بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه (Citrullus lanatus) با ارزیابی فعالیت چلات کنندگی با استفاده از روش سطح پاسخ

احمد پدرام نیا*[1]، سید علی مرتضوی[1] ، علیرضا صادقی ماهونک[2] ، امیرحسین الهامی راد[1] ، محمد آرمین[3]

۱-گروه علوم و صنایع غذایی،واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی، سبزوار،ایران

۲. گروه علوم و صنایع غذایی ،دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان ، گرگان ،ایران

۳. گروه کشاورزی، واحد سبزوار، دانشگاه آزاد اسلامی ، سبزوار،ایران

تاریخ دریافت:۹۵/۰۵/۰۱ تاریخ پذیرش:۹۵/۱۰/۰۵

چکیده

هدف از انجام این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه (Citrullus lanatus) با بیشترین فعالیت چلات کنندگی بود. دانه هندوانه محصولی سرشار از چربی و پروتئین میباشد. هیدرولیز پروتئین های دانه هندوانه میتواند به بهبود خواص عملکردی آن منجر شود. در این تحقیق شرایط هیدرولیز بهینه پروتئین های دانه هندوانه بوسیله دو آنزیم آلکالاز و پپسین با استفاده از روش سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه با استفاده از هیدرولیز آنزیمی ، به وسیله آنزیم های آلکالاز و پپسین تهیه گردید و پارامترهای موثر در هیدرولیز به منظور دست یابی به بالاترین فعالیت چلات کنندگی پپتیدها به وسیله روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی بهینه سازی شد.اثرات ترکیبی نوع آنزیم ، فعالیت آنزیم و زمان آنزیم زنی به عنوان سه متغیر مستقل در هیدرولیز ، بر قابلیت چلات کنندگی توسط معادله درجه دوم برازش گردید. نتایج برازش مدل نشان داد که بالاترین فعالیت چلات کنندگی با ۷۸/۰۸ درصد منطبق باآنزیم آلکالاز ، فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین و زمان ۱۱۶/۲۲ دقیقه بود. نتایج نشان می دهد که پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه دارای قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی بعنوان چلات کننده و نیز کاربردهای دارویی می باشد.

واژه های کلیدی : پروتئین هیدرولیز شده، دانه هندوانه ، فعالیت چلات کنندگی ،روش سطح پاسخ

* مسول مکاتبه : ahmadpedram@yahoo.com

۱-مقدمه

دانه هندوانه منبعی بسیار غنی از چربی و پروتئین می باشند، به لحاظ غنی بودن از پروتئین ، دانه هندوانه می تواند بعنوان یک منبع پروتئینی در فرمولاسیون انواع مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. علی رغم وجود تکنولوژی پوست گیری از دانه ها ، فقط بخش ناچیزی از این محصولات کشاورزی بصورت تجاری فرآیند و مورد مصرف قرار می گیرد ، حال آنکه دفع بقایای ناشی از آنها موجب مشکلاتی می گردد. پروتئین و چربی در مجموع سه چهارم از وزن دانه ها را تشکیل می دهند و بدین ترتیب دانه هندوانه در زیر گروه دانه های روغنی تقسیم بندی می شود ، ولی کمتر بعنوان دانه روغنی مورد توجه واقع شده است. در برخی نقاط جهان مثل نیجریه و کشورهای آسیای میانه دانه هندوانه به منظور استخراج روغن طباخی مورد استفاده قرار می گیرد ، در حالیکه در بیشتر کشورها کاربرد آن منحصر به مقاصد افزودنی می باشد. دانه هندوانه به عنوان یک چاشنی ، قوام دهنده در سوپ ، طعم دهنده ، و نیز به عنوان میان وعده در بیشتر نقاط جهان بکار برده می شود(۱۰و۸). پژوهش ها نشان داده است که پروتئین های دانه هندوانه قابلیت هضم آزمایشگاهی خوبی را به همراه کمترین فاکتورهای ضد تغذیه ای به نمایش گذاشته اند . همچنین این دانه ها حاوی مقادیری مناسب از املاح و نیز واجد ویژگی های عملکردی خوبی میباشند. ترکیب اسیدهای آمینه با مقادیر بالای آرژنین حاکی از دارا بودن فواید دارویی و سلامت بخش آن میباشد(۱۳). دانه های هندوانه در کنار فراوان ترین دانه های روغنی مثل دانه سویا ، کلزا ، پنبه دانه ، بادام زمینی ، و دانه های آفتاب گردان واجد پتانسیل بالایی از منابع پروتئین می باشند.پروتئین های اصلی دانه هندوانه ترکیبی از گلوبولین های محلول در نمک ، همراه با آلبومین و گلوتنین می باشد(۲۸). دانه های هندوانه بعنوان ماده خام برای تولید محصولات پروتئینی با کیفیت بالا در فرمولاسیون مکمل های غذایی ، و به عنوان اجزا فراسودمند قابل استفاده می باشند(۵و۷). در مجموع برای تعدادی از پروتئین های دانه های خانواده کدوئیان فعالیت های دارویی از قبیل اثرات ضد دیابت ، ضد قارچ ، ضد باکتری ، ضد التهابی ، و نیز فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شده است (۶،۱۵،۲۰،۲۷). بهره برداری از این گونه محصولات غذایی می تواند باعث بالا رفتن ارزش اقتصادی محصولات غذایی به ویژه در کشورهای در حال توسعه گردد که مصرف پروتئین درآن ها کمتر از حد مطلوب می باشد(۴). هیدرولیز آنزیمی واجد ویژگی هایی می باشد که در آن شرایط واکنش به آسانی کنترل شده و کاهش عناصر مغذی در حین واکنش ها ناچیز است(۹). هیدرولیز آنزیمی بصورت وسیعی به منظور بهبود خواص عملکردی پروتئین های غذایی مورد استفاده قرار گرفته است.برخی از پروتئین های هیدرولیز شده برخلاف پروتئین های خامی که دامنه حلالیت شان در نقطه pH ایزوالکتریک یا دمای بالاست ، حلالیت بالایی در دامنه وسیعی از pH دارا می باشند. به علاوه پپتیدهای کوچک تولید شده ناشی از هیدرولیز آنزیمی قابلیت جذب بهتری در مقایسه با پروتئین های اولیه دارند. مشخص شده است که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تعدادی از بیماری های خاص دارد که عامل آنها پراکسیدهای چربی و ترکیبات مولکولی با وزن کم می باشد که در مرحله نهایی واکنش اکسیداسیون تولید می شود. از این رو و به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت بدن در مقابل بسیاری از بیماری ها بایستی جلوی پراکسیداسیون چربی ها و تشکیل رادیکال های آزاد به وجود آمده در سلول زنده و محصولات غذایی گرفته شود(۱۴). پپتیدهای زیست فعال قطعات پروتئینی ویژه ای هستند که در توالی اولیه پروتئین ها بصورت غیر فعال بیان شده اند.بعد از آزاد شدن آنها ممکن است عملکردهای مختلف فیزیولوژیکی از خود بروز دهند.نوع پپتیدهای زیست فعال تولید شده از پروتئین های خاص به دو عامل توالی اولیه منبع پروتئین و آنزیم های ویژه بکار برده شده برای تولید پپتید بستگی دارد.هیدرولیز آنزیمی پروتئین های گیاهی در راستای تولید انواع پپتیدهای فعال بیولوژیکی از قبیل کنترل فشار خون ، اثرآنتی اکسیدانی ، تقویت سیستم ایمنی بدن و یااثر ضد میکروبی می باشد(۱۸ و۱۹).

چندین عامل در تولید پپتیدهای زیست فعال نقش دارند که شامل زمان هیدرولیز ، درجه هیدرولیز پروتئین ها ، نسبت آنزیم به سوبسترا و پیش تیمار پروتئین قبل از هیدرولیز می باشند(۱۱). پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزا پروتئینی مورد بررسی قرار می گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیر فعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی ، عملکردهای فیزیکو شیمیایی متعددی از خود بروز می دهند(۲۲). قدرت چلات کنندگی[۱](شلاته کردن) عبارت از توانایی تشکیل کمپلکس برخی عناصر با یون های فلزی می باشد.در واقع چلات کنندگی فرآیندی است که طی آن یک ترکیب شیمیایی با یک یون فلزی ترکیب شده و آن را بصورت کمپلکس نگه می دارد . در نتیجه این واکنش کمپلکسی امکان اثر گذاری یون فلزی برواکنش های شیمیایی و تشدید آن ها از جمله اکسیداسیون چربی ها و .... کنترل و مهار می گردد. این اثر گذاری بدین ترتیب است که عنصر چلات کننده بیش از یک جفت الکترون به فلز مرکزی کمپلکس می دهد .پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین ها دارای خاصیت چلات کنندگی می باشند(۱). روش سطح پاسخ[۲]روشی مفید می باشد که جهت بهینه سازی فرآیندهای غذایی به کار گرفته می شود.این روش تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می نماید. به علاوه این روش می تواند مدلی ریاضی که دقیقا کل فرآیند را توصیف می کند را ایجاد نماید(۸). هدف این پژوهش تجزیه و تحلیل پاسخ سطحی اثرات ترکیبی نوع آنزیم ، فعالیت آنزیم و زمان بر فعالیت چلات کنندگی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از دانه هندوانه با استفاده از آنزیم های آلکالاز و پپسین می باشد.

[1] Chelate

[۲] Respond Surface Methodlogy

۲-مواد و روش ها

مغز دانه هندوانه گروه کلاله از " کارخانه مغز تخمه اخوان" تهیه گردید.آنزیم های آلکالاز[۳] (با فعالیت ۲/۴واحد آنسون[۴]بر کیلوگرم و دانسیته ۱/۱۸گرم بر میلی لیتر)تهیه شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس[۵] و پپسین[۶] (با فعالیت ۲۵۰ آنسون بر میلی گرم)گرفته شده از مخاط معده خوک از نمایندگی شرکت سیگما آلدریچ در ایران تهیه گردید.اتانول ، هگزان ، تریس ، سود و اسید کلریدریک ، فروزین[۷]از شرکت مرک و معرف ۲و۲ دی فنیل -۱- پیکریل هیدرازیل[۸](DPPH)از شرکت سیگما تهیه گردید.

۲-۱-تهیه پروتئین هیدرولیز شده از مغز دانه هندوانه

هندوانه در بسته های پلاستیکی خریداری شده و در محیط خشک و خنک نگهداری گردید. سپس توسط آسیاب کنوود(مدل CG100 ، ساخت کشورانگلستان)کاملا خرد شده و بصورت پودر درآمد. سپس با افزودن هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی–وزنی) عمل استخراج روغن انجام شد. عمل روغن گیری تا کاهش روغن باقیمانده به زیر ۱٪ ادامه یافت.در ادامه حلال باقی مانده کنجاله به وسیله آون خلا(مدل DIN EN6052IP20، ساخت کشور آلمان)و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت از آن جدا شد. کنجاله فاقد روغن سپس به نسبت ۱ به ۱۰(وزنی – حجمی) در آب مقطر پراکنده شد. به منظور باز شدن ساختمان پروتئین ها، pH محلول یاد شده با استفاده از pH متر HANA (مدل HI8520 ، ساخت کشور ژاپن) ابتدا با کمک سود ۰/۱ نرمال به ۱۰ رسانده شد.در pH یاد شده و دمای آزمایشگاه محلول به مدت یک ساعت هم زده شد. محلول برای مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال دار (مدلSIGMA4-16KC،ساخت کشور آلمان) با۵۰۰۰ دور

[۳] Alcalase

[۴] Anson

[۵] Bacillus licheniformis

[۶] Pepsin

[۷] Ferrozine

[۸] 2,2- diphenyl-1-picrylhydrazyl

در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس با حذف فاز رسوب و رساندن pH فاز محلول[1]با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱نرمال به ۵ ، مجددا عمل سانتریفیوژ با دور ۵۰۰۰ و زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد تکرار شد.در این مرحله رسوب حاصل جمع آوری و با استفاده از آون تحت خلا(مدل DIN EN6052IP20 ، ساخت کشور آلمان)و در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در زمان ۴ تا ۵ ساعت خشک گردید. ایزوله پروتئین خشک شده در ظرف درب دار جمع آوری و در محیط خشک و خنک نگهداری گردید. سپس با تهیه محلول از پروتئین های ایزوله شده از کنجاله با نسبت ۵۰ گرم ایزوله پروتئینی در ۱۰۰۰ میلی لیتر از بافرهای تریس اسیدکلریدریک با ۸pH برای آلکالاز و بافر فسفات با ۲pH برای پپسین به منظور تثبیت pH شرایط فعالیت آنزیم در غلظت های ۶۰ ، ۷۵ و ۹۰ آنسون بر کیلوگرم ، آنزیم زنی انجام و زمان های مورد نظر ۶۰ ،۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه لحاظ گردید. در پایان هر مرحله آنزیم زنی و به منظور غیر فعال کردن آنزیم ، نمونه تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد و برای مدت زمان ۱۵ دقیقه قرار داده شد. هر تیمار به صورت جداگانه در سانتریفیوژ یخچال دار با دور ۵۰۰۰و در دمای ۴ درجه سانتی گراد و برای مدت زمان ۲۰ دقیقه قرار داده شد و محلول رویی که حاوی پروتئین های هیدرولیز شده بود جهت انجام آزمایشات جمع آوری گردید(۱۶).

۲-۲-اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

به منظور تعیین رطوبت، ۵ گرم از نمونه در ظرف آلومینیومی با وزن معین قرار گرفت. سپس تا رسیدن به وزن ثابت، نمونه ها در آون(مدل C2551 ، ساخت کشور ایران)با دمای ۱۰۳ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفت. تعیین میزان پروتئین کل در دانه های هندوانه اولیه ، از روش کلدال و با استفاده از ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین ۶/۲۵ صورت گرفت(مدل S3 ، ساخت کشور آلمان). میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (مدلAtash-1200، ساخت کشور ایران) در دمای ۵۵۰ درجه سانتیگراد ، تعیین گردید(۳).

۲-۳-اندازه گیری قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی(Fe^{2+})

قدرت چلات کنندگی آهن دو ظرفیتی طبق روش بویر و مک کلاری (۱۹۸۷) اندازه گیری شد. بدین منظور۴/۷میلی لیتر از هر کدام از نمونه های آنزیم زنی شده با ۰/۱ میلی لیتر از محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن دو ظرفیتی و ۰/۲ میلی لیتر فروزین ۵ میلی مولار مخلوط و محلول حاصله برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب نمونه ها و نیز جذب شاهد در طول موج ۵۶۲ نانومتر و توسط اسپکتروفوتومتر (مدل T70:UV/VIS، ساخت کشور ژاپن)اندازه گیری گردید. قدرت چلات کنندگی بر اساس رابطه۱ محاسبه گردید:

رابطه(۱):

$$\text{قدرت چلات کنندگی}(\%) = (A_{blank} - A_{sample} / A_{blank}) \times 100$$

که در آن :

A_{blank} : جذب شاهد

A_{sample} : جذب نمونه می باشد.

نمونه کنترل به همان روش نمونه اصلی تهیه شد . با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید.جذب کمتر نشان دهنده فعالیت قدرت چلات کنندگی بالاتر می باشد(۵).

۲-۴-آزمایشات بهینه سازی

به منظور بهینه سازی قدرت چلات کنندگی به وسیله پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. فاکتورهای متغیر شامل غلظت آنزیم (۹۰-۶۰ آنسون بر کیلوگرم پروتئین) ، زمان آنزیم زنی (۶۰-۱۸۰ دقیقه) و نوع آنزیم (آلکالاز و پپسین) بود که در قالب طرح مرکب مرکزی[2]با ۵ نقطه مرکزی انجام شد. مقادیر مورد استفاده

1- Centeral Composite Design

3Supernatant

در این بررسی بر اساس یک پیش آزمون انتخاب شد. درصد چلات کنندگی بوسیله پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه به عنوان متغیر وابسته اندازه گیری شد. مقادیر کد شده و واقعی متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است. آنالیز داده ها با نرم افزار Design expert.7.5.1 انجام شد. مدل مناسب بر اساس معنی دار نشدن آزمون فقدان برازش[1] و بالا بودن قدرت مدل (ضریب تبیین) انتخاب شد. تابع کلی برازش داده شده در این بررسی به صورت رابطه۲ بود:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{n}\beta_i X_i + \sum_{i=1}^{n}\beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{n}\sum_{j=1}^{n}\beta_{ij} X_{ij}$$

در معادله فوق، Y بیانگر پاسخ های پیش بینی شده قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی ، β0 ضریب ثابت ، βiضریب خطی ، βii تاثیرات درجه دوم و βij نشان دهنده تاثیرات متقابل می باشد. جدول ۱ سطوح واقعی و کد بندی شده متغیرها در آزمایش را نشان می دهد.

جدول۱- سطوح واقعی و کدبندی شده متغیرها در آزمایش

متغیرهای مستقل	کد و سطوح مربوطه		
	+۱	۰	-۱
غلظت آنزیم(واحدآنسون/کیلوگرم)	۹۰	۷۵	۶۰
زمان آنزیم زنی(دقیقه)	۱۸۰	۱۲۰	۶۰
نوع آنزیم	پپسین		آلکالاز

2- Lack of Fit

۳-نتایج و بحث

برازش مدل

مدل مناسب با توجه به معنی دار بودن آزمون F (p<۰/۰۵) و معنی دار نبودن فقدان برازش در مورد آن و هم چنین مقادیر بالای $R^۲$ و $R^۲$ تعدیل شده و ضریب تغییرات انتخاب شد. معنی دار نبودن آزمون عدم برازش برای یک مدل بیانگر این است که نقاط به خوبی اطراف مدل قرار گرفته اند و می توان از مدل برای پیش گویی مقادیر متغیرهای وابسته استفاده کرد. بنابراین با توجه به عدم معنی دار بودن آزمون برازش ، می توان دریافت که مدل به خوبی قادر است که بر داده های مورد بررسی برازش شود. قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی(Fe^{2+}) جدول ۲ اثرات عوامل مختلف شامل فعالیت آنزیم ، زمان آنزیم زنی و نوع آنزیم بر قدرت چلات کنندگی تیمارها را نشان می دهد:

جدول ۲تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) قدرت چلات کنندگی مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ

منابع تغییر	ضریب	درجه آزادی	میانگین مربعات	Fمقدار	Prob > F
مدل	۲۰۰۶/۱۴	۸	۲۵۰/۷۷	۲/۶۶	۰/۴۰*
غلظت (X1)	۲۷۶/۸۰	۱	۲۷۶/۸۰	۲/۹۰	۰/۱۰
زمان (X2)	۵۴۷/۱۰	۱	۵۴۷/۱۰	۵/۷۹	۰/۰۲*
آنزیم(X3)	۶۸۶/۰۴	۱	۶۸۶/۰۴	۷/۲۶	۰/۰۱*
X1× X2	۱۹۰/۲۷	۱	۱۹۰/۲۷	۲/۰۱	۰/۱۷
X1× X3	۶۰/۵۸	۱	۶۰/۵۸	۰/۶۴	۰/۴۳
X2× X3	۱۰/۵۳	۱	۱۰/۵۳	۰/۱۱	۰/۷۴
$X1^2$	۱۲/۰۳	۱	۱۲/۰۳	۰/۱۳	۰/۷۲
$X2^2$	۲۲۸/۶۷	۱	۲۲۸/۶۷	۲/۴۲	۰/۱۳
باقیمانده	۱۶۰۵/۴۸	۱۷	۹۴/۴۴		
فقدان برازش	۶۶۵/۳۴	۹	۷۳/۹۳	۰/۶۳	۰/۷۴ ns
خطا	۹۴۰/۱۴	۸	۱۱۷/۵۲		
کل	۳۶۱۱/۶۲	۲۵			

* P<0.05 ، ** P<0.01 ، ***P<0/001

آزمون ANOVA نشان داد که مدل چند جمله ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ با ضرایب مشخص می باشد. R^2=۸۷/۶۴ بیانگر این است که مدل رگرسیون ، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته تغییراتی معادل ۸۷/۶۴درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است تا مشخص گردد چه میزان از تغییرات به وسیله مدل شرح داده شده است. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که برای $p>0.01$ معنی دار نبود. از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی دار نبود، لذا مدل بر اساس قدرت چلات کنندگی برازش گردید. برازش مناسب به معنی آن است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده ها را به اندازه کافی توضیح دهد(۲). بنابراین می توان گفت که این مدل جهت پیش بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.براساس آزمون ANOVA اثر زمان آنزیم زنی و نیز اثر نوع آنزیم معنی دار بود($p<0.05$). جدول ۳ ضرایب رگرسیونی مدل برآورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش بینی معادله مدل متغیرهای مستقل مربوط به قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی را نشان می دهد:

جدول۳ ضرایب رگرسیونی مدل برآورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش بینی معادله متغیرهای مستقل

متغیر مدل	ضریب
ثابت	۶۲/۹۴
غلظت (X1)	-۴/۸۰
زمان آنزیم زنی (X2)	-۶/۷۵*
نوع آنزیم(X3)	۵/۱۴*
$X1\times X2$	۴/۸۸-
$X1\times X3$	۲/۲۵-
$X2\times X3$	۰/۹۴
$X1^2$	۱/۴۸
$X2^2$	۶/۴۳-

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات به منظور پیش بینی مدل چند جمله ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به ضرایب جدول۳، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید :

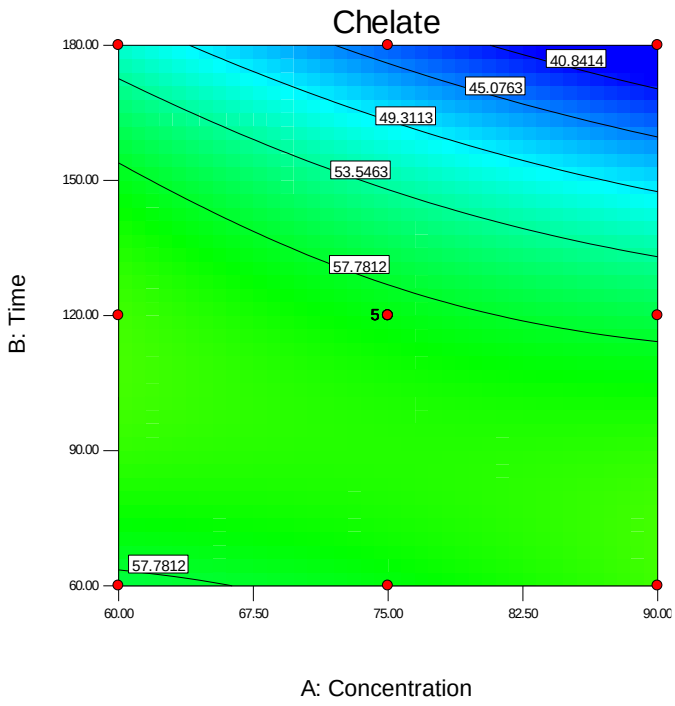
$$Y = 62.94 - 4.80X_1 - 6.75X_2 + 5.14X_3 + 1.48X_1^2 - 6.43X_2^2 - 4.88X_1X_2 - 2.25X_1X_3 + 0.94X_2X_3$$

به منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی و برای دستیابی به بالاترین قدرت چلات کنندگی ، نمودارهای سه بعدی سطحی و کانتور برای متغیرها در شکل های ۱ و ۲ ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را

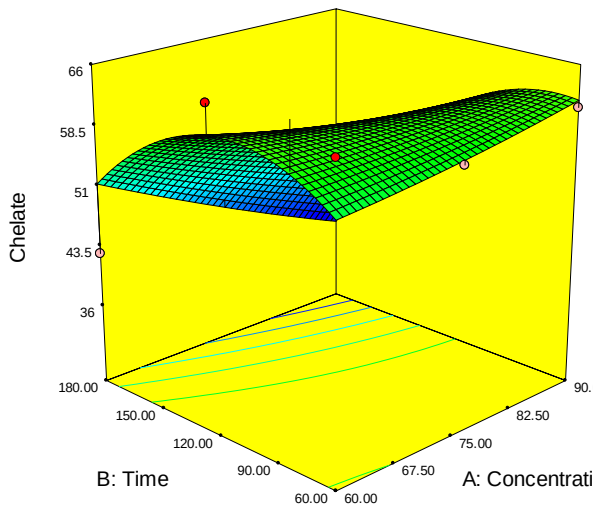
روی پاسخ در شرایطی که متغیر سوم ثابت نگه داشته شده است ، نمایش می دهد.

۱-۳-بررسی اثرآنزیم پپسین بر قدرت چلات کنندگی

شکل ۱ نمودارهای سه بعدی سطحی(الف) و کانتور(ب) مربوط به قدرت چلات کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده دانه هندوانه بوسیله آنزیم پپسین را نشان می دهد:



ب



الف

شکل ۱ نمودارهای سه بعدی(الف) و کانتور(ب) قدرت چلات کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده دانه هندوانه بوسیله آنزیم پپسین

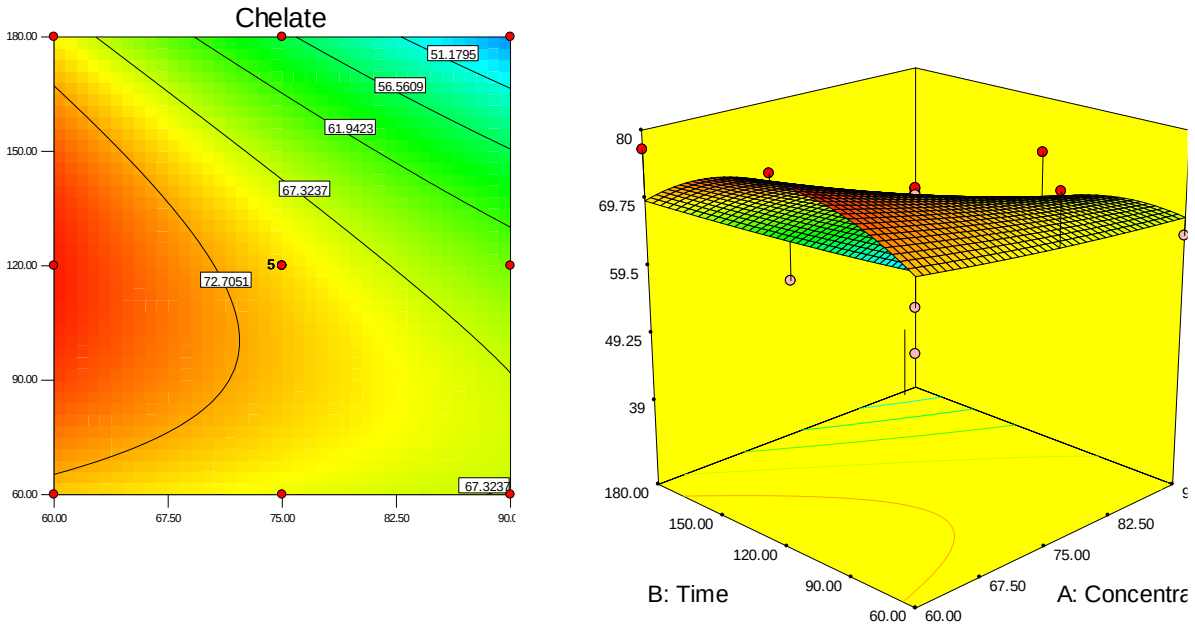
نمودار های یاد شده نشان می دهد که با افزایش غلظت آنزیم و زمان آنزیم زنی در مورد آنزیم پپسین ، قدرت چلات کنندگی ابتدا افزایش یافته و در ادامه کاهش می یابد. بیشترین قدرت چلات کنندگی در نمونه های تلقیح شده با آنزیم پپسین به میزان ۶۲/۰۱ درصد در زمان ۱۰۸/۷۱ دقیقه و غلظت آنزیمی ۶۰ آنسون می باشد. افزایش قدرت چلات کنندگی در ابتدا به دلیل هیدرولیز بالای پروتئین ها و تولید پپتیدهای محلول می باشد که باعث افزایش واکنش با یون آهن دو ظرفیتی می گردد.کاهش قدرت چلات کنندگی با افزایش زمان نسبت به افزایش غلظت آنزیم از شیب تندتری برخوردار است.اویسی پور و همکاران علت این تغییرات را چنین توجیه نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز ، تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش می یابد(۱۶). هم چنین از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم ها کاسته می شود که در مجموع باعث کاهش شدت هیدرولیز و در نتیجه موجب کاهش قدرت چلات کنندگی می گردد.هم چنین امکان شکل گیری ترکیباتی در طول هیدرولیز که می توانند مانع فعالیت آنزیمی شوند نیز می تواند در این امر دخیل باشد(۱۷).این نتایج تقریبا با نتایج پیری قشلاقی و همکاران (۱۳۹۳) مشابه بود(۲). معادله برازش و ضرایب مربوط به قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی محلول هیدرولیز شده پروتئین دانه هندوانه به وسیله آنزیم پپسین بصورت زیر می باشد :

رابطه(۴):

$$Y=48.34 - 0.50X1+ 0.70X2-(5.41E-003)X1X2 +(6.55E-003)X1^2 - (1.78E-003) X2^2$$

۳-۲- بررسی اثرآنزیم آلکالاز بر قدرت چلات کنندگی

شکل ۲ نمودارهای سه بعدی سطحی(الف) و کانتور(ب) مربوط به قدرت چلات کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده دانه هندوانه به وسیله آنزیم آلکالاز را نشان می دهد:



ب الف

شکل ۲ نمودارهای سه بعدی سطحی (الف) و کانتور(ب) مربوط به قدرت چلات کنندگی محلول هیدرولیز شده پروتئین دانه هندوانه بوسیله آنزیم آلکالاز

نمودار های یاد شده نشان می دهد در مورد آنزیم آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم و زمان ، قدرت چلات کنندگی ابتدا افزایش و در ادامه کاهش می یابد که این مساله می تواند به دلیل شکسته شدن پپتیدهای اولیه ایجاد شده در ادامه عمل هیدرلیز توسط آنزیم آلکالاز باشد.بیشرین قدرت چلات کنندگی بوسیله محلول هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با مقدار ۷۸/۰۸درصد در زمان ۱۱۶/۲۱دقیقه و فعالیت آنزیمی ۶۰ آنسون می باشد. بدلیل ایجاد پپتیدهای با اندازه های مولکولی مختلف در هر تیمار ، فعالیت چلات کنندگی متفاوت خواهد بود. سامارانایاکای و همکاران(۲۰۰۸)در بررسی قدرت چلات کنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک اقیانوس آرام (Merluccius productus)، فعالیت چلات کنندگی ۷ تا ۴۶ درصد را ثبت نمودند (۲۱).تیانسیلاکول و همکاران (۲۰۰۷)فعالیت مهارکنندگی ۶۰ درصد را از پروتئین هیدرولیز شده ماهی اسکار حلقوی (Decapterus maruadsi)حاصل نمودند(۲۶).معادله برازش و ضرایب مربوط قدرت گیرندگی رادیکال های آزاد DPPH آنزیم آلکالاز بشرح زیر می باشد :

رابطه(۵):

$$Y=77.33 - 0.80X1 + 0.73X2 - (5.41E-003E)\ X1X2 + (6.55E-003)X1^2 - (1.78E-003)X2^2$$

۴-نتیجه گیری

با توجه به قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی توسط دو آنزیم پپسین و آلکالاز در شرایط زمان ها و غلظت های مختلف مشاهده می شود که قدرت قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی هر دو آنزیم پپسین و آلکالاز با افزایش غلظت آنزیم و زمان آنزیم زنی ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد که این موضوع به دلیل پیشرفت هیدرولیز و شکستن پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر

می باشد .هم چنین در مقایسه قدرت چلات کنندگی یون آهن دو ظرفیتی بین دو آنزیم، آنزیم آلکالاز با میزان چلات کنندگی ۷۸,۰۸ درصد دارای قدرت چلات کنندگی بیشتری می باشد.لذا اگر هدف از مصرف هیدرولیزات پروتئینی دانه هندوانه قدرت چلات کنندگی و گرفتن یونهای فلزی باشد آنزیم آلکالاز با غلظت ۶۰ آنسون و زمان ۱۱۶,۲۱ به عنوان تیمار بهینه انتخاب می باشد.دانه هندوانه بعنوان منبعی غنی از پروتئین و چربی می باشد. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده با خاصیت آنتی اکسیدانی بهینه از دانه هندوانه گروه کلاله با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و پپسین توسط روش سطح پاسخ صورت گرفت.نتایج نشان می دهد که پپتیدهای زیست فعالی که در اثر هیدرولیز تولید می شوند قادرند به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی در فرمولاسیون غذایی و نیز به عنوان ترکیبات دارویی مورد استفاده قرار گیرند. البته پیشنهاد می شود آزمون های درون زیستی نیز در رابطه با اثرات این ترکیبات در بدن موجود زنده انجام گردد.

۵-منابع

۱-اعتمادی، م.، صادقی ماهونک ،ع.، قربانی ، م.، مقصودلو، ی.(۱۳۹۴). تولید و بررسی فعالیت شلات کنندگی و قدرت احیاکنندگی پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا. نشریه علوم غذایی و تغذیه.دوره ۱۳، شماره۱(پیاپی۴۹)، صفحات۷۴-۶۵.

۲- پیری قشلاقی ، ش.، صادقی ماهونک ،ع.، قربانی ، م.، اعلمی ، م.(۱۳۹۳). تاثیر دما ، زمان و نسبت های مختلف آنزیم به سوبسترا در تهیه پرونئین هیدرولیز شده آب پنیر. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. جلد۳،شماره۳ ، صفحات ۲۵۴-۲۴۵.

3. AOAC. (2005). Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

4. Arogundade LA, Akinfenwa MO, Salawu AA.(2004). Effect of NaCl and its partial or complete replacement with KCl on some functional properties of defatted Colocynthis citrullus L. seed flour. Food Chem. 84: 187-193.

5. Boyer, R. F., & McCleary, C. J. (1987). Superoxide ion as a primary reductant in ascorbate-mediated ferritin iron release. Free Radical Biology and Medicine, 3(6), 389–395.

6. Caili FU, Huan SH, Quanhong LI. (2006). A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. Plant Food. Hum. Nutr. 61: 70-77.

7. Diniz, F.M. and Martin, A.M. (1996). Use of response surface methodology to describe the combined effect of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish(Squalus acanthias) muscle. International Journal of Food Science and Technology, 31: 419-426.

8. El-Adaway, T. A., & Taha, K. M. (2001). Characteristics and composition of different seed oils and flours. Food Chemistry, 74, 47e54.

9. Feng, J. and Y.L. Xiong.(2003). Interaction and functionality of mixed myofibrillar and enzymehydrolyzed soy proteins. J. Food Sci., 68(3): 803-809.

10. Gopalan, C., Sastri, B. V. R., Balasubramanian, S. C., Rao, N. B. S., Deosthale, Y. G., & Pant, K. C. (1989). Nutritive value of Indian foods. Hyderabad, India: National Institute of Nutrition. Indian Council of Medical Research.

11. Inouye K, Nakano K, Asaoka K, Yasukawa K. (2009). Effects of thermal treatment on the coagulation of soy proteins induced by subtilisin Carlsberg. J agric. food chem. 57:717–23.

12. Khalil MM. Factors affecting production of melon seed kernel Teotia MS, Ramakrishna P. (1984).Chemistry and technology of melon seeds. J. Food Sci. Technol. 21: 332-340.

13. King, R. D., & Onuora, O. J. (1983). Aspects of melon seed protein characteristics Food Chemistry, 14, 65e77.

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

15. Nkosi CZ, Opoku AR, Terblanche SE. (2006). Antioxidative effects of pumpkin seed (Cucurbita pepo) protein isolate in CCl4-induced liver injury in low-protein fed rats. Phytother. Res. 20: 935-940.

16. Ovissipour, M. R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., &

Nigeria. Nutrition Reports International, 16, 813e820.
24. Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa1, S., and Prado-Barragán, L.A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (Carassius auratus). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 98-104
25. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. & Habibi-Rezaei, M.(2011). Poultry
by-products and enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology using
Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering, 7: 1556-3758.
26. Thiansilakul, Y., Benjakul, S. & F, Shahidi.(2007). Antioxidative activity of protein
hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and flavourzyme. Journal of Food Biochemistry, 31: 266–287.
27. Wang HX, Ng TB. (2003). Isolation of cucurmoschin, a novel antifungal peptide abundant in arginine, glutamate, and glycine residues from black pumpkin seeds. Peptides 24: 969-972.
28. Wani AA, Sogi DS, Shigh P, Singh P. (2012). Dough-Handling and Cookie-Making Properties of Wheat Flour–Watermelon Protein Isolate Blends.Food Sci Biothecnol. 5: 1612-1621.

Shahiri, H.(2009a). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Food Chemistry, 115: 238-242.
17. Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., & Esmaeili Mulla, A.(2009b). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons (Huso huso) using Alcalase. International Aquatic Research, 1: 31-38.
18. Pihlanto A, Korhonen H. (2003). Bioactive peptides and proteins. Adv. food res. 47: 175-276.
Guang C, Phillips RD (2009) Plant food-derived angiotensin I converting enzyme peptides. J. agric. food chem. 57: 5113-5120.17.
19. Pihlanto-Leppälä, A. (2001). Bioactive peptides from bovine whey proteins : Opoid and ACE inhibitory peptides. Trends Food Sci Technol. **11**, 347–356
20. Quanhong L, Ze T, Tongyi C. (2003). Study on the hypoglycaemic action of pumpkin extract in diabetic rats. Acta Nutr. Sin. 25: 34-36.
21. Samaranayaka, A. G. P. & Li-Chan, E. C. Y. (2008). Autolysis-assisted production of protein
hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (Merluccius productus). Journal of Food Chemistry, 107: 768-776.
22. Sarmadi, B.H. and Ismail, A. (2010). Antioxidative peptides from fermented mushroom Ganoderma lucidum. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52: 6646-6652.
23. Stafford, T., & Oke, O. K. (1977). Protein isolate from lesser known oilseeds from