Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Food Processing and Preservation Journal

Print ISSN: 2423-3544
Online ISSN: 2423-3803

Iranian Association of Food Scientists and Technologists

Antioxidant evaluation of hydrolyzed pumpkin seed protein under the influence of simple and sequential enzymatic hydrolysis using pepsin and trypsin

Roya Bazi[1], Seyed Hossein Hosseini Ghaboos[2], Abolfazl Fadavi[2]

[1] MSc graduate, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University of Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran.

[2] Assistant Professor, Food Science and Technology Research Center of east Golestan, Islamic Azad University of Azadshahr Branch, Azadshahr, Iran, Email: hosseinighaboos@yahoo.com

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2024-10-14
Revised: 2024-12-24
Accepted: 2025-01-11

Keywords:
Simple hydrolysis
Sequential hydrolysis
Pumpkin seed protein
Protein hydrolysate
Trypsin and Pepsin enzymes

ABSTRACT

Background and objectives: The use of synthetic antioxidants in the food industry is subject to strict laws due to the potential negative effects of these compounds on human health. As a result, replacing synthetic chemical antioxidants with various natural antioxidant compounds has become an important field of study. Numerous researches have shown that the addition of hydrolyzed proteins or peptides with antioxidant properties can effectively prevent the oxidation of fats during transportation and storage, which preserves the taste and quality of nutrition. Due to the fact that different enzymes have different effects on the same substrate and due to the fact that it has been claimed that the combination of enzymes improves the bioactivity characteristics of the product, the aim of this research was to compare the effect of simple enzymatic hydrolysis versus sequential hydrolysis on the antioxidant properties of hydrolyzed pumpkin seed protein.

Materials and Methods: Pumpkin seed protein was first extracted and then hydrolyzed by two enzymes, trypsin and pepsin, in a simple and sequential hydrolysis condition. At first, in order to achieve the appropriate time of simple hydrolysis, the two mentioned enzymes were used separately in the condition of an enzyme-to-substrate ratio of 2%, optimum temperature (37°C), and optimum pH for each enzyme and during the times of 30, 60, 90, 120, 150, 180, and 210 minutes. In the next step, using the optimal time of 180 minutes, four sequential hydrolysis treatments were performed.

Results: The results of the first step showed that the hydrolysates produced in 180 minutes have a high antioxidant capacity based on DPPH free radical scavenging activity, iron ion reduction power, total antioxidant capacity, and iron ion chelating activity. In the next step, using optimal time 180 minutes, four sequential hydrolysis condition were used as follows: 90 minutes of hydrolysis with trypsin and then 90 minutes with pepsin enzyme (treatment 1), 90 minutes of hydrolysis with pepsin and then 90 minutes with trypsin enzyme (treatment 2), 120 minutes of hydrolysis with trypsin and then 60 minutes with pepsin enzyme (treatment 3), 120 minutes of hydrolysis with pepsin and then 60 minutes with trypsin enzyme (treatment 4)

and were compared with two simple hydrolysis treatments including: 180 minutes of hydrolysis with Trypsin (treatment 5) and 180 minutes of treatment with pepsin (treatment 6) in terms of the four above mentioned antioxidant tests. The results showed that the sample under sequential hydrolysis treatments showed higher antioxidant capacity compared to simple hydrolysis.

Conclusion: Due to the difference in the composition and sequence and different size as a result of the different degree of hydrolysis of the peptides, the sample resulting from the sequential hydrolysis of the two enzymes showed higher antioxidant activity.

Cite this article: Bazi, R., Hosseini Ghaboos, S.H., Fadavi, A. 2025. Antioxidant evaluation of hydrolyzed pumpkin seed protein under the influence of simple and sequential enzymatic hydrolysis using pepsin and trypsin. *Food Processing and Preservation Journal*, 16(4), 1-20

© The Author(s).
DOI: 10.22069/fppj.2025.22865.1843
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

فرآوری و نگهداری مواد غذایی
شاپا چاپی: ۳۵٤٤-۲٤۲۳
شاپا الکترونیکی: ۳۸۰۳-۲٤۲۳

ارزیابی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پپسین و تریپسین

رؤیا بزی[۱]، سیدحسین حسینی قابوس[۲*]، ابوالفضل فدوی[۲]

[۱] دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران

[۲] استادیار مرکز تحقیقات صنایع غذایی شرق گلستان، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، آزادشهر، ایران، رایانامه:hosseinighaboos@yahoo.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی-پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۳/۰۷/۲۳
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۳/۱۰/۰٤
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۳/۱۰/۲۲

واژه‌های کلیدی:
آنزیم پپسین و تریپسین
پروتئین دانه کدو
پروتئین هیدرولیز شده
هیدرولیز ساده
هیدرولیز ترکیبی

چکیده

سابقه و هدف: کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در صنعت مواد غذایی به دلیل اثرات بالقوه منفی این ترکیبات بر سلامت انسان تحت قوانین سخت‌گیرانه قرار دارد؛ در نتیجه جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی سنتزی با انواع ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی به یک زمینه مطالعاتی مهم تبدیل شده است. تحقیقات متعدد نشان داده است که افزودن پروتئین‌های هیدرولیزشده یا پپتیدها با ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌تواند به‌طور موثری از اکسیداسیون چربی‌ها در طی حمل‌ونقل و نگهداری ممانعت نماید که این امر باعث حفظ طعم و کیفیت تغذیه‌ای موادغذایی می‌گردد. با توجه به این‌که آنزیم‌های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی‌های زیست فعالی محصول حاصل می‌گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی بر روی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو می‌باشد.

مواد و روش‌ها: ابتدا پروتئین دانه کدو استخراج و سپس جهت انجام هیدرولیز از دو آنزیم تریپسین و پپسین به‌صورت ساده و ترکیبی استفاده شد. جهت دستیابی به زمان مناسب هیدرولیز ساده از دو آنزیم مذکور به‌صورت جداگانه در شرایط نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ ، دما (۳۷ درجه سانتی‌گراد) و pH مناسب هر آنزیم (پپسین ۲ و تریپسین ۸) و در طی زمان‌های ۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه استفاده شد. در مرحله بعد، با استفاده از این زمان بهینه چهار تیمار هیدرولیز ترکیبی انتخاب و از نظر چهار آزمون آنتی اکسیدانی شامل قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن با دو تیمار هیدرولیز ساده شامل: ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین (تیمار ۵) و ۱۸۰ دقیقه تیمار با پپسین (تیمار ٦) مقایسه انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که هیدرولیز شده‌های تولیدی در زمان ۱۸۰ دقیقه دارای قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالایی بر اساس قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH (٦۸/۹ و ٦۳/۲۵٪)، قدرت احیاء یون آهن (۰/۹۹ و ۰/۸٦)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۱/٤۲ و ۱/۲٤) و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (٦۹ و ٦٤٪) به ترتیب برای تریپسین و پپسین می‌باشند. در مرحله بعد، با

استفاده از این زمان بهینه چهار تیمار هیدرولیز ترکیبی به‌صورت: ۹۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین و سپس ۹۰ دقیقه با آنزیم پپسین (تیمار ۱)، ۹۰ دقیقه هیدرولیز با پپسین و سپس ۹۰ دقیقه با آنزیم تریپسین (تیمار ۲)، ۱۲۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین و سپس ٦۰ دقیقه با آنزیم پپسین (تیمار ۳)، ۱۲۰ دقیقه هیدرولیز با پپسین و سپس ٦۰ دقیقه با آنزیم تریپسین (تیمار ٤) انتخاب و از نظر چهار آزمون آنتی اکسیدانی فوق با دو تیمار هیدرولیز ساده شامل: ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز با تریپسین (تیمار ۵) و ۱۸۰ دقیقه تیمار با پپسین (تیمار ٦) مقایسه انجام گرفت. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مورد استفاده تیمارهای هیدرولیز ترکیبی ۳ و ٤ در مقایسه با تیمارهای هیدرولیز ساده (۵ و ٦) قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان می‌دهند به‌طوری‌که بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به ترتیب به میزان ۷۹/۸۵ ٪، ۱/۲۳، ۱/۵٦ و ۷۷٪ در تیمار هیدرولیز ترکیبی (تیمار ٤) و پایین‌ترین میزان آن‌ها به ترتیب به میزان ٦۵/۷٪، ۰/۹۱، ۱/۲۸ و ٦۸٪ در تیمار هیدرولیز ساده (تیمار ٦) مشاهده شد.

نتیجه‌گیری: نتایج بررسی قابلیت آنتی‌کسیدانی محصولات هیدرولیز شده در شرایط مختلف (هیدرولیز ساده یا ترکیبی) به دلیل ایجاد پپتیدهای متفاوت از نظر اندازه، ترکیب و توالی به دلیل تفاوت در میزان هیدرولیز، پپتیدهای حاصل از فعالیت ترکیبی دو آنزیم قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان دادند.

استناد: بزی، رؤیا؛ حسینی قابوس، سیدحسین؛ فدوی، ابوالفضل. (۱٤۰۳). ارزیابی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی توسط پپسین و تریپسین. *فرآوری و نگهداری مواد غذایی*، ۱٦ (٤)، ۲۰-۱.

DOI: 10.22069/fppj.2025.22865.1843
ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

پروتئین‌های حیوانی به دلیل ویژگی‌های عملکردی عالی به‌طور گسترده مورد بررسی قرارگرفته و به‌طور معمول در سیستم‌های غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند. بااین‌وجود تولید این پروتئین‌ها تأثیر زیست‌محیطی قابل توجهی دارد. برآورد شده است که میزان مشارکت تولید گوشت در تولید گازهای گلخانه‌ای به میزان ۲۵٪ برآورد شده است (۱). علاوه براین تقاضا برای مصرف گوشت روبه افزایش است. بر اساس برآورد سازمان ملل متحد جمعیت دنیا در سال ۲۰۵۰ به میزان ۹ میلیارد نفر افزایش خواهد یافت. بخش قابل توجهی از این افزایش در کشورهای جهان سوم صورت می‌گیرد که در آن‌ها مصرف گوشت نیز روبه افزایش است. در نتیجه‌بخش قابل توجهی از تحقیقات به کشف و مطالعه برروی منابع پروتئینی دیگر معطوف گردیده است (۲). هزینه تولید پروتئین حیوانی نسبت به پروتئین گیاهی ۱۰ برابر بیشتر است (۳). در نتیجه، علاقه به تحقیق در زمینه پروتئین‌های گیاهی و عملکرد آن‌ها در دهه‌های اخیر به‌صورت قابل توجهی افزایش یافته است. به‌هرحال این پروتئین‌ها دارای مشکلاتی ازجمله خصوصیات عملکردی و قابلیت هضم پایین می‌باشند. هیدرولیز آنزیمی محدود می‌تواند تا حد زیادی حلالیت و بنابراین کاربرد بالقوه بسیاری از پروتئین‌ها را بهبود بخشد و به دلایل مختلف نسبت به هیدرولیز شیمیایی دارای مزایای بیشتر است ازجمله: کیفیت تغذیه‌ای اسیدهای آمینه در روش آنزیمی نسبت به شیمیایی بهتر محافظت می‌شود، نوع آنزیم و انتخاب آن تأثیر عمده‌ای در هدایت هیدرولیز جهت تولید محصولات هیدرولیز شده مطلوب دارد (٤). هیدرولیز آنزیمی نه‌تنها باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌گردد بلکه باعث ایجاد ویژگی‌های جدید در محصول تولیدی می‌گردد. این عمل می‌تولند باعث تولید محصولات هیدرولیز شده با توانایی تثبیت کف، پایداری امولسیون و یا حتی ویژگی‌های زیست‌فعالی نظیر کاهندگی فشارخون، ضدمیکروب، آنتی اکسیدان یا فعالیت شبه مخدری گردد (۵). پپتیدهای زیست فعال، مشتقات پروتئینی هستند که در ساختمان منبع پروتئین اولیه غیرفعال بوده و پس از رهایش خصوصیات سلامتی بخشی متفاوتی بر مبنای ترکیب و توالی آمینواسیدی خود بروز می‌دهند. به‌طورکلی پپتیدهای زیست فعال، به‌عنوان نسل جدیدی از تنظیم کننده‌های فعال بیولوژیکی شناخته می‌شوند که پتانسیل قابل توجهی در پیشگیری و درمان بسیاری از بیماری‌ها دارند؛ همچنین پژوهش‌ها نشان داده است که این ترکیبات با ممانعت از اکسیداسیون لیپیدها و جلوگیری از رشد میکروبی پتانسیل مناسبی در حفظ کیفیت مواد غذایی دارند. به‌طور معمول این پپتیدها دارای ۲۰-۲ آمینواسید بوده و از نظر وزن مولکولی دارای وزن پایین‌تر از ٦۰۰۰ دالتون می‌باشند. همانطور که ذکر شد ویژگی‌های سلامتی بخشی این ترکیبات به ساختار، ترکیب و توالی آمینواسیدی آن‌هابستگی دارد که در نتیجه آن‌ها خصوصیات سلامتی بخشی گوناگونی همچون ضد فشارخون، ضد سرطان، ضدالتهاب، بهبود سیستم ایمنی بدن، آنتی‌اکسیدانی، ضد دیابت و ضد کلسترول از خود نشان داده‌اند (٦).

هیدرولیز آنزیمی، مرسوم‌ترین شیوه تولید این ترکیبات ارزشمند می‌باشد. آنزیم‌های رایج مورد استفاده در این شیوه، آنزیم‌های گیاهی و میکروبی نظیر آلکالاز، فلاورزیم پاپائین، فیسین، ترمولایزین، پروناز و یا آنزیم‌های گوارشی نظیر پپسین و تریپسین می‌باشند که به‌صورت جداگانه و یا در ترکیب با یکدیگر، جهت تولید توالی‌های پپتیدی کوچک از مخلوط‌های پیچیده پروتئینی مورد استفاده قرارمی‌گیرند (۷). با توجه به عملکرد اختصاصی آنزیم‌ها، نوع آنزیم مصرفی یکی از فاکتورهای مهم در

ویژگی پپتیدهای زیست فعال تولیدی است. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آب گریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (۸). تریپسین پروتئاز سرینی از پانکراس است که قابلیت هضم پروتئین‌های غذایی را دارد و بر زنجیره جانبی با بار مثبت لایزین و آرژنین اثر می‌گذارد و آن را می‌شکند. تریپسین یک لندو پپتیداز است و پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره می‌شکند (۹).

پپتیدهای دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی از مهم‌ترین اجزاء فراسودمند غذایی هستند که مورد توجه بسیاری از محققین، مصرف کنندگان و صنعت غذا قرار گرفته‌اند و این امر به دلیل پتانسیل کاربرد آن‌ها در تولید غذاهای فراسودمند و حفظ کیفیت و ایمنی محصولات غذایی است (۱۰). تحقیقات مختلفی بر روی تولید پپتیدهای با ویژگی آنتی اکسیدانی از محصولات گیاهی صورت گرفته است. سمائی و همکاران (۱۳۹۹) پروتئین هیدرولیز شده باقلا را به روش ترکیبی تولید و از نظر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی مورد بررسی دادند و گزارش کردند که هیدرولیز ترکیبی با آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین (در غلظت‌های ۱/۵ و ۱/۵ درصد) منجر به تولید پروتئین هیدرولیز شده با بالاترین میزان خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۹۲/۷۲ درصد) شد (۱۱). لی و همکاران (۲۰۰۷)، هیدرولیز آنزیمی کلاژن گوشت خوک را در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت با استفاده از آنزیم پپسین انجام دادند. محصولات هیدرولیز شده حاصل هریک به‌طور جداگانه به مدت ۲٤ ساعت تحت تیمار با آنزیم‌های پاپائین، پروتئاز پانکراس گاوی[1] و مخلوط سه آنزیم (پروتئاز پانکراس گاوی، پروتئاز حاصل از *استرپتومایسس*[2] و *باسیلوس پلی میکسا*[3]) قرارگرفتند. نتایج نشان داد که پپتیدهای هیدرولیز شده توسط مخلوط آنزیم، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند (۱۲).

دانه کدو (*Cucurbita pepo L.*) به‌عنوان یک محصول جانبی کشاورزی، دارای مقادیر نسبتاً بالای پروتئین (۳۰-٤۰ درصد برحسب ماده خشک) است. پروتئین آن غنی از اسیدهای آمینه ضروری بوده و منبع مناسبی از متیونین، والین، لوسین، ایزولوسین، هیستیدین و ترئونین می‌باشد (۱۳). بر اساس مطالعات مشخص شده است که پروتئین دانه کدو از نظر فراهمی زیستی اسیدهای آمینه مشابه سویا می‌باشد (۱٤). علاوه بر این، پروتئین‌های جداشده از دانه‌های کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و شلاته‌کننده مناسبی هستند. بر اساس بررسی‌های اخیر مشخص شده است که پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی است (۱۵، ۱٦). به‌عنوان نمونه دیانکووا و همکاران (۲۰۲٤) قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط پاپایین و لین و همکاران (۲۰۲٤) قابلیت زیست فعالی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو حاصل از هیدرولیز آنزیم توسط پاپایین، پپسین و پروتئازهای آناناس گزارش نمودند (۱۷، ۱۸). با توجه به این‌که آنزیم‌های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی‌های زیست‌فعالی محصول حاصل می‌گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر سیستم آنزیمی ساده و ترکیبی با استفاده از دو آنزیم پپسین و تریپسین می‌باشد.

[1] Protease from bovine pancreas
[2] Streptomyces
[3] *Bacillus polymixa*

مواد و روش‌ها

مواد اولیه مصرفی: ابتدا میوه کدو (*Cucurbita maxima* L.) از بازار محلی آزادشهر (استان گلستان) خریداری شد. در مرحله بعد دانه‌ها به‌صورت دستی جداسازی و به مدت ۷۲ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشک شدند (۱۵). آنزیم پپسین و تریپسین، دی کلرید آهن، فریک کلراید، DPPH، تری کلرواستیک اسید (TCA)، فروزین و فری‌سیانیدسدیم از شرکت سیگما و سود، اسیدکلریدریک، اتانول ۹۶ درصد، اسیدسولفوریک، هگزان، فسفات سدیم و آمونیوم مولیبدات، معرف متیل رد از شرکت مرک تهیه شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: جهت اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی دانه کدو و ایزوله پروتئینی دانه کدو شامل رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی از روش AOAC (۲۰۰۳) استفاده شد (۱۹).

تولید ایزوله پروتئینی دلنه کدو: دلنه‌های کدو پس از خشک شدن توسط آسیاب به پودر تبدیل شده و پس از عبور از الک شماره ۵ (شرکت اطلس، دهانه چشمه ۶۳ میکرون) با حلال هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی- وزنی) مخلوط شده و عمل چربی‌گیری به مدت ۲۴ ساعت تا رسیدن به چربی زیر ۵ درصد انجام گرفت. جهت خروج حلال باقیمانده در کنجاله، کنجاله چربی‌گیری شده به مدت ۲۴ ساعت در آون (ممرت، آلمان) در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. کنجاله روغن‌گیری شده به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی- حجمی) با آب‌مقطر مخلوط و با کمک سود ۱ نرمال pH آن بر روی ۱۱ تنظیم گردید و مخلوط در دمای آزمایشگاه توسط همزن مکانیکی به مدت ۱ ساعت هم‌زده شد. پس‌ازآن به کمک سانتریفیوژ (هانیل، کره جنوبی) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۲۰ دقیقه و با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه محلول رویی جداسازی شد باقی‌مانده به‌دست‌آمده جدا و در آب مقطر حل و پس از تنظیم pH بر روی ۱۱ استخراج پروتئین دوباره تکرار شد. در مرحله بعد، سوپرناتانت‌ها جمع‌آوری و با یکدیگر مخلوط شده و با استفاده از اسیدکلریدریک (۱ نرمال) pH آن روی ۴ تنظیم شده و عمل سانتریفیوژ با شرایط قبلی تکرار شد. درنهایت رسوب حاصل جداسازی و توسط خشک‌کن انجمادی (آپرون، کره جنوبی) خشک (۲ میلی متر جیوه، ۴۰- درجه سانتی گراد) و در ظروف دربسته و تا زمان استفاده در یخچال خنک نگه‌داری شد (۱۵).

تهیه پروتئین هیدرولیز دانه کدو: جهت انجام هیدرولیز از دو آنزیم تریپسین و پپسین به صورت ساده و ترکیبی استفاده شد. در ابتدا جهت دستیابی به زمان مناسب هیدرولیز ساده از دو آنزیم مذکور به‌صورت جداگانه در شرایط دما و pH مناسب هر آنزیم (تریپسین pH ۸ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و پپسین در pH ۲ و دمای ۳۷ درجه سانتیگراد)، نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و در طی زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه هیدرولیز صورت گرفت. در انتهای هر تیمار زمانی، جهت توقف فعالیت آنزیمی از حرارت دهی به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد استفاده شد. پس از سرد شدن هیدرولیز شده ها عملیات سانتریفوژ در دور ۶۰۰۰ rpm به مدت ۲۰ دقیقه صورت گرفت. در مرحله بعد پروتئین‌های هیدرولیز شده (موجود در بخش روماند) در زمان‌های مختلف از نظر قابلیت آنتی‌اکسیدانی توسط روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل بررسی و زمان مناسب جهت هیدرولیز انتخاب گردید. در مرحله بعد جهت مقایسه هیدرولیز ساده و ترکیبی، عمل هیدرولیز در طی زمان بهینه مشخص شده (۱۸۰ دقیقه) با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۲ درصد و در دمای بهینه هر آنزیم (۳۷ درجه سانتی‌گراد) انجام گرفت. جهت هیدرولیز از دو آنزیم

تریپسین (pH=۸) و آنزیم پپسین (pH=۲) به‌صورت هیدرولیز ساده و ترکیبی و بر اساس تیمارهای مشخص شده در جدول ۱ استفاده شد.

جدول ۱- تیمارهای هیدرولیز ساده و ترکیبی مورد استفاده

Table 1- simple and sequential hydrolysis treatments

شماره تیمار Treatment No.	نوع تیمار Treatment type
T1	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به‌مدت ۹۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ۹۰ دقیقه Hydrolysis with trypsin for 90 min then with pepsin for 90 min
T2	هیدرولیز با آنزیم پپسین به‌مدت ۹۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ۹۰ دقیقه Hydrolysis with pepsin for 90 min then with trypsin for 90 min
T3	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به‌مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ٦۰ دقیقه Hydrolysis with trypsin for 120 min then with pepsin for 60 min
T4	هیدرولیز با آنزیم پپسین به‌مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ٦۰ دقیقه Hydrolysis with pepsin for 120 min then with trypsin for 60 min
T5	هیدرولیز با آنزیم تریپسین به‌مدت ۱۸۰ دقیقه (هیدرولیز ساده) Hydrolysis with trypsin for 180 min (simple hydrolysis)
T6	هیدرولیز با آنزیم پپسین به‌مدت ۱۸۰ دقیقه (هیدرولیز ساده) Hydrolysis with pepsin for 180 min (simple hydrolysis)

پس از اتمام زمان هیدرولیز توسط هر آنزیم به‌منظور غیرفعال کردن آن، روش حرارت دهی استفاده شد به‌طوری که محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه‌سانتی‌گراد در حمام آب (ممرت، آلمان) قرار داده شد. هر تیمار به‌طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال‌دار در دمای ٤ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از تیمارهای مختلف (سوپرناتانت) توسط چهار روش ذیل اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه شد. تیمارهای مورد استفاده در هیدرولیز ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز ساده به شرح جدول ۱ مشخص گردید.

بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: از روش چی و همکاران (۲۰۱۵) جهت بررسی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده شد (۲۰). برای این منظور، محلول حاوی پروتئین هیدرولیزشده در آب مقطر (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از این محلول با ۱/۵ میلی‌لیتر محلول اتانولی DPPH (با غلظت ۰/۱۵ میلی‌مولار) افزوده و مخلوط پس از ورتکس شدن، به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس لوله‌های آزمایش در یک محل تاریک به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. پس از اتمام این مدت، توسط اسپکتروفوتومتر (پی جی اینسترومنت، انگلستان) در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر میزان جذب نمونه‌ها خوانده شد. لازم به ذکر است که در این آزمون در نمونه کنترل به جای نمونه، حجم یکسانی از آب مقطر با محلول DPPH مخلوط گردید. در نهایت درصد مهار رادیکال‌های DPPH مخلوط توسط معادله ۱ محاسبه گردید.

$$\text{درصد مهار رادیکال آزاد} = (\frac{Ac-As}{Ac})\times 100$$

معادله ۱

که در این رابطه A_c و A_s به ترتیب جذب کنترل و جذب نمونه می‌باشند.

قدرت احیاء یون آهن: از روش بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹) برای تعیین قدرت احیاء یون آهن نمونه‌ها استفاده شد (۲۱). برای این منظور، ابتدا محلول حاوی

پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس ۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد و ۲/۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=٦/٦) مخلوط گردید و در انکوباتور(ویژن، کره جنوبی) در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. در مرحله بعد به این مخلوط، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط گردید. سپس مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و در نهایت جذب نمونه در طول موج ۷۰۰ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. حجم یکسانی از آب‌مقطر به‌جای نمونه برای تهیه‌ی نمونه کنترل استفاده شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: از روش پریتو و همکاران (۱۹۹۹) جهت تعیین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل استفاده شد (۲۲). برای انجام این آزمون ابتدا مخلوط حاوی پروتئین هیدرولیزشده در آب مقطر (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) تهیه شد. سپس معرف (اسیدسولفوریک ۰/٦ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ٤ میلی‌مولار) مورداستفاده تهیه و در مرحله بعد ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه محلول پروتئین هیدرولیز شده با ۱ میلی‌لیتر از معرف در لوله اپندورف ریخته و در دمای ۹۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب قرار داده شد. پس از سرد شدن نمونه‌ها، میزان جذب آن‌ها توسط اسپکتروفتومتر در طول‌موج ٦۹۵ نانومتر خوانده شد و نتایج به‌صورت جذب در این طول‌موج گزارش شد. از آب‌مقطر دو بار تقطیر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. در این آزمون جذب بالاتر معادل ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است.

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن: ابتدا، ۱ میلی‌لیتر نمونه حل‌شده در آب مقطر (۵۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۰/۰۵ میلی‌لیتر محلول دی کلرید آهن (۲Mm) و ۱/۸۵ میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر مخلوط شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر محلول فروزین (۵Mm) افزوده و مخلوط به‌شدت هم‌زده شد. پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، جذب نمونه‌ها در طول‌موج ٥٦٢ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر خوانده شد. به‌عنوان نمونه شاهد از آب دو بار تقطیر استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد (۲۳).

معادله۲

$$\text{Chelating effect (\%)} = ((A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})/A_{\text{control}}) \times 100$$

در این معادله، $A_{control}$ برابر جذب شاهد و A_{sample} برابر جذب نمونه می‌باشد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز به‌صورت ساده و ترکیبی توسط دو آنزیم پپسین و ترپسین (۳۰، ٦۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه کدو بر اساس طرح کاملاً تصادفی با کاربرد آنالیز واریانس یک‌طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱٦ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel 2016 انجام گرفت.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی کنجاله کدو و ایزوله پروتئینی: نتایج آنالیز ترکیب شیمیایی کنجاله چربی‌گیری‌شده و ایزوله پروتئینی دانه کدو مورد استفاده در جدول ۲ آورده شده است.

جدول ۲-ترکیب شیمیایی کنجاله چربی گیری شده دانه کدو و ایزوله پروتئینی دانه کدو

Table 1- chemical composition of defatted pumpkin seed meal and pumpkin seed protein isolate

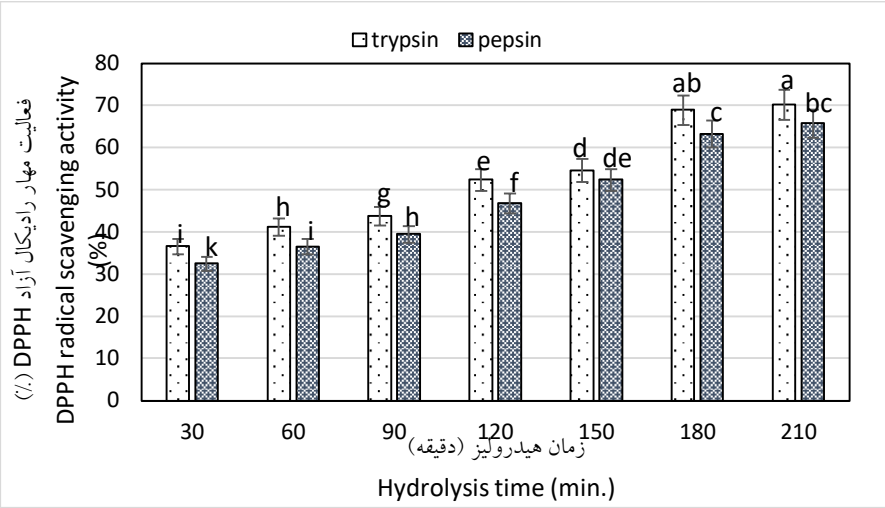
ترکیب شیمیایی Chemical composition	میزان (٪) Amount (%)	
	کنجاله چربی گیری شده دانه کدو Defatted pumpkin seed meal	ایزوله پروتئینی دانه کدو Pumpkin seed protein isolate
پروتئین Protein	49.57 ± 1.15	89.57 ± 0.89
چربی Fat	3.2 ± 0.25	0.75 ± 0.05
خاکستر Ash	5.85 ± 0.22	1.85 ± 0.1
رطوبت Moisture	6.5 ± 0.57	3.45 ± 0.24
کربوهیدرات (با روش تفاضل) Carbohydrate by Diff	34.88 ± 1.34	4.38 ± 0.35

مقادیر شامل میانگین ± انحراف استاندارد ۳ تکرار می‌باشد.

نورمحمدی و همکاران (۱۳۹۵) میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر کنجاله دانه کدو را به ترتیب ٤۸/۵۷، ۸/۹۳، ٦/۲٤ و ۷/۱۱ درصد گزارش نمودند (۲٤). مظلومی و صادقی ماهونک (۱۳۹٦) میزان پروتئین، چربی، رطوبت، خاکستر کربوهیدرات را در آرد چربی‌گیری شده دانه کدو به ترتیب ٤۸/۵۷، ۱۰/۳۲، ٤/۲٤، ٦/۰۵ و ۳۰/۸۳ درصد و در ایزوله پروتئینی دانه کدو به ترتیب میزان ۸۷/۵۵، ۱/۷۹، ۱/۰۱، ۱/٦ و ۸/۰۵ درصد گزارش نمودند (۲۵). مقادیر به‌دست‌آمده در این تحقیق با مقادیر گزارش شده توسط این محققین همخوانی دارد. دلیل تفاوت در میزان چربی با مقادیر گزارش شده احتمالاً به دلیل تفاوت در فرآیند چربی‌گیری مورد استفاده در این تحقیق است.

قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط هیدرولیز ساده

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: میزان مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (برحسب درصد) تحت تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین) در شکل ۱ آورده شده است.



شکل ۱- میزان مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (بر حسب درصد) تحت تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین)

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

براساس نتایج به‌دست‌آمده بین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و زمان هیدرولیز رابطه مستقیمی برقرار است. میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های هیدرولیز شده با تریپسین بالاتر از نمونه‌های هیدرولیز شده با پپسین بود. DPPH رادیکال آزاد محلول در چربی است که در طول‌موج ۵۱۷ نانومتر حداکثر میزان جذب را نشان می‌دهد اما درنتیجه واکنش با یک ترکیب آنتی‌اکسیدان و دریافت هیدروژن از آن به ترکیبی پایدار تبدیل و کاهش جذب در آن ایجاد می‌شود (۲۶). نتایج حاصل از ارزیابی تأثیر زمان هیدرولیز بر روی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد که این قابلیت در پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه کدو با پیشرفت زمان هیدرولیز به میزان قابل توجهی افزایش یافت ($p<0/05$)، به طوریکه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در مورد نمونه‌های حاصل از پپسین در محدوده‌ی ۶۵/۷۰–۳۲/۴۵ درصد در تریپسین در محدوده ۷۰/۱۵–۳۶/۰۶ درصد بود. بین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های حاصل از زمان‌های هیدرولیز ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

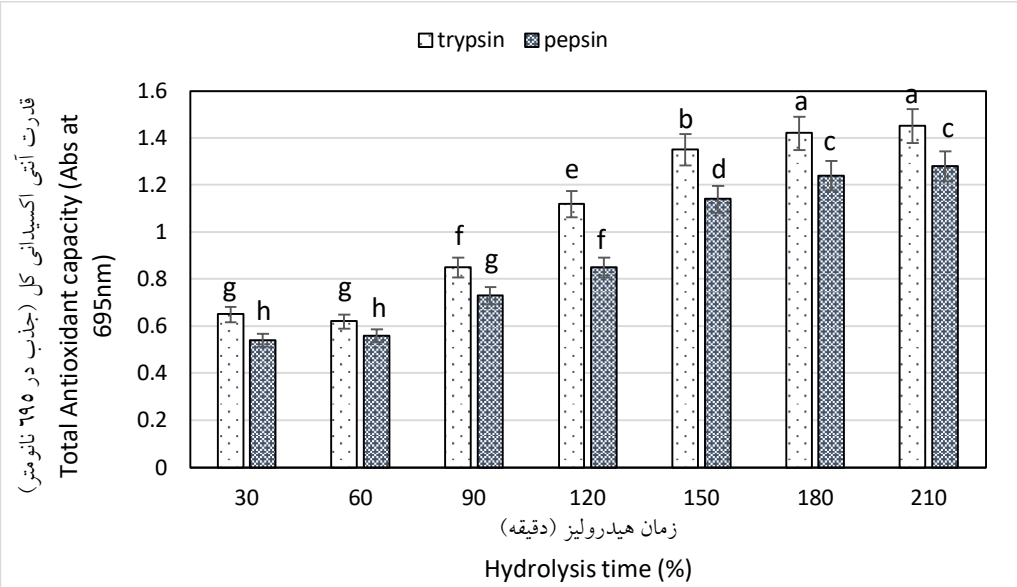
بنابراین با توجه به نتایج حاصل می‌توان بیان نمود که پیشرفت فرآیند هیدرولیز در طی زمان فرآیند منجر به تولید میزان بیشتری از پپتیدهای دهنده‌ی پروتون شده که می‌توانند با رادیکال آزاد DPPH، واکنش داده و آن را به ترکیبات پایدار تبدیل کنند و موجب اختتام واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی گردند. با توجه به شکل ۱، بین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی دانه کدو حاصل از آنزیم پپسین و تریپسین تفاوت معنی‌داری وجود داشت و نمونه‌های حاصل از فعالیت تریپسین دارای قدرت مهارکنندگی بالاتری بودند به‌طوری‌که پس ۲۱۰ دقیقه هیدرولیز قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین و پپسین به ترتیب به ۷۰/۱۵ و ۶۵/۷ درصد رسید. اندازه‌ی متفاوت پپتیدهای‌تولیدی، تفاوت در ترکیب و توالی اسیدآمینه در پپتیدهای حاصل از فعالیت این دو آنزیم (به دلیل درجه هیدرولیز متفاوت) می‌تواند علت این امر باشد (۲۷). بر اساس نتایج یک تحقیق بر روی هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی[1]، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش یافت. این محققین دلیل این مساله را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن با توانایی ترکیب با رادیکال‌های آزاد بیان کردند (۲۸). رابطه‌ی مستقیمی بین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و درجه هیدرولیز در طی فرآیند هیدرولیز پروتئین‌های ماهی تیان، بادام‌زمینی و کلاژن خوکی گزارش شده است (۱۲،۲۳، ۲۶). احتمالاً بالاتر بودن فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های حاصل از فعالیت آنزیم تریپسین نسبت به آنزیم پپسین ناشی از تأثیر مطلوب آنزیم تریپسین به‌عنوان یک لندوپپتیداز در رهایش پپتیدهایی باقابلیت مهارکنندگی رادیکال محلول در چربی DPPH می‌باشد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو تحت تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین) در شکل ۲ آورده شده است. بر اساس نتایج (شکل ۲)، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۲۱۰ دقیقه ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (بر اساس جذب در طول‌موج ۶۹۵ نانومتر) – در مورد هر دو نوع آنزیم روند صعودی نشان داد و این شاخص در هیدرولیز شده‌های حاصل از آنزیم تریپسین نسبت به پپسین بالاتر بود. تفاوت در محتوی اسیدآمینه و ترکیب پپتید تولیدشده به خاطر ویژگی اختصاصی هر آنزیم دلیل احتمالی تفاوت در قابلیت آنتی اکسیدانی محصول تولیدی توسط هر

[1] *Apanopus carbo*

آنزیم می‌باشد (۲۹). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو در نمونه‌های حاصل از آنزیم‌های پپسین در محدوده‌ی ۱/۲۸-۰/٥٤ و در مورد تریپسین در محدوده ۱/٤٥-۰/٦٥ (جذب در ٦۹٥ نانومتر) بود. بین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل از هردو آنزیم در زمان‌های هیدرولیز ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود نداشت. گزارش شده است که باگذشت زمان هیدرولیز به دلیل پیشرفت فرآیند هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی تغییر می‌نماید و این امر تأثیر قابل توجهی در قدرت ضد اکسایش آن دارد به‌طوری‌که مشخص شده است که پپتیدهای تولیدی با وزن مولکولی کمتر دارای قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند (۳۰).

نورمحمدی و همکاران (۱۳۹٦) در تحقیق خود در زمینه هیدرولیز پروتئین دانه کدو توسط آنزیم تریپسین گزارش نمودند که با افزایش زمان هیدرولیز به دلیل تولید پپتیدهای با اندازه کوچک‌تر قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کدو افزایش یافت (۳۱). کاوه و همکاران (۱۳۹۸) بر روی تحقیقی بر روی هیدرولیز پروتئین‌های شنبلیله توسط آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز گزارش کردند که با افزایش مدت‌زمان هیدرولیز و پیشرفت فرآیند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل محصول تولیدی افزایش می‌یابد (۳۲). اعتقاد بر این است که رهاسازی پپتیدهای با خاصیت الکترون‌دهندگی با افزایش مدت‌زمان فعالیت آنزیم، افزایش می‌یابند و این ترکیبات می‌توانند با رادیکال‌های آزاد ترکیب شده و و با ایجاد ترکیبات پایدار موجب افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها گردند (۳۳).



شکل۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو (جذب در طول موج ٦۹٥ نانومتر) تحت تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم (تریپسین و پپسین)

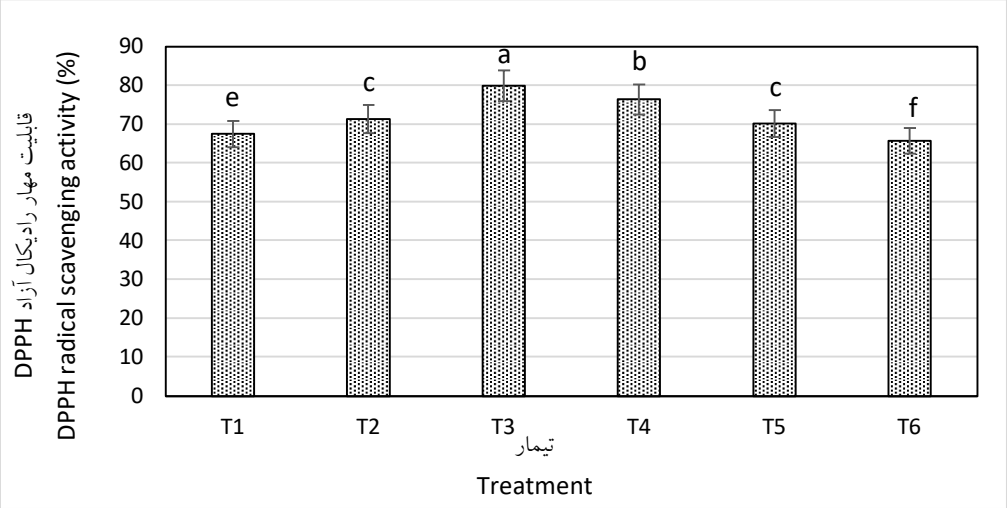
*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹٥٪ است.

با توجه به نتایج حاصل از این دو آزمون آنتی اکسیدانی و بررسی تأثیر زمان و نوع آنزیم مشخص شد که زمان‌های هیدرولیز بالاتر موجب بروز قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر در محصول تولیدی می‌گردند. با توجه به این‌که در این دو آزمون آنتی‌اکسیدانی بین زمان‌های ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری ملاحظه نشد و با توجه به لزوم استفاده از زمان‌های کوتاه‌تر به دلیل ملاحظات اقتصادی، زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه

به‌عنوان زمان مناسب جهت هیدرولیز ترکیبی در مرحله بعدی انتخاب شد.

قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو توسط هیدرولیز ترکیبی

قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH: قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۳ آورده شده است.



شکل ۳ -قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده

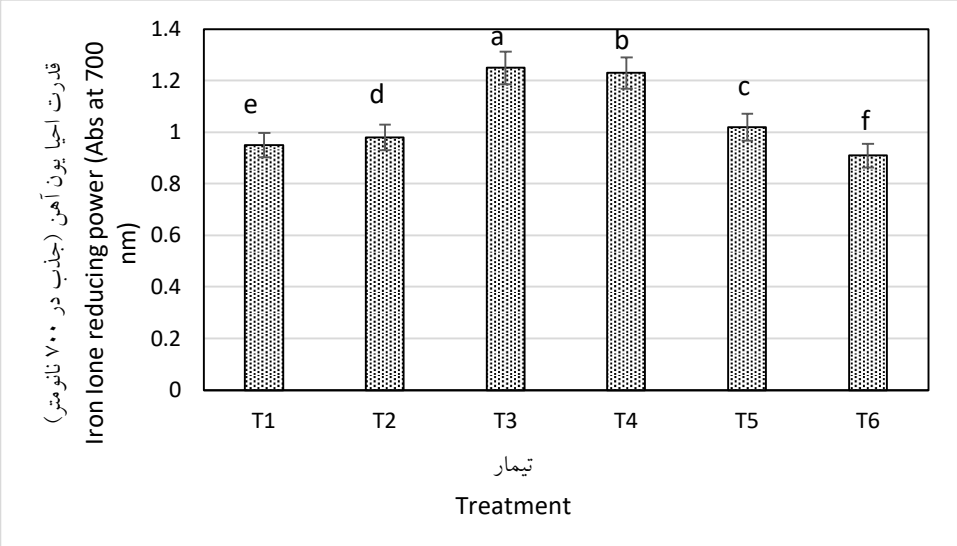
*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

بر اساس نتایج، هیدرولیز ترکیبی منجر به بهبود قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت هیدرولیز ساده گردید. بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار ۳ (هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ٦٠ دقیقه) به میزان ۷۹/۸۵ درصد مشاهده شد. علت افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH می‌تواند ناشی از تفاوت در ترکیب، توالی و اندازه‌ی متفاوت پپتیدهای حاصل از فعالیت ترکیبی دو آنزیم باشد (۲۷). تریپسین یک اندوپپتیداز به شمار می‌رود و پیوندهای پپتیدی را عمدتاً از داخل زنجیره می‌شکند. تریپسین پیوندهای پپتیدی را از انتهای کربوکسیلی اسیدهای آمینه لایزین و آرژنین می‌شکند اما در صورت وجود یک اسیدآمینه اسیدی در انتهای کربوکسیلی زنجیره، عمل هیدرولیز کند شده و در صورت وجود اسیدآمینه پرولین این فرایند متوقف خواهد شد. مکانیزم عمل تریپسین مانند سایر پروتئازهای سرینی است. این آنزیم اثر خود را از طریق اسیدهای آمینه هیستیدین، آسپارژین و سرین موجود در محل فعال آنزیم اعمال می‌کند (۳٤). پپسین یک آنزیم هضم‌کننده از خانواده پروتئازهای آسپارتیک اسید و یکی از سه آنزیم اصلی فعال در سیستم هضم کننده بدن است. این آنزیم عمدتاً در شکستن پیوندهای پپتیدی در اسیدهای آمینه آروماتیک و آب گریز مانند فنیل‌آلانین، تریپتوفان و تیروزین مؤثر است (۳۵).

هر آنزیم از نظر رهایش اسیدهای آمینه خاص (لیپوفیل یا هیدروفیل) عملکرد متفاوتی دارد که این امر می‌تواند بر مهار رادیکال‌های آزاد و قابلیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی مؤثر باشد. پپتیدهای تولیدی می‌توانند به‌واسطه اهداء اتم هیدروژن به رادیکال‌های آزاد فرآیند اکسیداسیون را متوقف یا کند نمایند همچنین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH به فعالیت هیدروژن‌دهندگی گروه هیدروکسیل آمینواسیدهای آروماتیک وابسته است بنابراین

وجود و یا عدم وجود آمینواسیدهای مذکور در پپتیدها بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH متفاوت است. بنابراین شرایط مختلف هیدرولیز و عمل آنزیم‌های متفاوت در هیدرولیز پلی‌پپتیدها می‌تواند سبب ایجاد محصول هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت گردد (۳٦). با توجه به محل تأثیر متفاوت این دو آنزیم، به نظر می‌رسد که هیدرولیز ترکیبی باعث ایجاد مخلوط پپتیدی با توالی و ترکیب اسیدآمینه باقابلیت آنتی اکسیدانی مناسب گردیده است. بینگ و همکاران (۲۰۲٤) گزارش کردند که تأثیر آنزیمی پروتئازهای خاص بر روی مکان‌های متفاوت پروتئین منجر به تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی‌ها و عملکرد متفاوت می‌گردد (۲۹).

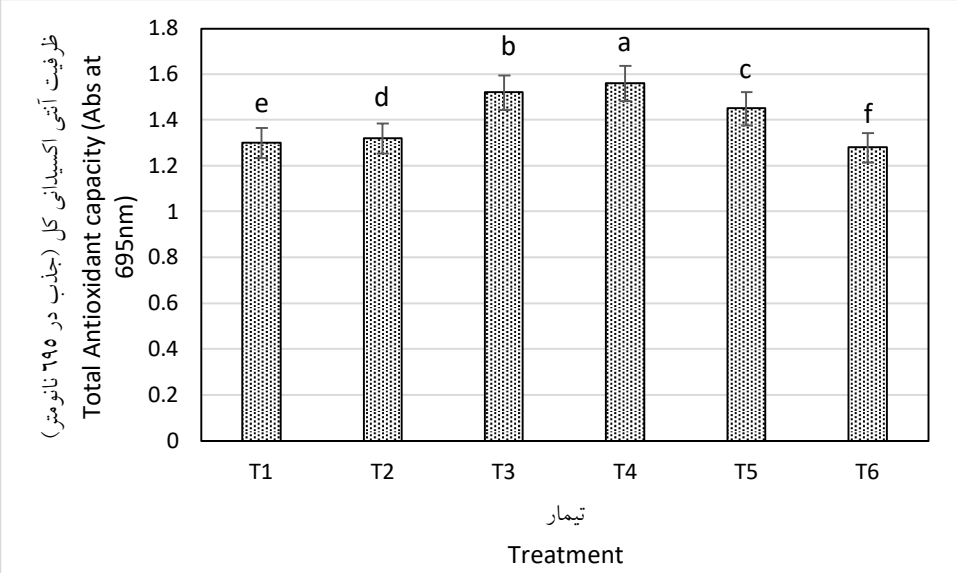
قدرت احیاء یون آهن: قدرت احیاء یون آهن تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ٤ آورده شده است. بر اساس نتایج، قدرت احیاء یون آهن تیمارها در روش هیدرولیز ترکیبی نسبت هیدرولیز ساده بالاتر بود. بالاترین میزان قدرت احیاء یون آهن در تیمار ۳ (هیدرولیز با آنزیم تریپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با پپسین به مدت ٦۰ دقیقه) به میزان ۱/۲۵ (جذب در ۷۰۰نانومتر) مشاهده شد. دلایل مختلفی برای این مساله ذکر گردیده است ازجمله، افزایش شدت هیدرولیز منجر به افزایش میزان اسیدهای آمینه آزاد می‌گردد که می‌توانند به‌عنوان منبع اضافی از پروتون‌ها و الکترون‌ها عمل نمایند. ازطرف‌دیگر پیشرفت هیدرولیز منجر به در معرض قرار گرفتن بیشتر اسیدهای آمینه دهنده الکترون مانند هیستیدین، تریپتوفان و لیزین می‌گردد در که نتیجه موجب افزایش قدرت احیاء کنندگی یون آهن می‌گردد (۳۷). آمبی گاپالان و همکاران (۲۰۱۵) پروتئین‌های آرد هسته خرما با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلاوورزایم (Flavourzyme) و ترمولیزین (Thermolysin) به‌صورت مجزا یا در ترکیب با هیدرولیز نمودند. در بین تیمارهای مختلف کمترین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز بود درحالی‌که بیشترین قدرت احیاء در تیمارهای آنزیمی ترکیبی مشاهده شد (۳۸).



شکل٤- قدرت احیاء یون آهن تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ۵ آورده شده است. بر اساس نتایج، هیدرولیز ترکیبی می‌تواند منجر به بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نسبت هیدرولیز ساده گردد. بالاترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمار ٤ (هیدرولیز با آنزیم پپسین به‌مدت ۱۲۰ دقیقه سپس با تریپسین به مدت ٦۰ دقیقه) به میزان ۱/٥٦ (جذب در ٦۹٥ نانومتر) مشاهده شد. نتایج به دست آمده نشان داد که دو تیمار هیدرولیز ترکیبی با دو آنزیم پپسین و تریپسین (۳ و ٤) نسبت به هیدرولیز هرکدام (تیمار ٥ و ٦) به تنهایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری را دارد. درواقع با فعالیت توأم آنزیم‌های تریپسین و پپسین، رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی افزایش یافته است که این پپتیدها قادرند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آن‌ها را به ترکیباتی پایدار با واکنش‌پذیری کمتر تبدیل کنند (۲٦).

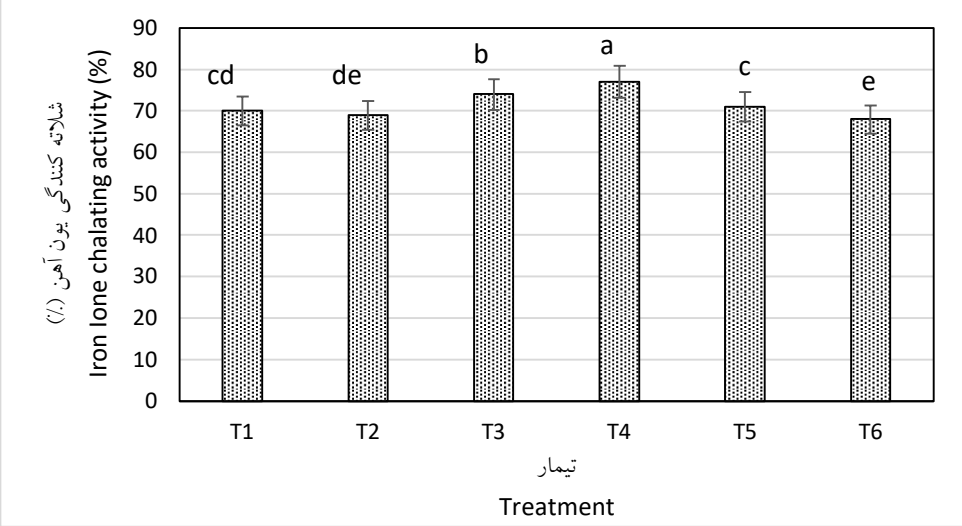


شکل ٥- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹٥٪ است.

بر اساس پژوهش‌های پیشین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به ترکیب آن‌ها وابسته است. به‌عنوان مثال، تری پپتیدهای حاوی تریپتوفان یا تیروزین در انتهای کربوکسیل زنجیره پپتیدی قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی را نشان می‌دهند. تفاوت ترکیب آمینواسیدها در زنجیره‌های پپتیدی نیز سبب تغییر در ویژگی آنتی‌اکسیدانی می‌گردد (۲٤، ۳٤). ازآنجاکه هر آنزیم تأثیر متفاوتی بر آزادسازی اسیدهای آمینه خاص دارد و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد شده تأثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها دارد، در نتیجه فعالیت بالاتر در مهار برخی رادیکال‌های آزاد توسط هیدرولیز شده‌های حاصل از یک آنزیم نسبت به هیدرولیزات حاصل از آنزیم‌های دیگر ممکن است در خصوص همه شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی و انواع رادیکال‌ها صدق نکند (۲۹) که این امر احتمالاً دلیل فعالیت بالاتر تیمار ٤ در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نسبت به دو آزمون قبلی (که تیمار ۳بالاترین میزان را نشان داد) می‌باشد.

فعالیت شـــلاته‌کنندگی یون آهن: فعالیت شـــلاته کننـدگی یون آهن در تیمـارهـای هیـدرولیز آنزیمی ترکیبی (T1 الی T4) در مقایســـه با هیدرولیز آنزیمی ساده (T5 و T6) در شکل ٦ آورده شده است.



شکل ٦- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در تیمارهای هیدرولیز آنزیمی ترکیبی در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی ساده

*حروف متفاوت روی هر ستون نشاندهنده وجود تفاوت معنی‌دار در سطح ۹۵٪ است.

براساس نتایج، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در تیمارهای ۳ و ٤ هیدرولیز ترکیبی نسبت مقادیر آن در تیمارهای هیدرولیز ســاده بالاتر بود، هرچند بین تیمار ۱ و ۵ و همچنین بین تیمارهای ۲ و ٦ اختلاف آماری معنی‌داری وجود نداشت. بالاترین میزان فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار ٤ (هیدرولیز با آنزیم پپسین به مدت ۱۲۰ دقیقه ســپس با تریپســین به مدت ٦۰ دقیقه) به میزان ۷۷ درصـــد مشـــاهده شـــد. قدرت شـــلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصـــل از برخی تیمارهای هیـدرولیز ترکیبی بیشـــتر از هیـدرولیز بـا هریـک از آنزیم‌هـا بـه تنهـایی بود، درواقع این نتـایج بیـانگر این است که ترکیب مناسب (از نظر زمان و توالی استفاده) آنزیم تریپســـین با پپســـین قادر به تولید پپتیدهایی با زنجیره‌ی جـانبی متفـاوت و بـاقـابلیـت بـه دام انـدازی فلزات اســـت. پپتیـدهـایی کـه در توالی خود دارای اسـیدهای آمینه هیسـتیدین و تریپتوفان هسـتند به دلیل وجود حلقـه‌ی ایمیـدازول در این اســـیـدهـای آمینـه، توانایی به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد و شـلاته‌کنندگی مناســـبی دارند بنابراین احتمالاً هیدرولیز ترکیبی منجر به تولید پپتیدهایی با این ویژگی ترکیبی می‌گردد و به همین دلیل قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است. علاوه بر این کارایی شلاته‌کنندگی یون آهن در پپتیدهای حاصـــل از هیدرولیز آنزیمی را می‌توان به وجود گروه‌های آمینو و کربوکســـیلیک (به ترتیب در شاخه‌های اسیدهای آمینه بازی و اسیدی) و حذف یون‌های پرواکسیدان فلزی از محیط نسبت داد (۳۹). در تحقیقی دیگر هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های موجود در آرد هســـته خرما با اســـتفاده از آنزیم‌های مختلف و ترکیب آن‌ها بررسی شـد. نتایج نشـان دادند که هیدرولیز شـــده‌های حاصـــل از فعالیت ترکیبی از آلکـالاز، فلاوورزیم و ترمولیزین از کمترین قـدرت شلاته‌کنندگی (۱۵ mM معادل EDTA بر گرم پروتئین) برخوردار بودنـد. امـا اســـتفـاده از ترکیـب آلکـالاز، فلاوورزیم بالاترین اثر را (۷۲ mM معادل EDTA بر گرم پروتئین) در مهـار یون آهن داشـــتنـد (۳۳). به‌طورکلی عوامل مؤثر در بهبود ویژگـــی شـــلاته کننـــدگی عبارتند از اندازه، ساختار و یا وجود توالی ویژه در پروتئین‌هـــای هیدرولیزشـده. در پژوهشـی

پیرامون هیدرولیز پروتئین بذرکتان اثر نوع آنزیم بر شلاته کنندگی یون آهن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد شلاته‌کنندگی یون آهن در پروتئین هیدرولیزشده توسط آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در بیشترین مقدار و در پروتئین هیدرولیزشده توسط فلاورزایم در کمترین مقدار بود (٤٠).

نتیجه‌گیری

بخش اعظم دانه‌های کدو به شکل آجیل مورداستفاده قرارمی‌گیرند و بخشی از آن نیز جز ضایعات کشاورزی محسوب می‌شود. ازآنجایی‌که این ضایعات از اهمیت تغذیه‌ای بالایی برخوردار هستند و دفع‌کردن آن‌ها از نظر زیست‌محیطی مشکل و از نظر اقتصادی هزینه بر می‌باشد و از طرفی با اتلاف مواد مغذی با ارزش نیز همراه است بنابراین تحقیقات زیادی در راستای تبدیل ضایعات تولید شده به محصولات مفید و استفاده از آن‌ها به‌عنوان ماده اولیه صنایع دیگر یا جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان صورت‌گرفته است. با توجه به این‌که آنزیم‌های مختلف بر روی یک سوبسترای یکسان دارای اثرات متفاوتی هستند و با توجه به این که ادعا شده است که ترکیب آنزیم موجب بهبود ویژگی‌های زیست فعالی محصول حاصل می‌گردد بنابراین هدف این پژوهش مقایسه تأثیر هیدرولیز آنزیمی ساده و ترکیبی بر روی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو بود. نتایج نشان داد که در بین تیمارهای مورد استفاده تیمارهای هیدرولیز ترکیبی ۳ و ٤ در مقایسه با تیمارهای هیدرولیز ساده (۵ و ٦) قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری از خود نشان می‌دهند به‌طوری‌که بالاترین میزان قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار هیدرولیز ترکیبی ٤ و پایین‌ترین میزان آن‌ها در تیمار هیدرولیز ساده ٦ مشاهده شد. احتمالاً دلیل تأثیر بالاتر هیدرولیز ترکیبی دو آنزیم به دلیل تفاوت در میزان هیدرولیز و در نتیجه ایجاد پپتیدهای متفاوت از نظر اندازه، ترکیب و توالی می‌باشد به‌طوری‌که پپتیدهای حاصل از قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند.

منابع

1 Xu X, Sharma, P, Shu S, Li TS, Ciais P, Tubiello FN, Smith P, Campbell N, Hian AK. (2021). Global greenhouse gas emissions from animal-based foods are twice those of plant-based foods. *Nat Food*, *2*, 724–732.

2. Wouters AGB, Rombouts I, Lagrain B, Delcour JA. (2016). Impact of casein and egg white proteins on the structure of wheat gluten-based protein-rich food. *J Sci Food Agric*, *96*:757–63.

3.Lusk JL, Norwood FB. (2009). Some economic benefits and costs of vegetarianism. *Agr Resource Econ Rev*, *38*:109–24.

4.Friedman M. (1999). Chemistry, biochemistry, nutrition, and microbiology of lysinoalanine, lanthionine, and histidinoalanine in food and other proteins. *J Agric Food Chem*, *47*:1295–319.

5.Garcia MC, Puchalska P, Esteve C, Marina ML. (2013). Vegetable foods: a cheap source of proteins and peptides with antihypertensive, antioxidant, and other less occurrence bioactivities. *Talanta*, *106*:328–49.

6.Cheng, S., Tu, M., Liu, H., Zhao, G., Du, M. (2019). Food-derived antithrombotic peptides: Preparation, identification, and interactions with thrombin. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, *59* (sup1), S81-S95.

7.Tung, Y. T., Chen, H. L., Wu, H. S., Ho, M. H., Chong, K. Y., Chen, C. M. (2018). Kefir peptides prevent hyperlipidemia and obesity in high-fat-diet-induced obese rats via lipid metabolism modulation. *Molecular Nutrition and Food Research.* 62(3): 1–9.

8.Sun Q, Shen H, Luo Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*. 48(1):53-60.
9.Yang, B., Yang, H., Li, J., Li, Z., & Jiang, Y. (2011). Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees. *Food Chemistry.* 124(2):551-555.
10.Zapadka, K.L., Becher, F.J., Santos, A.L.G., Jackson, S.E., Jackson, S.E. (2017). Factors affecting the physical stability (aggregation) of peptide therapeutics. *Int. Focus*, *7* (6), 20170030.
11.Samaee, S.P., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A.R., & Alami, M. (2021). Investigation of functional and antioxidant properties of faba bean protein hydrolysates using combines hydrolysis. *Food Processing and preservation Journal. 12*(2), 25-38. (In Persian).
12.Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., & Wu, Y. (2007). Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chem.*, *102* (4), 1135-1143.
13.Lu, D., Peng, M., Yu, M., Jiang, B., Wu, H. and Chen, J. (2021). Effect of Enzymatic Hydrolysis on the Zinc Binding Capacity and in vitro Gastrointestinal Stability of Peptides Derived from Pumpkin (*Cucurbita pepo L.*) Seeds. *Front. Nutr., 8*:647782.
14.Rezig, L., Chibani, F., Chouaibi, M., Dalgalarrondo, M. l., Hessini, K., Guéguen, J., Hamdi, S. (2013). Pumpkin (*Cucurbita maxima*) seed proteins: sequential extraction processing and fraction characterization. *J. Agric. Food Chem*. 61 (32) 7715–7721.
15.Mazloomi, S.N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ranjbar-Nedamani, E., & Nourmohammadi,E. (2019). Production of antioxidant peptides through hydrolysis of Paper Skin Pumpkin Seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *ARYA Atherosclerosis*, *15*: 218-227.
16.Nourmohammadi, E, Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M. (2017). Amino acid composition and antioxidative properties of hydrolysed pumpkin (Cucurbita pepo L.) oil cake protein, *Int J Food Prop*, *20*:1-12.
17.Dyankova, S., et al. (2024). Optimization of the Process for Obtaining Antioxidant Protein Hydrolysates from Pumpkin Seed Oil Cake Using Response Surface Methodology. Applied Sciences, 14(5), 1967.
18.Lin, C. T., et al. (2024). Protein identification and potential bioactive peptides from pumpkin (*Cucurbita maxima*) seeds. *Food Science & Nutrition*, 12(8), 5388-5402.
19.Association of Official Agricultural Chemists. (2003). Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
20.Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T., & Ding, G. F. (2015). Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (Tegillarca granosa) muscle. *J Funct. Foods, 15*, 301-313.
21.Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (Mustelus mustelus) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem*., *114*(4), 1198-1205.
22.Prieto, P., Pineda, M., & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analyt. Biochem*, *269*(2), 337-341.
23.Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V., and Sharma, A., (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chem., 121*(1): 178-184.
24.Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A. R., Ghorbani, M., Alami, M., & Sadeghi, M. (2017). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *J Food Science and Technology., 61* (13), 123-130. (in Persian).

25. Mazloomi, S. N., & Sadeghi Mahoonak, A. R. (2017). Identification of the optimum conditions to anti-oxidative peptides production through the enzymatic hydrolysis of pumpkin oil cake protein by pepsin. *J Food Science and Technology*, *61*(13), 123-130. (in Persian).
26. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovat Food Sci Emer Techn., 10*(2): 235-240.
27. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P. V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., and Kumar, B. D. (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (Cyprinus carpio) egg. *Nutrition*, *31*(2): 388-398.
28. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., and Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem., 45*(1): 18-24.
29. Bing, S.-J., et al. (2024). Structural, functional and antioxidant properties of Lentinus edodes protein hydrolysates prepared by five enzymes. Food Chemistry, 437(1), 137805.
30. Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Hossieninan, F., Ghorbani, M., & Tsopmo, A. (2018). Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *J Food Sci Techn*., *55*: 3498–3507.
31. Nourmohammadi, E, Sadeghi Mahoonak, A.R., Alami, M., Ghorbani, M., Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 13 (1), 14-26.
32. Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., Jafari, S.M., & Sarabandi, K. (2019). Coparision between antioxidant properties of fenugreek seed proptein hydrolysate prepared by alcalase and pancreatin. *Innovation in Food Science and Technology Journal. 11* (4), 77-87. (in Persian)
33. Pan, X., Zhao, Y.-Q., Hu, F.-Y., and Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *J Func Foods, 25*:220-230.
34. Chen, Z., Li, W., Kumar, R., Cong, S., Xudong, W., Yue, G., Chunli, C., Xu, L., Chen, H., (2018). Bioactive peptide with antioxidant and anticancer activities from black Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] byproduct: isolation, identification and molecular docking study. *Eur. Food Res. Technol., 245* (3), 677–689.
35. Sun, J., He, H., Xie, J. B. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom Ganoderma lucidum. *J Agri Food Chem*, 21: 6646-6652.
36. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M., and Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chem., 109*: 144-148.
37. Wu, H-C., Chen, H-M., and Shiau CY. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int, 36*: 949-57.
38. Ambigaipalan P, Al-Khalifa AS, Shahidi F. (2015). Antioxidant and angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activities of date seed protein hydrolysates prepared using Alcalase, Flavourzyme and Thermolysin. *J Funct Foods.,18*:1125–37.
39. Liu Q, Kong B, Xiong YL, Xia X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine lasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. *Food Chem.,*118(2):403–10.
40. Karamac, M., Kosińska-Cagnazzo, A. and Kulczyk, A. (2016). Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. *Int J of Molecu Sci., 17*: 7.1027-1040.