

بررسی قابلیت اتصال به کلسیم پپتیدهای زیست فعال حاصل از پروتئین دانه‌ی گوجه

نسیم مشگین فر^{۱*}، علیرضا صادقی ماهونک^۲، بهروز اکبری^۳، محمد قربانی^۴،
فیدل تولدرا^۵

۱* دانشجوی دوره ی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲، ۴ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۳ دانشیار گروه آنالیز شیمیایی مواد غذایی، آزمایشگاه های مرجع وزارت بهداشت
۵ استاد موسسه ی علوم غذایی (تکنولوژی و شیمی مواد غذایی)، مرکز تحقیقات ملی اسپانیا (CSIC)
(تاریخ دریافت: ۹۵/۰۱/۱۰ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۲۰)

چکیده

پژوهش حاضر جهت بررسی قابلیت اتصال پروتئین آبکافت شده ی دانه ی گوجه با کلسیم انجام شد. آبکافت توسط آنزیم پپسین (۶۰۰U) صورت گرفت. برای دستیابی به بهترین بازده تولید کمپلکس و محتوی کلسیم متغیر زمان آبکافت و نسبت آنزیم به سوبسترا به ترتیب در محدوده ی ۱۸۰-۳۰ دقیقه و ۱-۳٪ انتخاب شدند. نتایج به دست آمده توسط روش سطح پاسخ نشان داد که افزایش میزان آنزیم اثر معناداری بر افزایش قابلیت اتصال پروتئین هیدرولیز شده داشت ($p < 0.05$). جهت بررسی ساختار کمپلکس پپتید-کلسیم و مقایسه ی آن با پپتید عاری از کلسیم از طیف نگاری مرئی-فرابنفش، مادون قرمز-تبدیل فوریه و فلورسنس استفاده شد. نتایج طیف نگاری فلورسنس حاکی از افزایش هیدروفوبیسیته سطحی نمونه ی پپتید عاری از کلسیم بود که این تجمعات آب گریز اثر مهمی در تشکیل اتصالات بینابینی و افزایش بازده تشکیل کمپلکس پپتید-کلسیم داشت. نتایج طیف نگاری مادون قرمز-تبدیل فوریه نیز نشان داد که گروه عاملی کربوکسیلات و گروه هیدروکسیل قابلیت مهمی در اتصال به کلسیم را دارا می باشند. همچنین تغییرات نوارهای جذبی مرئی-فرابنفش در کمپلکس پپتید-کلسیم نسبت به پپتید عاری از کلسیم بیانگر تشکیل اتصالات جدید در زنجیره های پپتیدی بود.

کلید واژگان: پپتید زیست فعال، پروتئین دانه ی گوجه، قابلیت اتصال با کلسیم.

۱- مقدمه

کربوکسیلیک می‌باشد که پتانسیل بالایی در شلاته کردن و ایجاد کمپلکس با کلسیم را دارا می‌باشد [۸]. تا کنون اثرات مثبت پتیدها ی زیست فعال بر جذب برون زیستی و درون زیستی مواد معدنی همانند کلسیم [۶] و آهن (۹) گزارش شده است. همچنین تحقیقاتی در رابطه با بررسی قابلیت اتصال به فلزمربوط به پپتیدهای حاصل از آبکافت پروتئین های گیاهی مانند، پروتئین جوانه ی گندم و پروتئین دانه ی سویا صورت گرفته است [۴ و ۱۰]. ارزیابی درصد بازده کمپلکس پپتید- کلسیم و میزان کلسیم جذب شده بیانگر کارایی بالای پپتیدهای زیست فعال در این رابطه می باشد. در این پژوهش تلاش خواهد شد تا با استفاده از اثر آنزیم آبکافت کننده ی پپسین بر پروتئین دانه‌ی گوجه فرنگی که از ضایعات صنایع تولید رب به حساب می‌آید، پپتیدهایی با فعالیت مناسب باند شدن با کلسیم تولید و اثر شرایط آبکافت شامل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت مذکور سنجیده شود.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

دانه‌ی گوجه فرنگی حاصل از صنایع تولید رب با روش برش سرد از کارخانه ی رب دلند خریداری گردید. آنزیم پپسین (۶۰۰U) حاصل از مخاط معده خوک از کمپانی سیگما آلدریچ (آمریکا) خریداری شد. کلیه‌ی مواد شیمیایی مورد نیاز با خلوص بالا تهیه گردیدند.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- استخراج پروتئین از دانه‌ی گوجه فرنگی

دانه‌ی گوجه فرنگی حاصل از فرآیند تهیه‌ی رب، از دیگر ضایعات گوجه فرنگی شامل پوست و مقادیر باقی مانده‌ی پالپ جدا خواهد شد و رطوبت آن تا حد ممکن کاهش می‌یابد. دانه‌های خشک شده پس از انتقال به آزمایشگاه به پودری یکنواخت تبدیل می‌گردند. پودر به دست آمده توسط هگزان به مدت زمان ۸ ساعت و در دمای اتاق بر طبق روش AOAC، چربی گیری شد [۱۱].

استخراج پروتئین از دانه‌ی گوجه فرنگی بر اساس روش حالیت قلیایی و ترسیب اسیدی به ترتیب در pH های ۱۱ و ۴، انجام شد [۱۲].

کلسیم یکی از عناصر معدنی مهم جهت برخی عملکردهای بیولوژیکی در بدن انسان می‌باشد که از آن جمله می‌توان به انقباض های ماهیچه ای، میتوز، انعقاد خون و شرکت در ساختار های اسکلتی بدن اشاره کرد. همچنین از نظر تغذیه ای جزء عناصر ضروری به حساب می‌آید [۱]. جذب ناکافی کلسیم عوارض مشخصی از جمله کاهش دانسیته‌ی استخوانی را در پی داشته که متعاقباً منجر به نرمی و پوکی استخوان می‌گردد. در حال حاضر کلسیم آلی به عنوان جایگزینی برای کلسیم معدنی توصیه می‌گردد و این موضوع به دلیل سمیت های بیولوژیکی کلسیم معدنی در غلظت های بالا و دسترسی زیستی کم آن در غلظت های پائین مطرح شده است [۲].

یون های کلسیم می توانند با برخی از لیگاندهای آلی تشکیل کمپلکس بدهند. این لیگاندهای آلی به صورت کلی بایستی دارای نواحی اتصال ویژه در ساختار خود داشته باشند از جمله ی این نواحی ها می‌توان به گروه‌های پلی کربوکسیلیک اسید و یا پلی فسفریک اسید اشاره کرد. این کمپلکس باید در مقابل از هم پاشیدگی ساختاری و جدا شدن ماده‌ی معدنی در طی عبور از دستگاه گوارش مقاوم باشد [۳].

در این راستا پپتیدهای زیست فعال، به عنوان ترکیبات شناخته شده‌ای که در اثر هیدرولیز منابع پروتئینی به وجود می آیند مورد توجه قرار گرفته‌اند. این ترکیبات قابلیت ایجاد اثرات سلامتی بخش مهم به واسطه‌ی تعدیل چندین مسیر فیزیولوژیکی را در داخل بدن دارند. نتایج تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که گروه های آمینو، کربوکسیل، تیول و ایمیدازول اسیدهای آمینه‌ی زنجیره های پپتیدی از عوامل موثر در شلاته کردن کلسیم به حساب می‌آیند [۴-۷].

دانه‌ی گوجه فرنگی محصولی است که به عنوان پسماند صنایع تولید رب به حساب می‌آید و با وجود پروفایل غنی اسیدچرب و پروتئین، در صنایع غذایی مورد استفاده قرار نمی‌گیرد. استفاده از پروتئین دانه گوجه فرنگی جهت آبکافت آنزیمی و تولید پپتیدهایی با فعالیت زیستی، روشی مناسب و بهینه در راستای استفاده از این فرآورده‌های جانبی و تولید محصولی با ارزش تغذیه ای و کاربردی بالا می‌باشد.

پروتئین دانه‌ی گوجه فرنگی حاوی مقادیر قابل توجه اسیدهای آمینه ی گلوتامیک و آسپارتیک با زنجیره‌ی جانبی

۲-۲-۲- تهیه ی پروتئین آبکافت شده

برای این منظور ماده‌ی اولیه‌ی پروتئینی آماده شده در مراحل قبل، جهت انجام فرآیند آبکافت توسط آنزیم پپسین به طور دقیق در ارلن‌های حجمی توزین و توسط بافر با گرید خوراکی با pH:۳ در نسبت مناسب رقیق شد. واکنش‌های آبکافت در محدوده‌ی زمانی ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه با دمای مناسب آنزیم و نسبت آنزیم به سوسترای ۱ تا ۳٪ انجام شد. پس از فرآیند آبکافت غیر فعال کردن آنزیم از طریق اعمال حرارت ۱۰۰ درجه‌ی سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه توسط حمام آب گرم صورت گرفت. پس از آن محلول آبکافت شده تحت نیروی گریز از مرکز با دور ۳۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه‌ی سانتیگراد قرار گرفت و مایع رویی به عنوان ترکیب آبکافت شده‌ی پروتئینی جمع‌آوری و جهت انجام تحقیقات بعدی تحت فرآیند خشک شدن انجمادی قرار گرفت.

۲-۲-۳- ارزیابی بازده تولید کمپلکس پپتید-کلسیم

هر یک از تیمارهای پروتئین آبکافت شده ی دانه ی گوچه در بافر Tris-HCL (pH:۷/۸) جهت رسیدن به غلظت mg/ml ۲۰ حل و به شدت بهم زده شدند. سپس محلول کلرید کلسیم (۰/۲ مولار) به نسبت ۱ به ۱ (حجمی/حجمی) و به آهستگی به محلول پروتئین آبکافت شده اضافه و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد نگهداری گردید، پس از آن اتانول به میزان اضافی به مخلوط حاصل اضافه گردید و در نهایت جهت جداسازی کمپلکس پپتید - کلسیم، مخلوط تحت نیروی گریز از مرکز با دور ۸۰۰۰ قرار گرفت. بازده کمپلکس پپتید- کلسیم از رابطه ی ۱ محاسبه گردید [۴].

Equation 1:

$$\frac{100 \times \text{مقدار کمپلکس تشکیل شده}}{\text{کلسیم اضافه شده} + \text{محتوی پروتئین مقدار}}$$

= بازده کمپلکس

پپتید- کلسیم(درصد)

۲-۲-۴- ارزیابی قابلیت اتصال به کلسیم

فعالیت اتصال به کلسیم بر اساس روش تیتراسیون اتیلن دی آمین تترا استیک اسید (EDTA) مدون در روش‌های استاندارد ملی ایران به شماره ۱۹۵۶۳ انجام شد. غلظت آزمون

در این روش ۵mg/l پروتئین آبکافت شده کمپلکس داده با کلسیم بود [۱۳].

۲-۲-۵- بررسی ساختاری کمپلکس پپتید- کلسیم

۲-۲-۵-۱- تهیه ی کمپلکس

در این روش ۲۰ میلی لیتر کمپلکس پپتید - کلسیم تهیه شده در مرحله ی قبل به همراه ۵ میلی لیتر کلرید کلسیم ۱٪ (وزنی/حجمی) به شدت مخلوط و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد در pH:۷، تحت دور ثابت ۱۰۰ rpm همزده شد. پس از این، اتانول به میزان اضافی به مخلوط فوق اضافه گردید و جهت جداسازی کلسیم آزاد از کمپلکس پپتید- کلسیم تحت نیروی گریز از مرکز با دور ۸۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفت. رسوب حاصل در نهایت جهت تجزیه و تحلیل‌های بعدی توسط دستگاه فریزدرایر به پودر تبدیل شد [۴].

۲-۲-۵-۲- طیف نگاری مادون قرمز- تبدیل فوریه

بدین منظور ۱ میلی گرم از پودر نمونه ی تهیه شده به همراه ۱۰۰ میلی گرم پودر برمید پتاسیم مخلوط گردید و میزان جذب طیف مادون قرمز نمونه توسط دستگاه طیف‌بین مادون قرمز-تبدیل فوریه (PerkinElmer- RX-1, American) اندازه گیری شد. طول موج مورد استفاده ۴۰۰۰ تا cm^{-1} بود. سیگنال‌های به دست آمده توسط نرم افزار اسپکتروم تجزیه و تحلیل گردید.

۲-۲-۵-۳- آب‌گریزی سطحی

نمونه ی پروتئین هیدرولیز شده ی عاری از کلسیم و پروتئین اولیه در غلظت‌های ۱mg/ml تا ۰/۰۳mg/ml (محلول در بافر فسفات ۰/۰۱ مولار و pH: ۷) تحت واکنش با معرف آنیلینو نفتالن- ۱- سولفونات (محلول در بافر فسفات ۰/۱ مولار و pH: ۷) قرار گرفت و سپس شدت نشر نور تابیده شده به نمونه جهت ارزیابی گروه‌های آب‌گریزی سطحی توسط دستگاه طیف بینی فلورسنس (PerkinElmer-LS 45, American) انجام شد. طول موج ۲۹۵nm به عنوان طول موج تهییج و دو طول موج ۳۱۰ nm و ۴۰۰ nm به عنوان طول موج های نشر انتخاب شدند [۱۴].

۲-۲-۵-۴- طیف نگاری مرئی- فرابنفش

داری بر این متغیر پاسخ نداشت. نتایج برخی پژوهش‌های صورت گرفته در این رابطه مشابه با نتایج این پژوهش بود که بیانگر اثر غیر معنی‌دار زمان بر میزان بازده و محتوی کلسیم بود [۸]. فنگ و همکاران گزارش کردند که افزایش زمان اثر کاهنده یا افزایشی مستقیمی بر میزان جذب و اتصال یون کلسیم نداشت و اجزاء پروتئین آبکافت شده در اوایل زمان آبکافت و اواخر زمان آبکافت اثر قابل توجه تری در میزان پاسخ از خود نشان دادند که این موضوع در ارتباط با میزان درجه ی آبکافت و وزن مولکولی اجزاء پتیدی تولید شده می‌باشد [۴]. نتایج همچنین بیانگر وجود یک رابطه ی مستقیم بین افزایش میزان بازده کمپلکس پپتید-کلسیم و قابلیت جذب کلسیم می‌باشد. تجزیه ی واریانس در جدول ۲. نشان داد که رابطه ی بین میزان بازده کمپلکس (معادله ی ۲) و قابلیت اتصال با کلسیم (معادله ی ۳) با متغیرهای آبکافت از نوع درجه دو به ترتیب با ضریب تبیین R^2 ۰/۷۶ و ۰/۷۸ می‌باشد. شرایط بهینه ی پیش بینی شده توسط نرم افزار جهت دست یابی به بیشترین میزان بازده و قابلیت اتصال به کلسیم دمای $33/61$ درجه ی سانتیگراد و نسبت آنزیم به سوپسترای $2/89$ درصد برآورد شد که به ترتیب حصول $41/94\%$ و 21 mg/g را پیش بینی کرد.

Table 1 Experimental design used in response surface methodology studies by using two independent variables

Run	Enzyme ratio (%)	Time (min)
1	30	1
2	180	1
3	30	3
4	180	3
5	30	2
6	180	2
7	105	1
8	105	3
9	105	2
10	105	2
11	10	2
12	105	2
13	105	2

پروتئین آبکافت شده با بهترین فعالیت باند شدن با کلسیم و کمپلکس پپتید-کلسیم، هر دو با ضریب رقت یکسان با بافر مناسب رقیق شدند. اسپکتروم در محدوده ی طول موج فرابنفش توسط دستگاه طیف بین مرئی- فرابنفش (T80+, PGI Instruments Ltd, England) با تفکیک پذیری $0/5\text{ nm}$ گرفته شد [۱۵].

۲-۳- روش آماری

جهت بهینه سازی شرایط آبکافت از نرم افزار آماری ۱۶ Minitab جهت اعمال طرح سطح پاسخ (RSM) استفاده شد. طرح آماری مورد نظر با طراحی مرکب مرکزی، تعداد فاکتور ۲، ۵ نقطه ی مرکزی، بدون بلوک، $\alpha = 1$ ، انتخاب گردید. متغیرهای مستقل شامل:، زمان آبکافت ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوپسترا ۱ تا ۳٪ در نظر گرفته شد. اثر هر یک از متغیرهای مستقل بر بازده تولید کمپلکس پپتید-کلسیم و درصد کلسیم جذب شده بررسی گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-۳- ارزیابی بازده کمپلکس و قابلیت اتصال

پپتید-کلسیم

اثر شرایط آبکافت شامل زمان و درصد آنزیم مورد استفاده بر اساس روش سطح پاسخ بر میزان بازده (درصد) و قابلیت اتصال به کلسیم (mg/g) ارزیابی شد. جدول ۱ نشان دهنده ی تعداد و سطوح مورد آزمون می باشد که توسط روش سطح پاسخ با طراحی مرکب مرکزی انتخاب گردید. نمودارهای سطحی و کانتر مربوط به اثر زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا بر میزان بازده و قابلیت اتصال به کلسیم (شکل ۱) نشان می دهد که میزان بازده و محتوی کلسیم با ترکیب مناسب زمان آبکافت و درصد آنزیم در دمای مناسب فعالیت آنزیم (۳۷ درجه سانتیگراد) به ترتیب به بیشترین حد خود تا مقدار 50% و 23 mg/g افزایش یافت. اثر افزایش درصد آنزیم بر مقدار بازده کمپلکس پپتید-کلسیم معنی دار شد ($p < 0/05$) و این در حالی است که متغیر زمان اثر معنی

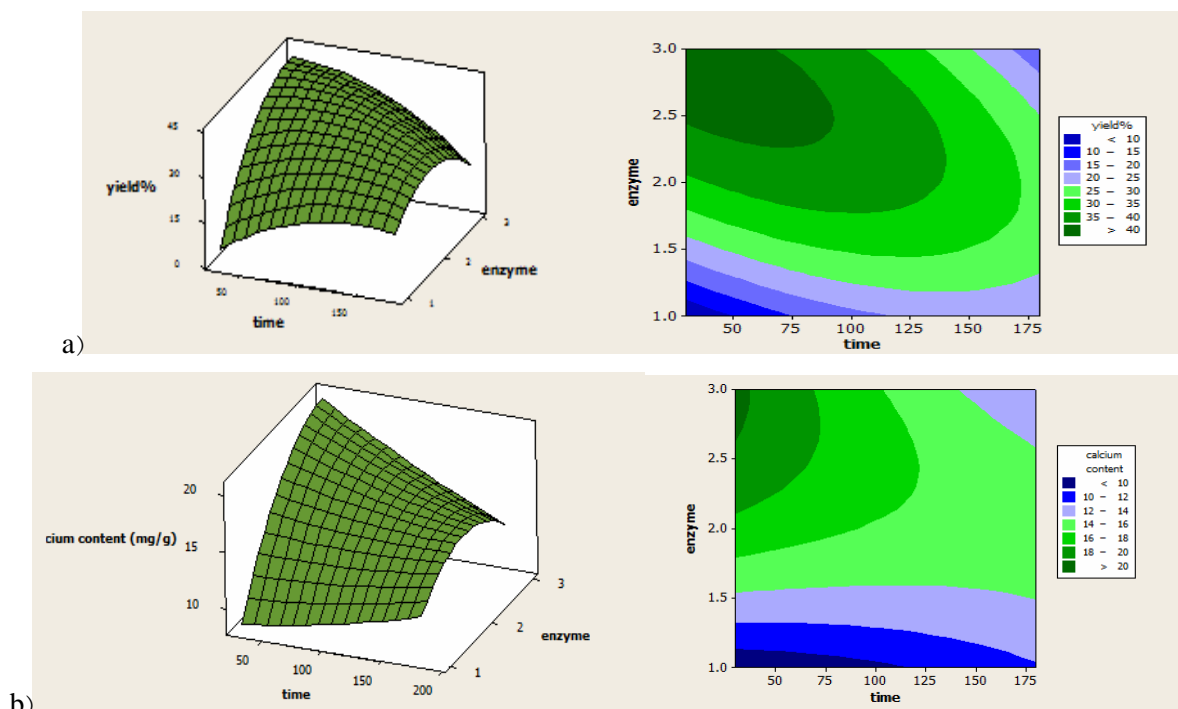


Fig 1 Response surfaces and contour plots for the effect of variables on Yield (%) as a function of different hydrolyzing conditions: time and enzyme ratio (a). Calcium content (mg/g) as a function of different hydrolyzing conditions: time and enzyme ratio (b).

Table 2 ANOVA table for response as affected by independent variables during optimization experiments

	Calcium content (mg/ml)		Yield (%)	
	Regression coefficient	P value	Regression coefficient	P value
Time (X_1)	0.1138	0.230	0.4640	0.085
Enzyme ratio (X_2)	13.7784	0.02	64.0603	0.023
X_1^2	0.010	0.450	-0.0011	0.124
X_2^2	-1.3973	0.050	-10.4297	0.046
X_1X_2	-0.0573	0.034	-0.1350	0.0500
Lack of fit		0.724		0.161
R^2	0.78		0.76	

سطحی نمونه‌ی پپتید حاصل از آبکافت نسبت به پروتئین اصلی افزایش یافت که این بیانگر افزایش قرار گرفتن زنجیره‌های آب‌گریز در سطح مولکول پروتئین آبکافت شده می‌باشد [۱۴]. بر این اساس پروتئین آبکافت شده‌ی تولیدی نسبت به پروتئین اولیه تمایل بیشتری به تشکیل واکنش‌های بین مولکولی و تجمع به واسطه‌ی حضور بیشتر گروه‌های آب‌گریز سطحی از خود نشان می‌دهد که با توجه به نتایج پژوهش‌های صورت گرفته در این رابطه، تجمع‌های آب‌گریز یکی از عوامل مهم و بحرانی در افزایش قابلیت جذب کلسیم به حساب می‌آیند [۱۰].

Equation 2:

$$Y = -60.16 + 0.4640X_1 + 64.0603X_2 - 0.0011X_1^2 - 10.4297X_2^2 - 0.1350X_1X_2$$

Equation 3:

$$Y = -4.27 + 0.1138X_1 + 7784X_2 + 0.010X_1^2 - 1.3973X_2^2 - 0.0573X_1X_2$$

۲-۳ بررسی ساختار کمپلکس پپتید-کلسیم

۱-۲-۳ آب‌گریزی سطحی

با توجه به شکل ۲ و بر اساس رابطه‌ی مستقیم شدت شیب فلورسنس یک مولکول با آب‌گریزی موثر آن [۱۴]، آب‌گریزی

اضافه شدن کلسیم به نمونه ی پپتیدی، تغییراتی در ارتعاشات کشیدگی های مربوط به گروه های عاملی $C=O$ و $O-H$ مشاهده شد که بیانگر درگیر شدن این گروه ها و تشکیل کمپلکس می باشد. در نمونه ی پپتیدی حاوی کلسیم، در فرکانس های پائین نوار جذبی مربوط به اتصال کلسیم با پپتید در ناحیه $cm^{-1} 523$ ظاهر شد. نوارهای جذب ی مربوط به گروه های کربوکسیلات COO^- و گروه هیدروکسیل مشاهده شده در پپتید عاری از کلسیم به ترتیب در فرکانس های 1653 و $cm^{-1} 3498$ ظاهر شدند که پس از جذب کلسیم به نواحی با فرکانس های پایین تر در 1531 و $cm^{-1} 3420$ منتقل گردیدند که می تواند نشان دهنده ی اتصال کلسیم با زنجیره ی پپتیدی به صورت $C-O-Ca$ باشد. همچنین نوارهای کششی گروه های $C-O$ اتری در فرکانس های 1257 و $cm^{-1} 1319$ پس از اتصال با کلسیم به فرکانس های پایین تر و بیک هایی با عمق بیشتر در 997 و $cm^{-1} 1098$ منتقل گردیدند. این تغییرات در تحقیقات انجام شده توسط لیو و همکاران، 2013 و لیو و همکاران، 2016 مشاهده گردید [۴ و ۱۰].

این نوع تغییرات بیانگر این است که گروه های عاملی کربوکسیل و هیدروکسیل موجود در زنجیره ی پپتیدهای حاصل از آبکافت پروتئین دانه گوجه، مهم ترین جایگاه اتصال برای کلسیم می باشند.

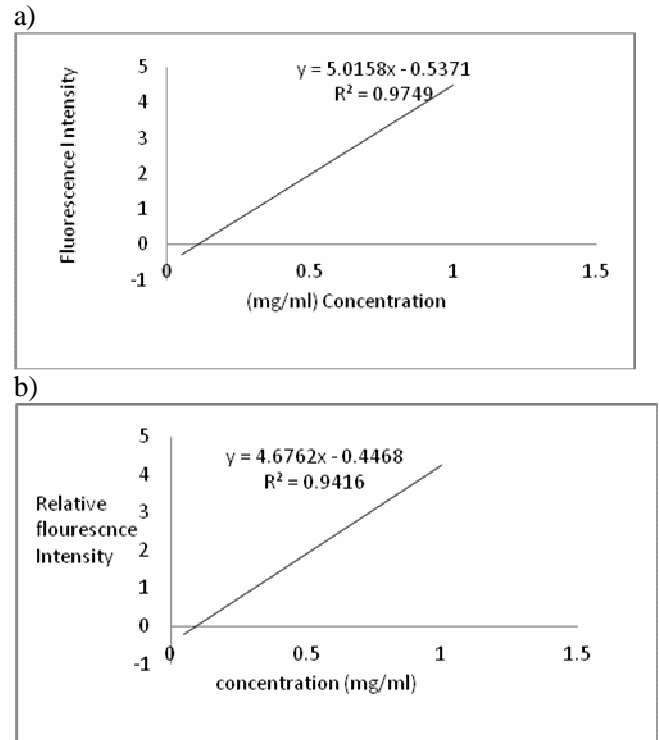


Fig 2 a) Fluorescence intensity vs. different hydrolysate protein concentration (mg/ml). b) Fluorescence intensity vs. different protein concentration (mg/ml).

۳-۲-۲- طیف نگاری مادون قرمز-تبدیل فوریه

بررسی ساختار کمپلکس پپتید- کلسیم با استفاده از روش طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه انجام شد (شکل ۳). پس از

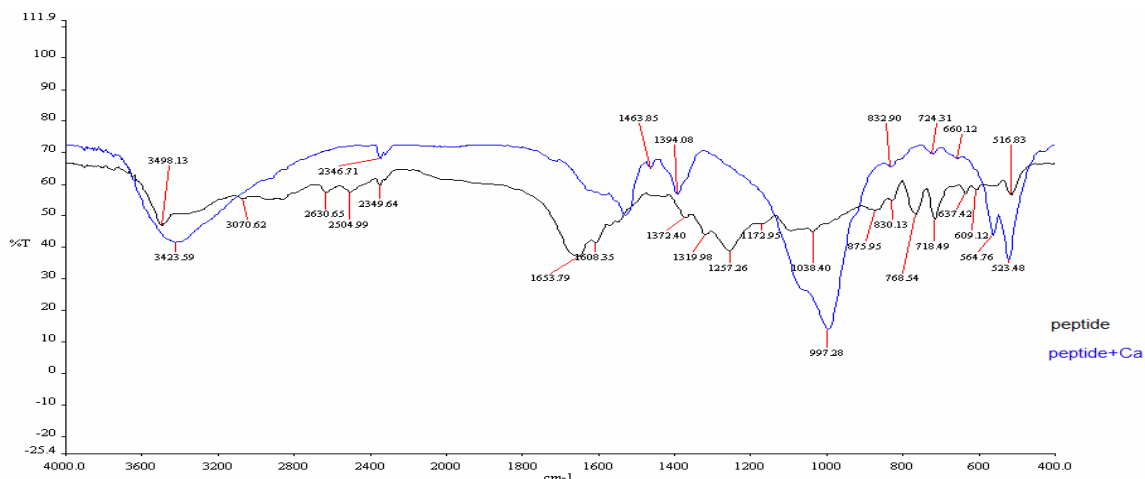


Fig 3 FTIR spectroscopy range in $400-4000\text{ cm}^{-1}$. hydrolysate protein from tomato seed binding calcium (blue line). Protein hydrolysate (black line).

پپتیدی باعث ظهور پیک های جذبی جدید و یا انتقال و حذف یکسری پیک ها در نمونه ی اولیه می گردد. [۱۶ و ۱۷]. طیف نگاری مرئی- فرابنفش در محدوده ی طول موج 200 تا 280 نانومتر برای نمونه های پپتید عاری از کلسیم و کمپلکس

۳-۲-۳- طیف نگاری مرئی-فرابنفش

طیف نگاری مادون قرمز و فرابنفش می تواند اطلاعات مفیدی در رابطه با اتصالات تشکیل شده و ساختمان کمپلکس پپتید- کلسیم فراهم می کند. در واقع اتصال یون های فلزی با زنجیره های

یک ترکیب جدید می‌باشد. نتایج تحقیقات صورت گرفته در این رابطه بیانگر کاهش شدت جذب کمپلکس پپتید-کلسیم نسبت پپتید عاری از کلسیم در ناحیه‌ی فرابنفش بود که نشان دهنده‌ی اتصال کلسیم به زنجیره‌ی پپتیدی بود [۱۶ و ۱۷].

پپتید-کلسیم انجام شد (شکل ۴). مقایسه‌ی نتایج نشان دهنده‌ی تغییرات و انتقالات صورت گرفته در گروه‌ها و نواحی جذب بین دو نمونه بود. حذف پیک در طول موج ۲۴۰ و همچنین کاهش شدت جذب در طول موج ۲۸۰ در کمپلکس پپتید-کلسیم نسبت به پپتید عاری از کلسیم بیانگر اتصال پپتید با یون کلسیم و تشکیل

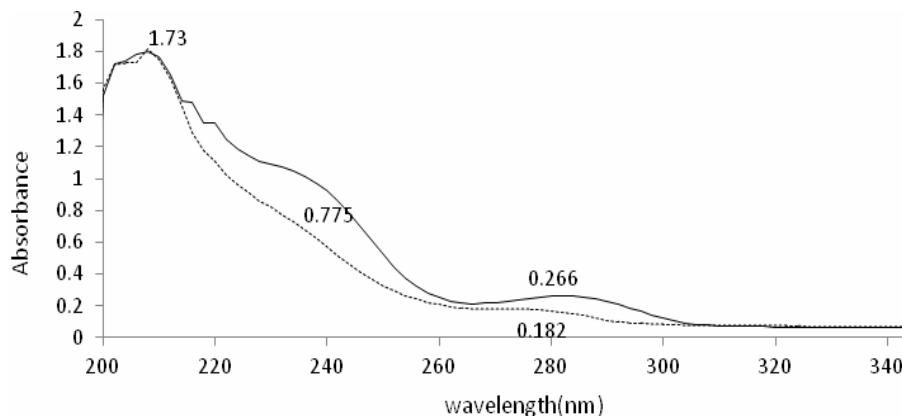


Fig 4 UV-VIS spectroscopy range in 200-340 nm. Hydrolysate protein (—). Hydrolysate protein binding calcium (.....)

- [2] Guéguen, L., and Pointillart, A. 2000. The bioavailability of dietary calcium. *Journal of the American College of Nutrition*. 19: 119-136.
- [3] Chen, H.T., Hsieh, K.C., Chang, J.K., Wang, G. J., Fu, Y. C., Ho, M.L., and Tzeng, C.C. 2012. Conformations of divergent peptides with mineral binding affinity. United States Patent.
- [4] Liu, F.R., Wang, R., and Chen, Z.X. 2013. Calcium-Binding Capacity of Wheat Germ Protein Hydrolysate and Characterization of Peptide-Calcium Complex. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 61: 7537-7544.
- [5] Zhao, L., Huang, S.H., Cai, X., Hong, J., and Wang, S.H. 2014. A specific peptide with calcium chelating capacity isolated from whey protein hydrolysate, *Journal of Functional Foods*. 10: 46-53.
- [6] Choi, I., Jung, C., Choi, H., Kim, C., and Ha, H. 2005. Effectiveness of phosphovitin peptides on enhancing bioavailability of calcium and its accumulation in bones. *Food Chemistry*. 93: 650-662.
- [7] Jung, W. K., and Kim, S. K. 2007. Calcium-binding peptide derived from pepsin hydrolysates of hoki (*Johnius belengerii*) frame. *Food Preservation by Hurdle Technology*. 224: 763-767.

۴- نتیجه گیری کلی

قابلیت اتصال پروتئین آبکافت شده‌ی حاصل از پروتئین دانه گوجه به کلسیم در شرایط آزمایشگاهی توسط روش سطح پاسخ ارزیابی شد و بیشترین بازده تولید کمپلکس پپتید-کلسیم ۵۰٪ و محتوی کلسیم ۲۳ mg/g به دست آمد. بررسی ساختار کمپلکس پپتید-کلسیم توسط طیف بینی مادون قرمز-تبدیل فوریه نشان داد که یون کلسیم توسط اتصالات یونی به گروه‌های عاملی کربوکسیلات و هیدروکسیل موجود در زنجیره‌های پپتیدی تشکیل کمپلکس پپتید-کلسیم داده است. بررسی توسط طیف بینی مرئی-فرابنفش بیانگر وجود تغییراتی در زنجیره‌ی پپتیدی و کاهش میزان جذب طول موج‌های فرابنفش مربوط به کمپلکس پپتید-کلسیم در مقایسه با پپتید عاری از کلسیم بود. همچنین ارزیابی آب‌گریزی سطحی نشان داد که افزایش و تجمع گروه‌های هیدروفوب در سطح پروتئین آبکافت شده‌ی حاصل از پروتئین دانه گوجه می‌تواند یکی از عوامل مهم اتصال کلسیم باشد.

۵- منابع

- [1] Miller, G. D., Jarvis, J. K., and McBean, L. D. 2001. The importance of meeting calcium needs with foods. *Journal of the American College of Nutrition*. 20: 168-185.

- Isolation from Tomato Seed Meal, Extraction Optimization. *Journal of Food Science*. 3, 477.
- [13] ISIRI, determination of calcium by titration method. Number 19563. 1st. Edition.
- [14] Kato, A., and Nakai, SH. 1980. Hydrophobicity determined by a fluorescence probe method and its correlation with surface properties of protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 624:13-20.
- [15] Schmid. F. X. 2007. *Biological Macromolecules: UV-visible Spectrophotometry*. University of Bayreuth, Germany.
- [16] Nie, R., Liu, Y., and Liu, Z. 2014. The calcium-binding activity of fish scale protein hydrolysates, *Journal of Agricultural Chemistry and Environment*. 3: 11-15.
- [17] Silverstein, R. M., Bassler, G. C. and Morrill, T. C. 1981. *Spectrometric identification of organic compound*. 4th Edition, Wiley, New York, 100-180.
- [8] Miskoska-Milevska, E., Dimitrievska, B., Poru, K., and Popovski, Z. 2008. Differences in tomato seed protein profiles obtained by SDS-PAGE analysis. *Journal of Agricultural Sciences UDC*: 53: 582-926.
- [9] Lv, Y., Xiaolnbao, Q., Tang, W., Yang, B., and Guo. SH. 2009. Identification and Characteristics of Iron-Chelating Peptides from Soybean Protein Hydrolysates Using IMAC-Fe³⁺, *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 57: 4593-4597.
- [10] Liu, H., Lv, Y., Xu, J., and Guo, SH. 2016. Soybean peptide aggregates improved calcium binding capacity, *LWT - Food Science and Technology*. 67:174-180.
- [11] AOAC Method. 1990. Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In *Official methods of analysis* (15th ed., pp. 101-111). Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- [12] Liadakis, G. N., Tzia, C., Oreopoulou, V., and Thomopoulos, C. H. 1995. Protein

Investigation of calcium-binding ability of bioactive peptide from tomato seed protein

Meshginfar, N. ^{1*}, Sadeghi Mahoonak, A. R. ², Akbari, B. ³, Ghorbani, M. ², Toldra, F. ⁴

1. PhD student of food chemistry, Gorgan university of agriculture and natural resources.
2. Professor associate of food chemistry, Gorgan university of agriculture and natural resources.
3. Professor associate of food analysis, Reference Laboratory, the Ministry of Health.
4. Research Professor at the Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC)

(Received: 2016/05/29 Accepted:2016/05/09)

Present study was done to investigate the calcium binding ability of protein hydrolysate from tomato seed protein (TSPH). Enzymatic hydrolysis was done through pepsin (600 U). To achieve the maximum yield of TSPH-calcium complex and calcium content, hydrolysis time and enzyme/substrate ratio was obtained in range of 30-180 min and 1-3%, respectively. The result of response surface method showed increasing of the enzyme ratio had a significant effect on reaching the highest ability of calcium binding ($p < 0.05$). The UV-VIS spectroscopy, fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and fluorescence spectroscopy was used to structure characterization of TSPH-calcium complex and comparison with structure of TSPH. The result of fluorescence spectroscopy demonstrated high surface hydrophobicity of TSPH-calcium complex that cause to form hydrophobic aggregation and hydrophobic interaction to bind calcium. The result of FTIR showed that carboxyl and hydroxyl group have an important role to calcium- binding capacity. Also changes in UV-VIS absorption bands in TSPH-calcium complex comparing to single peptide present formation of calcium- binding.

Keyword: Bioactive peptide, Tomato seed protein, Calcium binding ability

* Corresponding Author E-Mail Address: nasimmeshginfar@gmail.com