٣٧/٤٧	٥	٧/٤٩			٨/٠٧٣	٥	١/٦١٥			٠/٠٩	٥	٠/٠١٨			١٣٠/٩٣	٥	٢٦/١٩		
Core Total	٥٢٦٧/٠٤	١٩				٠/٠٢٧	١٩				٣/٠٨	١٩				٣٧٩٢/٤٩				

جدول ٤-نتایج ضرایب رگرسیون و آنالیز واریانس برای چهار متغیر پاسخ

ضریب	پاسخ			
	DPPH radical-scavenging assay (%)	Reducing power assay (A)	Total antioxidant capacity (α-tocopherol mmol/ml)	Metal-chelating activity (%)
β_0	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۱	۰/۰۰۶	۰/۰۰۰۲
β_1	۰/۰۰۰۰	۰/۰۰۰۱	۰/۰۲۰	۰/۰۴۹
β_2	۰/۰۰۱۵	۰/۱۳۶۹	۰/۳۱۹	۰/۱۷۰
β_3	۰/۰۰۴۰	۰/۰۲۳۴	۰/۰۰۱	۰/۰۳۷
β_{11}	۰/۰۱۹۵	۰/۸۶۳۱	۰/۰۵۱	۰/۷۳۲
β_{22}	۰/۰۸۴۶	۰/۲۸۸۸	۰/۰۲۴	۰/۰۷۸
β_{33}	۰/۴۵۲۳	۰/۸۰۳۵	۰/۰۴۵	۰/۲۶۰
β_{12}	۰/۰۰۵۷	۰/۹۵۴۴	۰/۸۷۸	۰/۰۷۳
β_{13}	۰/۹۰۲۰	۰/۰۰۲۸	۰/۰۹۵	۰/۱۳۲
β_{23}	۰/۰۰۳۰	۰/۵۱۲۷	۰/۰۵۰	۰/۰۰۶
R^2	۰/۹۵	۰/۸۸	۰/۸۳	۰/۹۱
R^2_{adj}	۰/۹۱	۰/۷۷	۰/۶۸	۰/۸۴

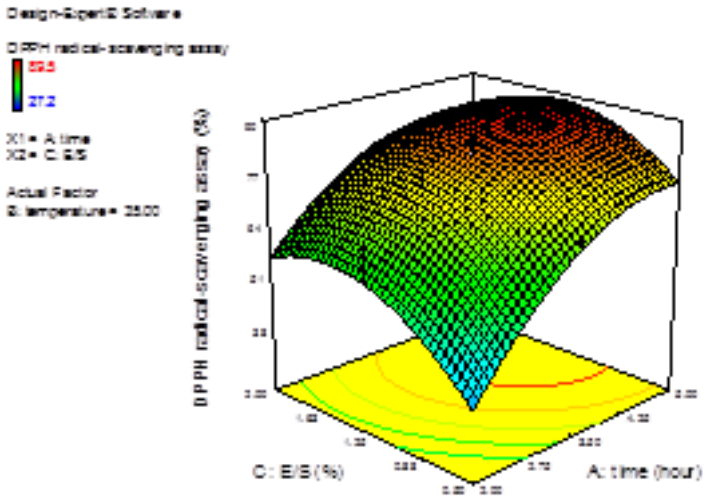
به منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی جهت حصول بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، نمودارهای سه بعدی برای متغیرها در شکل‌های ۱ تا ۱۲ ارائه شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می‌دهند که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه اش ثابت نگه داشته شده است. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ابتدا مهار رادیکال آزاد DPPH روند افزایش و سپس به مقدار ثابتی می‌رسد (شکل ۱). همان طور که در شکل (۲ و ۳) مشخص است با افزایش دما، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد و با افزایش زمان، تا میزان مشخصی ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد. با توجه به جدول ۲ مشاهده می شود آزمایشات ۱، ۲، ۵، ۷ ، ۹ و ۱۸ با زمان ۳/۵ ساعت، دمای ۳۵ درجه سانتی گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ٪۱/۲۵ بیشترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد ا به خود اختصاص داده اند. با توجه به شکل‌های ۴ و ۵ و ۶ قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پنبه دانه با افزایش دما ابتدا روند کاهشی و سپس روند افزایشی داشته است و با افزایش زمان، قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا قدرت احیاء کنندگی روند افزایشی داشته است. جدول۲ نیز نشان می‌دهد که در آزمایش ۱۹ ما بیشترین قدرت احیاء کنندگی (۰/۱۸۵) را در شرایط دمایی $^{\circ}C$ ۳۰، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ٪۲ داریم. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با افزایش دما افزایش می‌یابد تا به یک مقدار ثابتی می‌رسد و با افزایش زمان افزایش می‌یابد و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل روند افزایشی داشته است (شکل‌های ۷ ، ۸ و ۹). در آزمایش ۱۹ همچنین بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر طبق جدول ۲ در شرایط دمایی $^{\circ}C$ ۳۰، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ٪۲ مشاهده می‌شود. همان طور که در شکل‌های ۱۰، ۱۱ و ۱۲ مشاهده می‌شود شلاته کنندگی با افزایش دما ابتدا روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است و با افزاش زمان شلاته کنندگی افزایش می‌یابد تا به مقدار ثابتی می‌رسد و با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا ابتدا روند افزایشی و سپس روند کاهشی داشته است همان طور که از جدول ۲ مشخص است در آزمایشات ۱، ۲، ۵، ۷ ، ۹ و ۱۸ با زمان ۳/۵ ساعت، دمای $^{\circ}C$ ۳۵ و نسبت آنزیم به سوبسترا ٪۱/۲۵ بیشترین شلاته کنندگی مشاهده می‌شود.

اثر زمان بر میزان درجه هیرولیز در شکل ۱۳ نشان داده شده است. عامل زمان اثر معناداری بر میزان درجه هیدرولیز داشته است ($p<0.05$). با مقایسه تیمارهای مختلف مشخص شد که بین آنها اختلاف معنی داری وجود دارد. به صورت کلی با افزایش زمان هیدرولیز، میزان

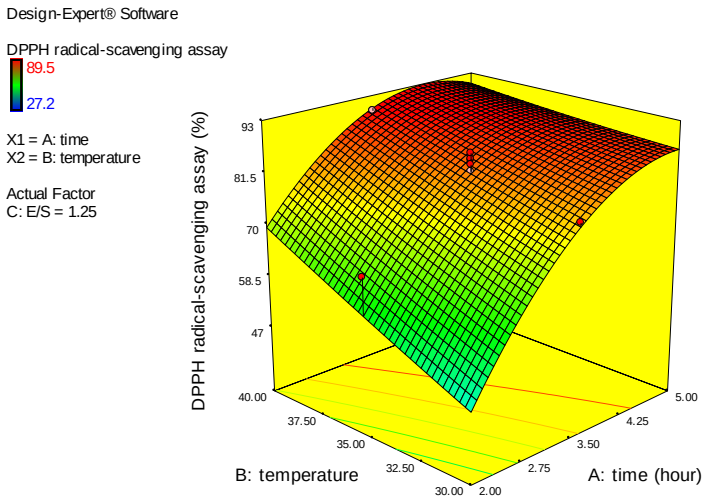
هیدرولیز افزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در زمان ۵ ساعت به دست آمد.

بحث

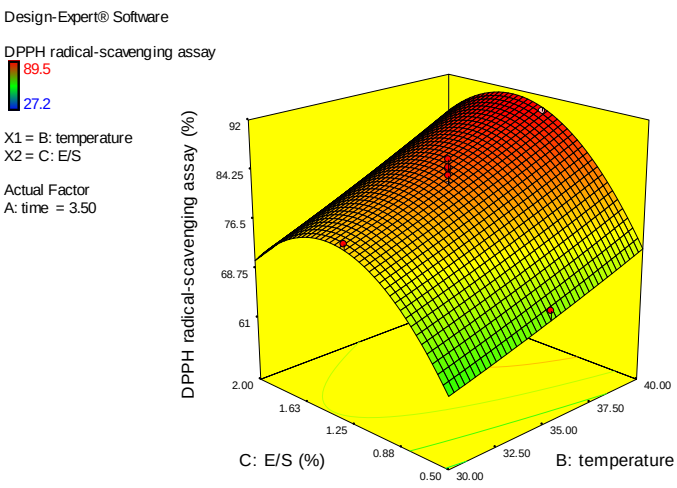
امروزه استفاده از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی به دلیل خطراتی که برای سلامتی انسان دارند، با محدودیت‌هایی مواجه است. بر این اساس استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی نسبت به محصولات سنتزی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. نتایج این تحقیق نشان داد که فرایند تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پنبه دانه با فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت موثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از متغیرهای دما، زمان و نسبت آنزیم تاثیر کاملا معنی‌داری بر کیفیت محصول دارند. نتایج مطالعه Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۱۱)، نشان داد که پپتیدهای زیست فعال تولید شده در جریان هیدرولیز پروتئین‌ها دارای اثرات ضداکسایش هستند. به منظور تولید پپتیدهای ضداکسایش، آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره



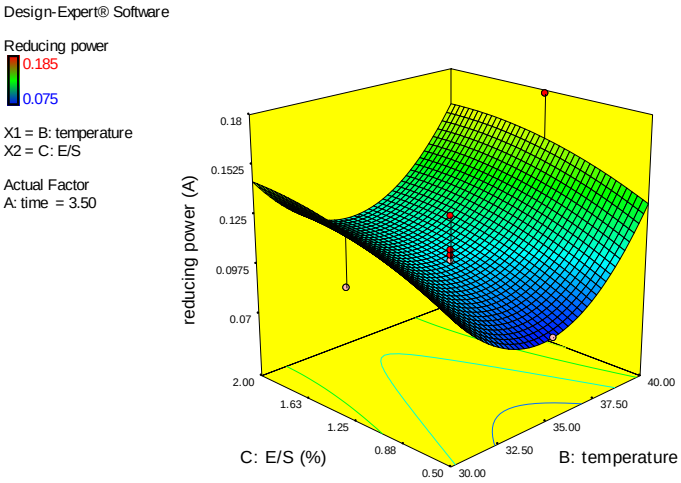
شکل ۱- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH



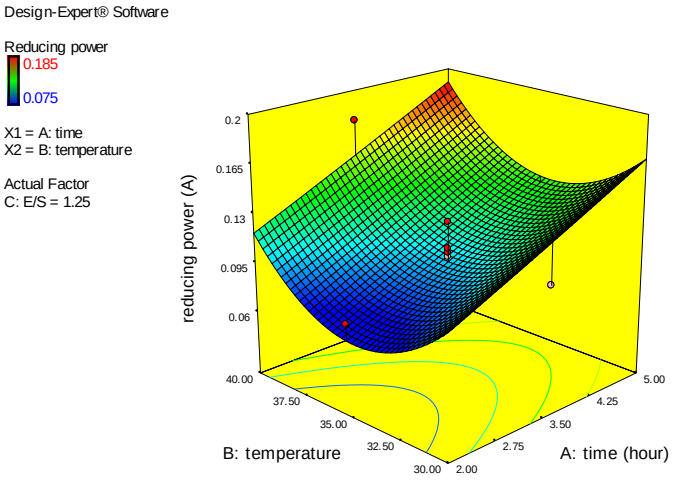
شکل ۲- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(زمان و دما) بر تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH



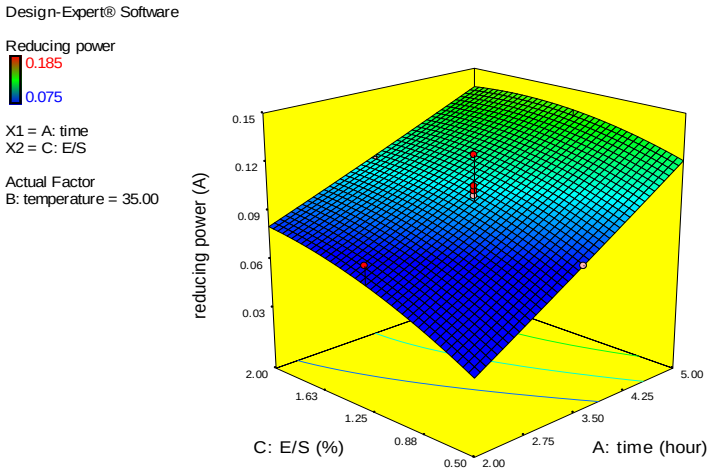
شکل ۳-نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (و دما و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH



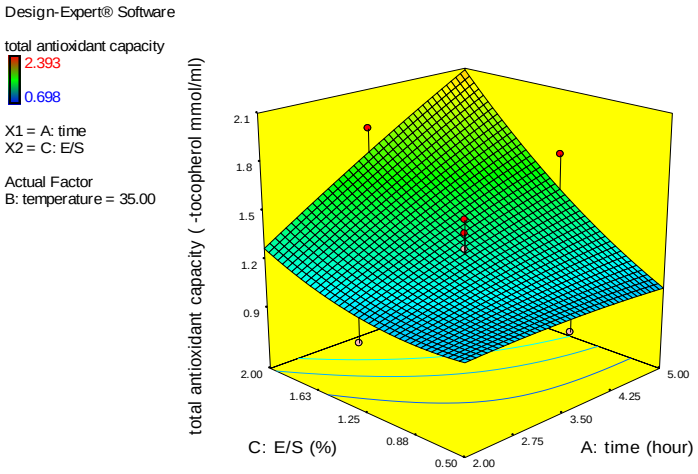
شکل ٤-نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (دما و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



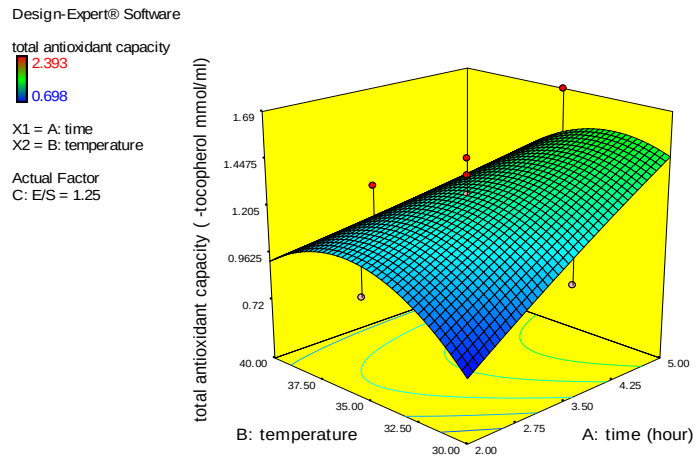
شکل ٥-نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



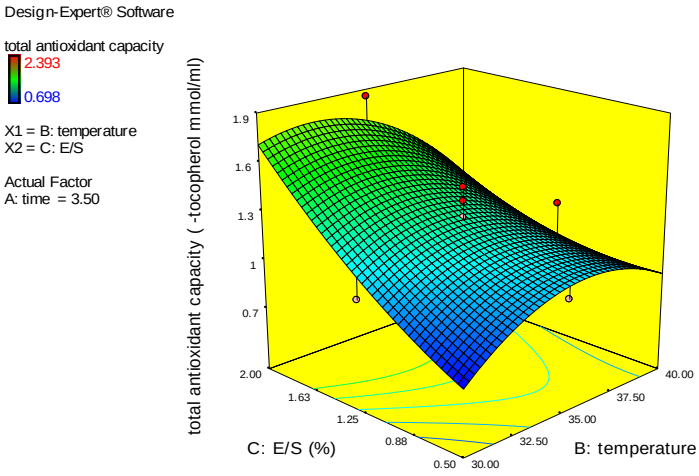
شکل ٦-نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان ونسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات قدرت احیاء کنندگی



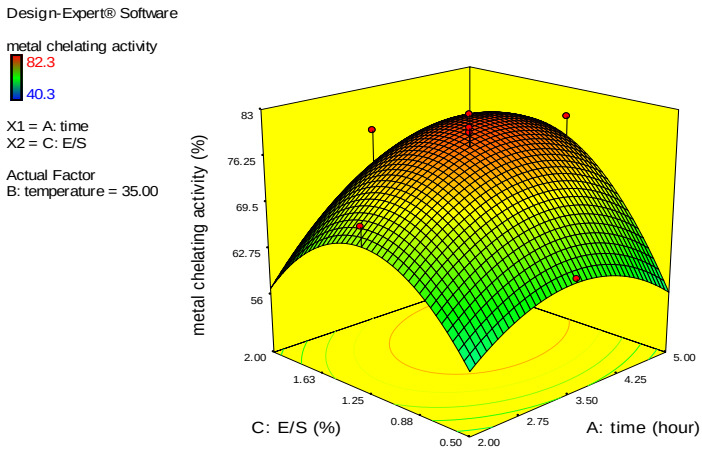
شکل ۷-نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل



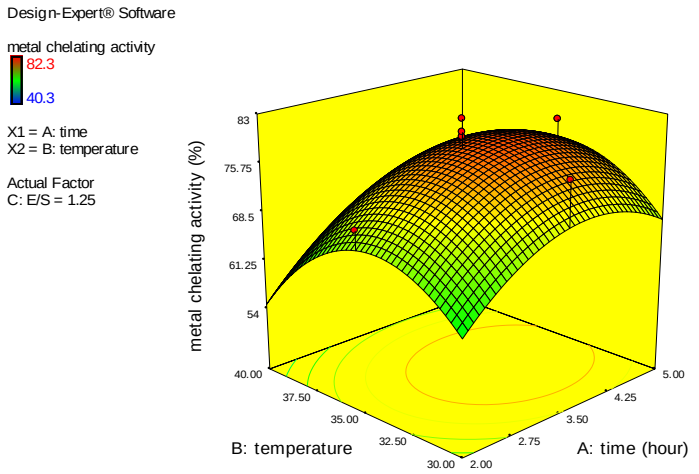
شکل۸- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل (زمان و دما) بر تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل



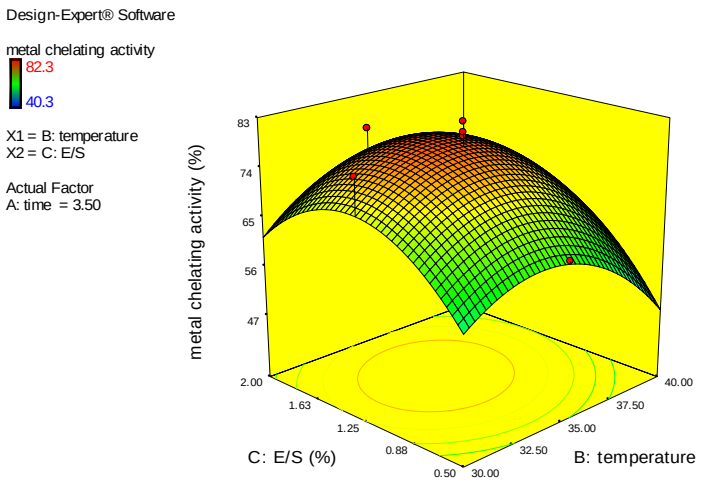
شکل ۹- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(دما و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل



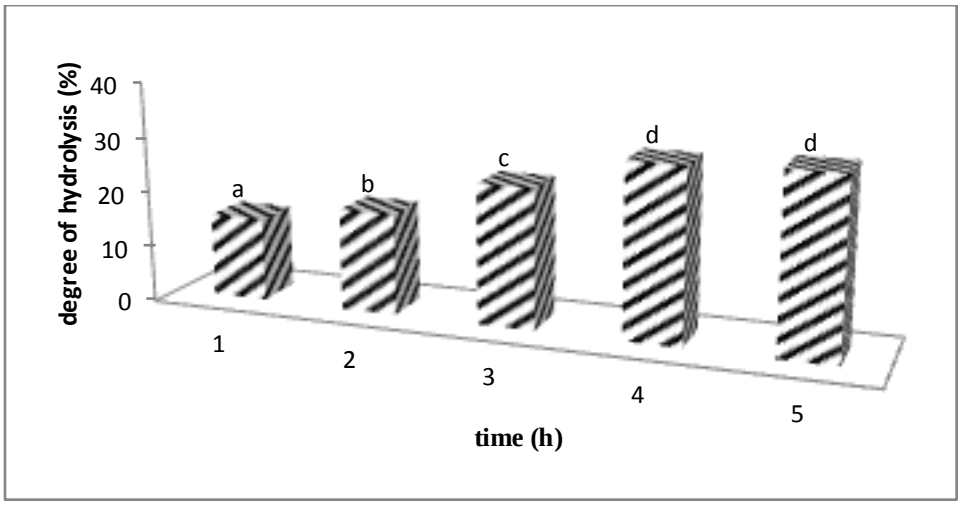
شکل ۱۰- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) بر تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی



شکل ۱۱- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(زمان و دما) بر تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی



شکل ۱۲- نمودار سطح پاسخ نشان دهنده تأثیر متغیرهای مستقل(دما) و نسبت آنزیم به سوبسترا بر تغییرات فعالیت شلاته‌کنندگی



شکل ۱۳- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده پنبه دانه در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۷۵٪ و دمای ۳۱/۱ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های مختلف

پروتئینی باشد. متغیرهای مستقل هیدرولیز تاثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی موثرند. مکانیزم عمل پپتیدهای ضد اکسایش هنوز به درستی مشخص نشده است، اما این اثر احتمالا به علت مهار کردن یون‌های فلزی، باند کردن رادیکال‌ها و مهار گونه های فعال اکسیژن می‌باشد و قدرت ضد اکسایشی پپتیدهای زیست فعال نتیجه اثر مشارکتیاین مکانیزم‌هاست (Erdmann *et al.*, 2008) البته توجیه تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی با گذشت زمان تحت تاثیر تغییر طول زنجیره های پپتیدی حاصل با افزایش هیدرولیز می‌باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (Rajapakse *et al.*, 2005). به دلیل ایجاد پپتیدها با اندازه‌های مولکولی مختلف در هر تیمار زمانی، فعالیت شلاته کنندگی متفاوت خواهد بود (Je *et al.*, 2009). Gimenez و همکاران (۲۰۰۹) گزارش نموده اند که گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و اسیدهای آمینه بازی (آرژنین، هیستیدین و لایزین) در مهار یون‌های فلزی نقش اصلی را ایفا می نماید از این‌رو می‌توان این گونه استنباط نمود که در زمان هیدرولیز بیشترین میزان این اسیدهای آمینه در دسترس می‌باشند و

به همین دلیل بالاترین میزان مهار کنندگی یون‌های آهن به‌دست آمده است. از خاصیت مهار کنندگی رادیکال DPPH برای بررسی قابلیت هیدروژن‌دهندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده می‌شود. حذف رادیکال آزاد مکانیزمی است که توسط آن ترکیبات ضد اکسایش قادر هستند از واکنش‌های اکسایشی جلوگیری نمایند. رادیکال DPPH یکی از معدود رادیکال‌های پایدار در دمای اتاق است. زمانی که این ترکیب در مجاورت یک ترکیب هیدروژن دهنده مانند یک ضد اکساینده قرار گیرد، یک هیدروژن پذیرفته، به ترکیبی پایدار تبدیل شده و در نتیجه مهار رادیکال، تغییر رنگ محسوس از بنفش به زرد و کاهش میزان جذب در ۵۱۷ نانومتر مشاهده می‌گردد (طاهری و همکاران، ۱۳۹۱). اعتقاد بر این است که نوع ماده اولیه، اختصاصی بودن آنزیم، شرایط هیدرولیز و اندازه، میزان و ساختار اسیدهای آمینه و پپتیدهای تولیدی از فاکتورهای موثر بر فعالیت ضد اکسایش به شمار می‌روند (مهرگان و همکاران، ۱۳۹۲). آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان آمینواسیدهای آب گریز مانند لوسین و آمینواسیدهای آروماتیک مانند فنیل آلانین، 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. (Sun *et al.*, 2011). در تحقیقی دیگری توسط Cumby و همکاران (۲۰۰۸) بر پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین کلزا آنزیم‌های آلکالاز، یک اندوپپتیداز و فلیورزایم[1] با فعالیت اندو و اگزو پپتیدازی جهت هیدرولیز، مورد استفاده قرار گرفتند. هیدرولیز شده‌های حاصل در سیستم‌های مدل به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های موثر به ویژه با مهار رادیکال‌های آزاد و عمل به عنوان عامل احیاء کننده عمل نمودند. این اثر وابسته به غلظت و نیز تحت تاثیر نوع آنزیم به‌کار رفته در تولید پروتئین هیدرولیز شده بود. هیدرولیز شده‌ی حاصل از آنزیم فلیورزایم بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در بین تمامی نمونه ها از خود نشان داد. در تحقیق انجام شده توسط Kamau و Lu (۲۰۱۱) بر هیدرولیز کنسانتره پروتئین آب پنیر توسط تریپسین، افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا از ۱ تا ۳٪ تاثیر معناداری بر افزایش خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نداشت. طبق گزارش این محققین دما، pH و غلظت سوبسترا از عوامل تاثیرگذار بر درجه هیدرولیز و قدرت مهار رادیکال DPPH هستند. در سال ۲۰۱۲، Wiriyaphan و همکاران گزارش کردند که در نتیجه هیدرولیز آنزیمی ضایعات سوریمی توسط آلکالاز، پپسین و تریپسین پپتیدهای تولید شده توسط آنزیم پپسین با درجه هیدرولیز ۵٪ بیشترین قابلیت ضد اکسایشی رابه خود اختصاص دادند. تحقیقات مختلف نشان داده است که همواره رابطه مستقیمی بین فعالیت‌های ضد اکسایش و قدرت احیاء کنندگی ترکیبات زیست فعال وجود دارد برای بررسی قدرت احیاءکنندگی، وجود ترکیبات کاهنده مانند ضداکساینده‌ها منجر به کاهش کمپلکس فری سیانید به فرم فروس می‌گردد (Bougatef *et al.*, 2009). پایین بودن خاصیت ضد اکسایشی نمونه-های هیدرولیز شده در زمان‌های اولیه را می‌توان به فرصت ناکافی آنزیم برای اثرگذاری بر سوبسترا و تولید پپتیدهای با قابلیت ضداکسایش نسبت داد. با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدی بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد توسط پپتیدها افزوده می‌شود.

در تحقیقی که توسط پیری و همکاران در سال ۱۳۹۳ منتشر شد، برای دستیابی به بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پروتئین آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز با کاربرد نرم افزار سطح پاسخ، محدوده متغیرها شامل ۵۵-۴۳ °C، زمان ۱۷۳-۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۹۰-۴۰ (واحد آنسون/کیلوگرم پروتئین) در نظر گرفته شد. شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژن به ترتیب دمای °C ۴۹/۰۲ و °C ۴۷/۵۶، زمان ۱۷۴/۲۸ و ۱۷۴/۵۱ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۹۰ و ۸۷/۸۴ (واحد آنسون/ کیلوگرم پروتئین) به دست آمد. شرایط بهینه برای فعالیت آنتی اکسیدانی محصول هیدرولیز شده دمای °C ۴۴/۹، زمان ۱۱۳/۷۲ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۷۳/۸۴ (واحد آنسون /کیلوگرم پروتئین) حاصل گردید. تحت هر یک از این شرایط میزان درجه هیدورلیز، بازیافت نیتروژن و فعالیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۴۱/۵۷٪، ۷۰/۴۱٪ و ۶۰/۶۶٪ به دست آمدند. مهرگان نیکو و همکاران در سال ۱۳۹۲ اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم به عنوان سه متغیر مستقل در هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال آزاد

[1] Flavourzyme

DPPH توسط معادله درجه دوم برازش گردیدند. شرایط بهینه با بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (بالاتر از ٪۵۸/۲۲) در دمای $^{\circ}C$ ۴۸/۱۱۵، زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه و فعالیت آنزیمی ۶۴/۴۳ واحد انسون بر کیلوگرم بود.

افزایش میزان هیدرولیز از زمان ۱ ساعت تا ۴ ساعت شدت بیشتری داشت ولی در زمان‌های بالاتر از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته شد. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) علت این وضعیت را چنین توجیه نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش می‌یابد، همچنین از میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم کاسته می‌شود که در مجموع موجب کاهش شدت هیدرولیز می شود. از طرف دیگر شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به اینکه کنجاله پنبه دانه حاصل از فرآیند روغن کشی، دارای تقریبا ٪۵۰-۴۵ پروتئین است، می‌تواند منبع پروتئینی مناسب برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد. نتایج نشان داد که روش سطح پاسخ می تواند به عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گیرد. در این تحقیق شرایط بهینه هیدرولیز پروتئین پنبه دانه با استفاده از آنزیم پپسین با روش سطح پاسخ توسط نرم افزار Design Expert ارزیابی شد. شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیز شده با حداکثر میزان فعالیت بهینه مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاءکنندگی، شلاته‌کنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، دمای $^{\circ}C$ ۳۱/۱، زمان ۵ ساعت و نسبت آنزیم به سوبسترا ٪۱/۷۵ تعیین گردید و تحت این شرایط میزان مهار رادیکال آزاد ٪۸۳ ، قدرت احیاء کنندگی ۰/۱۵۸ انگستروم، شلاته کنندگی ٪۷۰ و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ۱/۹۹ میلی‌مول آلفاتوکوفرول بر میلی‌لیتر به دست آمد که در مقایسه با پروتئین هیدرولیز شده حاصل از سایر مواد گزارش شده در متون، از مقادیر قابل توجهی برخوردار می‌باشد. عمل هیدرولیز در شرایط بهینه ارائه شده توسط مدل در سه تکرار انجام گردید و نتیجه با مقدار پیش بینی شده توسط آن مقایسه گردید، که نتایج حاصل از آزمایشات انجام شده در این شرایط برای میزان مهار رادیکال‌های آزاد۵ ± ٪۸۱، قدرت احیاء کنندگی ۰/۰۲۶ ± ۰/۱۶۰، شلاته کنندگی ۳/۵±۶۸، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۰/۱۵ ±۱/۹۵ میلی‌مول آلفا توکوفرول بر میلی‌لیتر و میزان درجه هیدرولیز در این شرایط ٪۳۱/۷۵ بود. این نتایج نشان می‌دهد که مدل توانسته تا حدود زیادی اثر ۳ متغیر دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را آزمون‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دهد. به طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین پنبه دانه می‌تواند به عنوان منبع آنتی اکسیدانی در فرمولاسیون مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

پروانه، و. (۱۳۸۵). کنترل کیفیت و آزمون‌های شیمیایی مواد غذایی. انتشارات دانشگاه تهران، ص ۳۳۲.

پیری، ش.، صادقی ماهونک، ع.ر.، قربانی، م. و اعلمی، م. (۱۳۹۳). بهینه سازی شرایط هیدرولیز پروتئین آب پنیر جهت حصول به حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی با استفاده از روش سطح پاسخ. پایان‌نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

طاهری، ع.، جلالی نژاد، س. و علی انوار، س.ا. (۱۳۹۱). خواص ضد فشار خون و ضداکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، دوره ۹، شماره ۱، صفحات ۶۰۸-۵۹۹.

کوشکی، م.ر. خوشگذران آبرس، ص.، عزیزی، م.ح.، بلقیسی، س. و نجفی، م. ع. (۱۳۹۰). بررسی و ارائه روشی مناسب جهت تولید کنسانتره پروتئینی پنبه دانه برای مصرف انسان. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، دوره ۸، شماره ۲۸.

مهرگان نیکو، ع.، صادقی ماهونک ، ع.ر.، قربانی، م.، طاهری، ع. و اعلمی، م. (۱۳۹۲). بهینه‌سازی عوامل موثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، دوره ۵، شماره ۱، صفحات ۱۱۰-۹۵.

AACC. (1999). Approved method of the American Association of Cereal Chemists. St. Paul: American Accosiation of Cereal Chemists. Ins.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical –scavenging

activities of smooth hound (Mustelusmustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal protease. Food chemistry, 114, 1198-1205.

Cho, M. J., Unklesbay, N., Fu-Hung, H. D. & Clarke, A. (2004). Hydrophobicity of bitter peptides from soy protein hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52, 5895-5901.

Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water holding capacity of canola protein hydrolysates. Food chemistry, 109, 144-149.

Erdmann, K., Cheung, W. Y. B. & Schröder, H. (2008). The possible roles of food-derived bioactive peptides in reducing the risk of cardiovascular disease. Journalof Nutrition and Biochemistry, 19, 643-654.

Gao, D., Chang, T., Li, H. & Cao, Y. (2010). Angiotensin I-converting enzyme inhibitor derived from cottonseed protein hydrolysate. African Journal of Biotechnology, 9, 8977-8983.

Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P. & Gomez-Guillé, M. C. (2009). Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chemistry, 114, 976-983.

Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A. & Nasri, M. (2011). Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*sepia officinalis*) muscle proteins hydrolysed by Bacillus mojavensis A21 proteases. Food Research International, 44, 2703-2711.

Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T. & Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: Thecarcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. Food and Chemical Toxicology, 24, 1099–1102.

Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. & Ahn, H. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42, 1266-1272.

Kamau, K., Therakulkait, C. & Cadwallader, K. (2009). Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolysed rice bran protein concentrate. Journal of Cereal Science, 50, 56-60.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W. & Liu, J. (2008). Antioxidant and free radicalscavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry, 106, 444-450.

Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (A cipenser persicus) viscera. Journal of Food Chemistry, 115, 238–242.

Rajapakse, N., Yung, W. K., Mendis, E., Moon, S. H. & Kim, S. K. (2005). A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysate inhibits factor XIIa and platelet aggregation. Life Science, 76, 2607-2619.

Samaranayaka, G. P. A. & Li-Chan, C. Y. E. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A reviewof their production, assessment, and potential applications. Journal of Functional Foods, 3, 229-254.

Sarmadi, B. H. & Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides, 31, 1949-1956.

Silva, V. S. &Malcata, F. X. (2004). Caseins as source of bioactive peptides. *International Dairy Science*, 15,1-15.

Sun, Q., Shen, H. & Leu, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions drived from porcine hemoglobin. Journal of Food Science and Technology, 21, 6646-6652.

Takenaka, A., Annaka, H., Kimura, Y., Aoki, H. & Igarashi, K. (2003). Reduction of paraquat-induced oxidative stress in rats by dietary soy peptide. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 67, 278-283.

Wiriyaphan, C., Chitsomboon, B. & Yonsawadigul, J. (2012). Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chemistry, 132, 104-111.