مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئینی دانه طالبی (*Cucumis melo var cantalupensis*) جهت دست‌یابی به حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی

معصومه خسروی لاریجانی[۱*]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، محمد قربانی[۳]، هدی شهیری طبرستانی[٤]

۱-دانشجوی کارشناسی‌ارشد شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۲-استاد گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

۳-دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

٤-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹ /۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۲/۰۸

کلمات کلیدی:

پروتئین دانه طالبی،

روش سطح‌پاسخ،

آنزیم آلکالاز،

هیدرولیز آنزیمی،

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.285

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.5.2

* مسئول مکاتبات:

mkhosravilarijany@gmail.com

چکیده

در این پژوهش، هیدرولیز پروتئین دانه طالبی (*Cucumis melo var cantalupensis*) توسط آنزیم آلکالاز به‌منظور دست‌یابی به پپتیدهای زیست‌فعال دارای حداکثر قدرت ضداکسایش (فعالیت مهار رادیکال DPPH ، قدرت احیاکنندگی یون آهن (III))، انجام گرفت. در این هدف، از روش سطح‌پاسخ و طرح مرکب مرکزی با سطوح متغیرهای مستقل نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) ۳/۲۵ ٪ - ۰/۲۵ ٪ ، زمان هیدرولیز min ۲۱۰ -۳۰ و دمای C° ۵۵-C° ۳۰ برای آنزیم آلکالاز استفاده‌شد. تیمار بهینه توسط نرم‌افزار برای پروتئین‌های هیدرولیزشده ، نسبت آنزیم به سوبسترای (E/S) ۰/۸٦، زمان هیدرولیز min ۱۷۳/۵۱ و دمای C° ٤۹/۹۳ تعیین شد. R^2 و R^2- تعدیل شده برای فعالیت مهار رادیکال DPPH به‌ترتیب ۰/۸۰ و ۰/۵۸ و قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) به‌ترتیب ۰/۹٦ و ۰/۹۱ به‌دست آمد. این نتایج گویای این است که مدل برازش شده توصیف نسبتا مناسبی از پراکندگی داده‌ها داشته است. بر روی غلظت‌های ppm ۵۰-۲۰۰ از تیمار بهینه، آزمون های آنتی‌اکسیدانی انجام گرفت که پاسخ‌ها نشان‌دهنده‌ی تاثیر مثبت غلظت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بود و در تمامی نمونه‌ها پروتئین هیدرولیزشده با آلکالاز، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیزنشده نشان دادند، اما از فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک به عنوان کنترل مثبت، کمتر بودند. از طرفی افزایش غلظت، ارتباط مستقیمی را با قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نشان داد. ویژگی ضداکسایشی در پپتیدهای زیست‌فعال، امکان استفاده از آن‌ها را به‌عنوان جایگزین طبیعی به‌جای ترکیبات ضداکسایش رایج در صنعت غذا میسر می‌سازد.

۱- مقدمه

اخیرا شواهد علمی ثابت‌کرده‌اند که پروتئین‌های موجود در مواد غذایی می‌توانند عملکرد فیزیولوژیکی بدن را توسط توالی‌های پپتیدی که در آن‌ها موجود است، متعادل کنند[۱]. پپتیدهای زیست‌فعال توالی‌هایی با ۲۰-۳ اسیدآمینه می‌باشند که از شکسته‌شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می‌شوند[۲]. این توالی درساختار پروتئین والد به‌شکل غیرفعال بوده اما زمانی‌که آزاد می‌شوند، می‌توانند اثرات سلامتی‌بخش خود را بروز دهند[۳]. رایج‌ترین و گسترده‌ترین روش مورداستفاده برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال هیدرولیز آنزیمی می‌باشد[٤]. اضافه‌نمودن آنزیم به پیش‌ماده پروتئینی باید در دما و pH بهینه‌ی آنزیم صورت‌گیرد. نسبت آنزیم به سوبسترا، نوع آنزیم مصرفی، دما، زمان و pH از عواملی است که بر نوع، ترتیب، توالی و فعالیت بیولوژیکی پپتیدهای حاصل مؤثر است[٥]. پروتئازها، گروهی از آنزیم‌های هیدرولیتیک می‌باشند که هیدرولیز باندهای پپتیدی را در پروتئین انجام می‌دهند. آلکالاز، آنزیمی قلیایی با منشا میکروبی است که از باکتری *Bacillus Licheniformis* استخراج می‌شود. این آنزیم یک سرین اندوپپتیداز درمیان پروتئازها محسوب می‌شود. دانسیته آن ۱/۱۸ g/ml بوده و فعالیت آن با (AU)[1] بیان می‌شود. تحقیقات نشان‌داده‌اند که استفاده از آنزیم آلکالاز (به‌تنهایی و یا مشترک با آنزیم‌های دیگر) موجب تولید پروتئین هیدرولیزشده با درجه‌هیدرولیز بالا و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر می‌شود [٦]. واکنش‌های اکسیداتیو نقش قابل‌توجهی را در بدن موجودات زنده به‌خصوص انسان و موادغذایی ایفا می‌کنند. یکی از نتایج این نوع واکنش، تولید گونه‌های فعال اکسیژن‌دار است که مهم‌ترین آن‌ها رادیکال‌های آزاد می‌باشد. این رادیکال‌های آزاد با لیپید و پروتئین موجود در مواد غذایی واکنش داده و موجب کاهش رنگ، ارزش غذایی، خصوصیات عملکردی و تولید ترکیبات سمی، عطر و طعم نامطلوب می‌شوند. تجمع این ترکیبات سمی در بدن، برای سلامت مصرف‌کنندگان خطرناک می‌باشد[۷]. آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که با اهدا الکترون به رادیکال‌های آزاد موجود در سیستم و مهارکردن زنجیره‌های کاتالیستی آغازکننده‌ی واکنش اکسیداسیون و حذف ROS[2] و RNS[3] ، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ایجادشده توسط این مولکول‌های ناپایدارمحافظت می‌کنند[۸]. پپتیدهای آنتی‌اکسیدان معمولا حاوی ١٦-٥ اسیدآمینه می‌باشند. پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مشتق‌شده از موادغذایی، عموما ترکیباتی ایمن، سالم با وزن مولکولی کم، فعالیت بالا و جذب آسان درنظرگرفته می‌شوند. اسیدهای‌آمینه Tyr، Trp، Met ، Lys، Cys و His[4] نمونه‌هایی از آمینواسیدهایی هستند که سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند، هم‌چنین اسیدهای آمینه‌ی دارای ساختار آروماتیک، می‌توانند به‌رادیکال‌های آزاد پروتون اهدا نموده در نتیجه قابلیت به‌دام اندازی آن‌ها را فراهم می‌کنند[۹]. Fang وهمکاران(۲۰۱۲) برروی پروتئین‌های عضله‌ی ماهی مرکب پرنده (*Ommastrephes bartrami*) که توسط پنج آنزیم پپسین، تریپسین، پاپائین، آلکالاز و فلاورزایم هیدرولیز شده‌بودند، قدرت مهار رادیکال DPPH را مورد ارزیابی قراردادند. نتایج نشان‌داد هیدرولیزشده‌های حاصل از عملکرد آنزیم پاپائین، بهترین پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان‌دادند[۱۰]. Ambigaipalan و همکاران(۲۰۱۵) آرد تولیدشده از هسته خرما را با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزایم و ترمولیزین تحت شرایط هیدرولیز قرار دادند. آنزیم‌ها به‌صورت جداگانه و ترکیبی، در pH و دمای ثابت مورداستفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد در تیمارهایی که از ترکیب آنزیم آلکالاز و فلاورزایم برای هیدرولیز پروتئین استفاده شده‌بود، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شد[۱۱]. Yen و همکاران(۲۰۱۸)

1. Anson Unit

2. Reactive Oxygen Species
3. Reactive Nitrogen Species
4. Tyrosine ،Tryptophane ،Methionine ،Lysine ،Cysteine ، Histidine

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی به‌دست‌آمده از تخم هویج را مورد بررسی قرار دادند. دراین پژوهش، پروتئین تخم هویج پس از استخراج، توسط چهار آنزیم پاپائین، تریپسین، نئوتراز و آلکالاز، هیدرولیزشد. پروتئین هیدرولیزشده با آلکالاز، بیشترین و قوی‌ترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH[1] را نشان‌داد[۱۲]. دانه‌ها و کنجاله‌ها از رایج‌ترین محصولات جانبی می‌باشند که معمولا ۵۰٪- ۵٪ ماده‌خام اولیه را شامل می‌شوند. این محصولات که می‌توانند در نتیجه‌ی فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی تولید شوند، به‌عنوان منابعی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال در نظرگرفته می‌شوند[۱۳]. درحال حاضر به‌جز بذر اصلاح‌شده‌ی این دانه‌ها که جهت کاشت توسط جهادکشاورزی در اختیار کشاورزان قرار می‌گیرد و نیز مصرف محدود آن‌ها به‌صورت آجیل، استفاده دیگری از آن‌ها به‌عمل نمی‌آید[۱٤]. طالبی (*Cucumis melo var. cantalupensis*) از خانواده کدوییان، یکی از پرمصرف‌ترین ملون‌ها در سراسر جهان به‌دلیل شیرینی، طعم مطلوب و ارزش تغذیه‌ای می‌باشد[۱۵]. از آن جایی‌که ضایعات طالبی (پوست و دانه) حدود ۳۲درصد وزن کل طالبی را دربر می‌گیرد استفاده ارزشمند از آن‌ها، امروزه به‌عنوان یک چالش گسترش پیداکرده‌است [۱٦]. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین استخراج‌شده از دانه طالبی با استفاده از آنزیم آلکالاز به‌روش سطح‌پاسخ برای دست‌یابی به بیشترین قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) و مهار رادیکال آزاد DPPH است. در این تحقیق، تأثیر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه (ppm ۵۰-۲۰۰) برقابلیت آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت و با قدرت آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک و پروتئین هیدرولیزنشده مقایسه‌شد.

۲- مواد و روش‌ها

میوه طالبی (*Cucumis melo var cantalupensis*) از بازار تهیه شد و دانه‌ها به‌صورت دستی از میوه‌هاجداشدند. سود، اسیدکلریدریک و فریک کلراید از برند مرک، رادیکال DPPH از برند سیگما، اتانول۹٦٪ از برند پارس‌الکل تهیه‌شدند. تمام موارد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۱-چربی‌گیری از دانه طالبی

دانه‌های جداسازی‌شده پس از شست وشو با آب، در آونی که برروی دمای $40\ ^{o}c$ تنظیم‌شده‌بود به مدت ۳ساعت قرارگرفتند. به‌منظور تهیه پودر نرم (آرد)، از روش Feyzi و همکاران(۲۰۱۵) با اندکی تغییرات استفاده‌شد. دانه‌های خشک‌شده به‌وسیله آسیاب الکتریکی تبدیل به‌پودر شدند. پودرهای حاصله با هگزان به‌نسبت (w /v) ۱:٤ مخلوط‌شده و برای مدت ۵ساعت به‌صورت مکرر به‌وسیله شیکر با سرعت rpm[2] ۲۰۰هم‌زده‌شد. سپس پودر چربی‌گیری‌شده به‌منظور تبخیر هگزان اضافی به‌مدت ۱۲ساعت در آون با دمای $40^{o}c$ قرار گرفت و سپس از الک با مش ٤۰ عبور داده‌شد[۱۷].

۲-۲- تعیین پروفایل حلالیت پروتئین آرد دانه طالبی به‌روش برادفورد

برای تعیین پروفایل حلالیت از روش Kinsella و Melachouris (۱۹۷٦) با اندکی تغییرات استفاده‌شد. ابتدا g ۰/۵ ازآرد الک‌شده و چربی‌گیری‌شده‌ی دانه طالبی را در بشر ml ۱۰۰، به ml ۵۰ آب‌مقطر اضافه نموده و سوسپانسیون حاصل برای مدت یک‌ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی هم‌زده‌شد. سپس pH سوسپانسیون توسط سود و اسیدکلریدریک N ۱ در ۱۰سطح(۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹ و ۱۰) تنظیم شده و پس از رسیدن به pH موردنظر محتویات بشر به لوله فالکون منتقل شده سپس با سرعت rpm ٤۰۰۰ و زمان min ۱۵سانتریفیوژ انجام شد سپس سوپرناتانت را جداکرده و میزان حلالیت پروتئین به‌روش برادفورد در طول

1. 2,2 – Diphenyl -1- picrylhydrazyl

2. Revolution per Minute

موج nm ۵۹۵ اندازه‌گیری شد به‌این صورت که ۵۰µl از سوپرناتانت با ml ۲/۵ معرف برادفورد ورتکس شده و جذب آن در nm ۵۹۵خوانده‌شد. برای تهیه‌ی نمونه شاهد، ۵۰µl آب‌مقطر با ml ۲/۵ معرف برادفورد ترکیب‌شد. برای تهیه‌ی منحنی استاندارد، از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی(BSA)[1] استفاده‌گردید. برای این کار ابتدا محلول غلیظ (۱µg/ml) از BSA ساخته، سپس از این محلول، غلظت‌های µ g/ml ۱۰-۵۰ تهیه‌شد. ۵۰µl از غلظت‌های استاندارد با ml ۲/۵ از محلول برادفورد (با معادله خط Y=0/001x – 0/0068) ترکیب و کاملا مخلوط شده سپس جذب آن‌ها در طول موج nm ۵۹۵ ثبت‌گردید [۱۸].

۲-۳-استخراج پروتئین از دانه طالبی

برای استخراج پروتئین، از روش Feyzi و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی اصلاحات انجام گرفت. ابتدا پودر چربی‌گیری‌شده به‌نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط شده سپس با استفاده از سود N ۱، pH = ۱۰ تنظیم و به‌مدت ۱ساعت هم‌زده‌شد. سوسپانسیون حاصل به‌مدت ۳۰ min با سرعت ٤٥٠٠rpmسانتریفیوژ شد. در مرحله‌بعد سوپرناتانت حاصل با استفاده از اسیدکلریدریک N ۱بر روی pH = ۳ که نقطه ایزوالکتریک پروتئین دانه طالبی می‌باشد تنظیم شده و به مدت ۲۰min با سرعت ٤٥٠٠rpmجهت رسوب پروتئین سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل (کنسانتره پروتئینی) پس‌از شست وشو با آب‌مقطر جداشده و درپلیت ریخته شد و با خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۲۰°C- نگهداری شد [۱۷].

۲-٤- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی (رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) آرد چربی‌گیری‌شده‌ی دانه طالبی و پروتئین استخراج‌شده انجام‌شد[۱۹].

۲-۵- تهیه پروتئین هیدرولیزشده

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، ابتدا پروتئین دانه طالبی در غلظت ۵٪ (w / v) در بافر فسفات M ۰/۲ حل شد و pHسوسپانسیون حاصل در محدوده pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلکالاز (pH =۸) به کمک سود و اسید N۱ تنظیم شده و امکان هیدراته‌شدن آن با شیک‌کردن به‌مدت ۳۰min در دمای محیط فراهم گردید. آنزیم با غلظت ۳/۲۵٪ - ۰/۲۵٪ (W/W) (نسبت آنزیم به سوبسترا) به سوسپانسیون پروتئینی افزوده شده و هیدرولیز در دمای c° ۵۰ -c° ۳۰ و زمان min ۲۱۰ - ۳۰ در pH =۸ در انکوباتور شیکردار انجام شد. پس‌از گذشت زمان موردنظر، با استفاده از حمام آب C° ۹۰ به‌مدت min ۱۰ غیرفعال‌سازی آنزیم صورت‌گرفت و نمونه‌ها بااستفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به‌دمای محیط سرد شدند. سپس برای حذف ترکیبات اضافی با دور g× ۵۰۰۰ به‌مدت min ۳۰ سانتریفیوژ انجام شد، سوپرناتانت جداشده بااستفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردید و دردمای C° ۲۰- نگه‌داری شد[۲۰].

۲-٦- بهینه‌سازی فرایند، جهت دست‌یابی به تیمار با بیشترین خواص آنتی اکسیدانی

به‌منظور بهینه‌سازی فرایند ازنظر خواص ضداکسایشی از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح‌پاسخ[2]، طرح مرکب مرکزی[3] برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز در پنج سطح (α+، ۱+، ۰، ۱-، α-) استفاده شد. پاسخ مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (معادله ۱) و قابلیت احیاکنندگی یون آهن (III)[4] (معادله ۲)، برای تیمارهای آنزیم آلکالاز می‌باشد. برای هر آنزیم ۲۰تیمارتصادفی بادرنظرگرفتن شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در (جدول۱) و تیمارهای مربوطه در (جدول۲) نشان‌داد ه‌شده است.

1. Bovine Serum Albumin

2. Response Surface Method
3. Central Composite Designs
4. Ferric reducing antioxidant power

Table 1 Levels of independent variables used to optimize the antioxidant activity of the cantalupe seed protein hydrolyzate

Independent variables					
-α	-1	0	+1	+α	**Levels**
Enzyme to					
0.25	0.86	1.75	2.64	3.25	Substrate ratio (%)
30	35	42.5	50	55	Temperature(°C)
30	66.5	120	173.5	210	Time(min)

Table 2 The random treatments of hydrolysed-protein of cantalupe seed by alkalase enzyme

Treatment	Time(min)	Temperature(°C)	Enzyme to substrateration(%)
1	120	30	1/75
2	173/5	35	0/86
3	66/49	35	64/2
4	66/49	35	0/86
5	173/5	35	2/64
6	120	42/5	1/75
7	30	42/5	1/75
8	120	42/5	1/75
9	120	42/5	0/25
10	120	42/5	3/25
11	210	42/5	1/75
12	120	42/5	1/75
13	120	42/5	1/75
14	120	42/5	1/75
15	120	42/5	1/75
16	173/5	49/9	2/64
17	66/49	49/9	2/64
18	66/49	49/9	0/86
19	173/5	49/9	0/86
20	120	55	1/75

۳-۷- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH ، ابتدا پودرهای هیدرولیزشده در آب‌مقطر در غلظت (٤۰ mg/ml) حل شدند. سپس ۱/۵ ml از هرنمونه با ۱/۵ ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵mM) مخلوط و به‌مدت ۲۰s ورتکس شد. سپس مخلوط ۳۰ min در تاریکی نگه‌داری شد و بعد با دور ۲۵۰۰×g به‌مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت درطول‌موج ۵۱۷ nm خوانده‌شده و با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید[۲۱].

$$\text{DPPH free radical scavenging activity} = A_{control} - A_{sample} / A_{control} \times 100$$

$A_{Control}$: جذب شاهد (حجم یکسانی از آب‌مقطر به‌جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می‌شود) A_{Sample}: جذب نمونه می‌باشد

۳-۸- تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن (III):

برای تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن در نمونه‌های هیدرولیزشده، ml ۰/۵ از نمونه حل‌شده در آب‌مقطر (درغلظت ٤۰ mg/ml) با ml ۰/۵ بافر فسفات M ۰/۲ . (pH =٦/٦) و ml ۰/۵ پتاسیم‌فری سیانید (w/v) ٪۱ مخلوط و در دمای c° ۵۰ برای ۲۰ min انکوبه‌شد. سپس، ml ۰/۵ محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰% به مخلوط اضافه و به‌مدت min ۱۰در۲۵۰۰rpm سانتریفیوژ شد. درنهایت، ml ۱سوپرناتانت باml ۱آب‌مقطر وml ۰/۲ فریک‌کلراید (w /v) ۰/۱ ٪ مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰nm پس‌ازmin ۱۰ نگهداری مخلوط در دمای محیط ، خوانده شد. حجم یکسانی از آب‌مقطر به‌جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل

استفاده‌شد.افزایش جذب مخلوط واکنش، نشان‌دهنده افـزایش قدرت احیاکنندگی است[۲۲].

۸-۳ تعیین درجه‌هیدرولیز تیمار بهینه

ml ۱۰ محلـــول پـــروتئین هیدرولیزشـــده بـــا ml ۱۰تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ (TCA) مخلوط شد و دردمـای c° ٤ به‌مدت min ۱۰با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ سانتریفیوژ شـد. میزان نیتروژن موجود در سوپرناتانت و نیتروژن کـل بـا روش کجلدال تعیین شد [۲۳]. درنهایت درجه‌هیـدرولیز بـا اسـتفاده ازمعادله (۲) محاسبه گردید:

$$\text{Degree of hydrolysis} = \frac{\text{Nitrogen Content in (TCA(10\%))}}{\text{Total nitrogen the hydrolyzed sample}} \times 100$$

٤- بررسی تأثیر غلظت بـر خـصوصیات آنتی‌اکسیدانی تیماربهینه هیدرولیزشده

٤-۱-فعالیـــت مهـــار رادیکـــال آزاد DPPH، تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن(III)

بـرای تعیـین تـأثیر غلظـت‌هـای مختلـف تهیـه‌شـده از تیمـار بهینه(ppm[1]۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰،۲۰۰) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، میزان قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) به‌ترتیـب از روش Wuو همکـــــاران [۲۱] (بنـــــد ۳-٦) ، Ahmadiو همکاران[۲۲] (بند ۳-۷) استفاده‌شد.

٤-۲- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکـال OH

جهت انجام آزمون ، ابتدا µl ۱۰۰از محلول فنـانترولین mM ۱/۸٦۵ و µL ۲۰۰ محلول پروتئین هیدرولیزشده (درغلظـت ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ ppm) باهم مخلوط شـدند. سـپس µL ۱۰۰ از محلول سولفات آهن mM ۷.H_2O ۱/۸٦۵ به‌مخلـوط فوق اضافه گردید و پس‌از مخلوط شدن، µL ۱۰۰آب‌اکسیژنه ۳٪ W/W نیز به‌محتویات فوق افزوده‌شد و پس‌از انکوبه‌شدن محتویات دردمای C° ۳۷ به‌مدت min ٦۰، درنهایـت جـذب نمونه‌ها درطول مـوج nm ۵۳۸ قرائـت گردیـد[۲٤] و درصـد قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل از معادله (۳) محاسبه‌شد:

$$\text{OH radical scavenging power} = \frac{\text{As-An}}{\text{Ab -An}} \times 100$$

A_S: جذب نمونه A_n: جذب نمونه کنترل منفـی کـه شـامل تمام ترکیبات بالا به‌جز پروتئین هیدرولیزشـده مـی‌باشـد. A_b: جذب نمونه بلانک که شامل ترکیبات بالا به‌جز نمونه پروتئین هیدرولیزشده و آب‌اکسیژنه می‌باشد.

٤-۳-ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

جهت انجام این آزمون، برای این روش ابتـدا µl ۱۰۰محلـول پروتئین هیدرولیزشده(غلظت ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰) را بـا µl ۱۰۰۰معـرف مولیبـدات آمونیـوم (اسیدسـولفوریک ۰/٦مولار، سدیم‌فسفات mM ۲۸ و مولیبدات آمونیوم mM ٤) مخلـوط کـرده و بـه‌مـدت min ۹۰ در بنمـاری c° ۹۵ قـرار داده‌شد. پس‌از خنک‌شدن نمونه‌ها، جـذب نمونـه‌هـا در طـول موج nm ٦۹۵ اندازه‌گیری شد[۲۵].

٤-٤- تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودار

تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملا تصادفی با کـاربرد آنالیز واریانس یک‌طرفه و با استفاده از نرم‌افـزار spss نـسخه ۲۲ مورد ارزیـابی قرارگرفـت. کلیـه آزمـون‌هـا در ۳ تکـرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسـی معنـی‌داربـودن متغیرهـا در سـطح $P < ۰/۰۵$ و رسـم نمودارها با نرم‌افزار Excel 2016 انجام گرفت.

۵ - نتایج و بحث

۵-۱- ترکیبات شیمیایی

طبق نتایج ارزیابی، ترکیبات شیمیایی آرد چربی گیره شده دانه طالبی و پروتئین اسخراج شده از آن (جدول۳)، مقدار پروتئین پس از استخراج، کنسانتره درنظرگرفته شد و نسبت به آردچربی گیری شده ، میزان پروتئین به‌شکل قابل توجهی افزایش و مقدار چربی، رطوبت و خاکستر نیز تا حدودی‌کاهش یافته‌است. کاهش میزان چربی و افزایش میزان پروتئین در کنسانتره می‌تواند به‌دلیل استخراج پروتئین در محیط قلیایی و رسوب آن در نقطه ایزوالکتریک باشد. کاهش رطوبت در کنسانتره می‌تواند به‌دلیل استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی برای خشک‌کردن رسوب پروتئینی حاصل از استخراج باشد و کاهش میزان خاکستر در کنسانتره به‌دلیل این است که هنگام استخراج پروتئین مقدار زیادی از ترکیبات غیرپروتئینی در pH=۱۰ رسوب نمودند. طی اندازه‌گیری که وریدی و همکاران(۲۰۱٦) بر روی ترکیبات شیمیایی آرد چربی‌گیری‌شده حاصل از دانه‌ی طالبی و از نوع واریته‌ی تیل به انجام

1. Part per Million

رسانیدند، پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر را به‌ترتیب۰/۸ ± ۵۸/۹، ۰/۹± ۸/۱ و ۰/۰۷ ± ۵/۸ و ۰/۰۱ ± ۲/٦ گزارش نمودند[۱٤]، که تفاوت این اعداد با اعداد موجود در تحقیق جاری را می‌توان ناشی از اختلاف در نوع واریته ونوع فرایند دانست.

Table 3 The chemical composition of defatted meal and the cantalupe seed protein concentrate

Ash(%)	Moisture(%)	Fat(%)	Protein(%)	Sample(%)
3/39 ± 0/25	5/65 ±0/24	10/42 ±0/37	24/49±0/13	Non defatted meal
1/36 ±0/16	4/37 ±0/26	1/46 ± 0/35	56/39 ±0/33	cantalupe seed protein concentrate

*The valuess are based on dry weight
STDEV±*Mean

۵-۲-تعیین پروفایل حلالیت پروتئین در آرد دانه طالبی به‌روش برادفورد

حلالیت پروتئین آرد چربی‌زدایی شده‌ی دانه طالبی در (شکل۱) آورده شده است. در نمودار موردنظرکه محور زرد رنگ بیانگر pH و خط آبی‌رنگ بیانگر میزان حلالیت در pHموردنظر می‌باشد. حلالیت پروتئین آرد از pH =۱ به‌تدریج کاهش یافته و در pH = ۳ به حداقل مقدار خود می‌رسد که نقطه ایزوالکتریک نامیده می‌شود. هرچه از pH نقطه ایزوالکتریک به سمت pH قلیایی پیش می‌رود مجددا حلالیت افزایش پیدا کرده به‌گونه‌ای که در pH =۱۰ حداکثر میزان حلالیت دیده می‌شود. در پژوهش‌های مختلف نقطه ایزوالکتریک برای پروتئین‌های گیاهی مانند حبوبات: ٤/٤٦، برنج: ٤/۲۲ و گندم: ٤/۵ گزارش‌شده‌است[۲٦]. دلیل کاهش حلالیت در نقطه ایزوالکتریک، کاهش نیروی دافعه در بین اسیدهای آمینه‌ی تشکیل‌دهنده پروتئین و توازن بین یون‌های مثبت و منفی و درنتیجه کاهش نیروی دافعه الکترواستاتیک عنوان شده‌است. مشاهده حداکثر میزان حلالیت در pH =۱۰ با اکثر مقالات منتشر شده مطابقت دارد زیرا با کاهش یا افزایش از نقطه ایزوالکتریک، دامنه الکترواستاتیک زیادشده و هم‌چنین در این حالت تعداد زنجیره‌های جانبی آبگریز کاهش یافته و آب‌گیری یونی به‌ویژه درمقادیر pH بالاتر بیشتر می‌شود[۲۷]. در پژوهشی که وریدی و همکاران (۲۰۱٦) به‌منظور تعیین پروفایل حلالیت پروتئین آرد حاصل از دانه طالبی از نوع واریته تیل به‌انجام رسانیدند، کمترین میزان حلالیت در pH = ٤/۵ و بیشترین میزان حلالیت در pH =۱۲ تعیین شد. هم‌چنین اختلاف در پروفایل حلالیت آردهای مختلف را به‌دلیل تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها ، تفاوت در مقدار وتوزیع گروه‌های جانبی هیدروفیل و هیدروفوب (به‌خصوص در اسیدهای آمینه سطحی پروتئین) و دناتوراسیون پروتئین را در حین فرایند چربی‌گیری که تابع میزان و نوع اسیدآمینه می‌باشد، دانسته‌اند[۱٤].

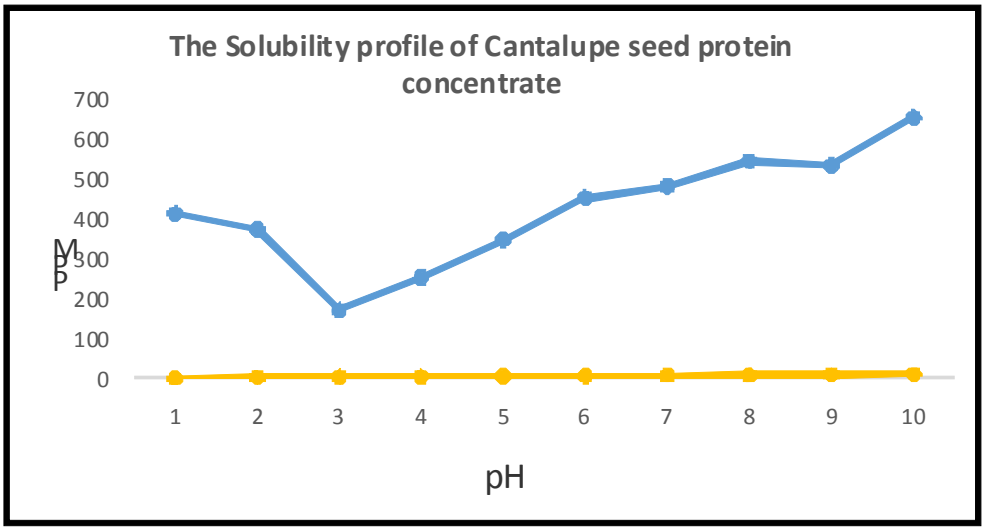

Fig 1 The Solubility profile of cantalupe seed protein concentrate. ppm (Blue line) in different pH (Yellow line)

۵-۳-بهینه‌سازی

۵-۳-۱-بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین دانه طالبی با استفاده از آنزیم آلکالاز

براساس تیمارهای پیشنهادی توسط نرم‌افزار (جدول ۲)، عمل هیدرولیز انجام شد و آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی به‌منظور سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی یون آهن بر روی تیمارها انجام گرفت (جدول ٤) و سپس تیمار بهینه که بیانگر بالاترین قدرت مهار رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی یون آهن بود تعیین شد و ازنظر آماری مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. اثر عوامل مختلف دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی یون آهن با تجزیه و تحلیل ضرائب رگرسیونی و واریانس ذکرشده در(جدول ۵) بررسی شد.

Table 4 The Central Composite Designs and antioxidant activity of hydrolysed-protein of cantalupe seed by alkalase enzyme

ferric reducing activity	DPPH radical scavenging activity(%)	Enzyme to substrate ratio (%) (%)	Temperature (C°)	Time (min)	Treatment
0/25	52/59	1/75	30	120	1
0/22	48/15	0/86	35	173/5	2
0/29	3/54	2/64	35	66/49	3
0/14	46/05	0/86	35	66/49	4
0/24	49/56	2/64	35	173/5	5
0/61	45/44	1/75	42/5	120	6
0/27	36/5	1/75	42/5	30	7
0/62	41/18	1/75	42/5	120	8
0/47	35/51	0/25	42/5	120	9
0/36	29/81	3/25	42/5	120	10
0/29	35/20	1/75	42/5	210	11
0/60	43/33	1/75	42/5	120	12
0/65	40/55	1/75	42/5	120	13
0/67	48/41	1/75	42/5	120	14
0/69	47/25	1/75	42/5	120	15
0/68	30/42	2/64	49/9	173/5	16
0/36	42/54	2/64	49/9	66/49	17
0/75	39/38	0/86	49/9	66/49	18
0/66	49/98	0/86	49/9	173/5	19
0/68	54/39	1/75	55	120	20

۵-۳-۱-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

باتوجه به‌جدول (۵) آنالیز سطح‌پاسخ مشخص نمود که رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با پارامترهای واکنش از نوع درجه‌دوم و R^2 =۰/۸۰۲۹ می‌باشد و بیانگر این است که مدل برازش‌شده توانسته ۸۰/۲۹٪ از کل تغییرات را در دامنه موردنظر برای مقادیر موردمطالعه توضیح‌دهد. R^2 معیاری است برای این‌که مشخص گردد چه‌میزان از تغییرات توسط مدل بیان‌شده است و در مورد R^2 و R^2 تعدیل‌شده که به‌ترتیب ۰/۸۰۲۹ و ۰/۵۸٤۰ به‌دست‌آمد گویای آن است که مدل برازش‌شده توصیف نسبتا مناسبی از پراکندگی داده‌ها داشته‌است. مناسب‌بودن مدل بااستفاده از آزمون عدم‌برازش مورد بررسی قرارگرفت. از آن‌جا که فرض آزمون عدم‌برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود، مدل براساس مهار رادیکال DPPH برازش گردید. برازش خوب به‌این معنی است که مدل ایجادشده تغییرات در داده‌ها را به‌اندازه کافی توضیح‌داده‌است. لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با پارامترهای واکنش، به‌صورت معادله (٤) نشان‌داده‌شده است.

معادله (٤)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH =

$$٤٤/٢١ - ٢/٤٠\ A - ٠/٤٦\ B - ١/٢٠\ C + ٠/١٤\ AB - ٣/٦٢\ AC - ٣/٩٦\ BC - ٤/٢٠\ A^2 - ٢/٠٤\ B^2 - ٣/١٦\ C^2 - ١/٩٩ ABC$$

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for DPPH radical scavenging activity

Coefficient	p-Value	Degree of freedom	Sum of square	Source
44/21	0/0317	10	834/13	**Model**
-2/40	0/0964	1	78/36	**A -Temperature**
-0/46	0/7271	1	2/95	**B -Time**
-1/20	0/3785	1	19/52	**C -(E/S)**
0/14	0/9356	1	0/16	**AB**
-3/26	0/0854	1	84/89	**AC**
-3/69	0/0561	1	109/22	**BC**
-4/20	0/0086	1	254/18	**A^2**
-2/04	0/1394	1	59/80	**B^2**
-3/16	0/0328	1	144/35	**C^2**
-1/99	0/2693	1	31/52	**ABC**
	0/0916	4	153/12	**Lack of Fit**

در نمودار سه‌بعدی **شکل ۲**، اثر هم‌زمان دما و زمان بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت آنزیم به سوبسترا (E/S) در نقطه مرکزی ۱/۷۵٪ مشاهده می‌شود. با افزایش دما، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH کاهش جزئی داشته به‌گونه‌ای که در دمای ٤۲/۵ C° به‌حداقل میزان خود رسیده و با افزایش دما مجددا شیب نمودار روند افزایشی دارد و در دمای ٤۹/۹ C° حداکثر میزان فعالیت مهارکنندگی مشاهده می‌شود. در نمودار موردنظر باافزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی افزایش یافته به‌گونه‌ای که در دمای ۱۲۰C° بیشترین مقدار فعالیت مهارکنندگی و سپس با گذشت زمان روند جزئی کاهشی در قابلیت مهارکنندگی رادیکال دیده می‌شود ومی‌تواند به‌این دلیل باشد که با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و ازشدت هیدرولیز، به‌دلیل کاهش در باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و فعالیت آنزیم، کاسته می‌شود بنابراین این احتمال وجود دارد که پپتیدهایی با قابلیت مهارکنندگی هیدرولیز می‌شوند[۲۸]. Rafi و همکاران (۲۰۱۵) در هیدرولیز پروتئین دانه درخت سوبابل (*Leucaena leucocephala*) توسط آنزیم آلکالاز گزارش نمودند که با افزایش دما، قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH تا دمای ۵۵ C° افزایش داشته و سپس با افزایش مجدد دما، دچار افت شده‌است. آن‌ها دلیل افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی را، افزایش تولید پپتیدها در سوپرناتانت دانسته‌اند[۲۹]. از طرفی می‌توان کاهش قابلیت آنتی‌اکسیدانی را به‌دلیل دناتوراسیون و تخریب ساختار پروتئینی آنزیم آلکالاز دانست که با افزایش دما باعث کاهش فعالیت و کارایی آن در تولید پپتیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی شده‌است. در نمودار سه‌بعدی **شکل۳**، اثر هم‌زمان زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) بر مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت دما ٤۲/۵ C° مشاهده می‌شود. با افزایش مقادیر زمان و E/S شاهد افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌باشیم. این مساله می‌تواند به‌دلیل تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی که منجر به بازشدن ساختار و قرارگیری درمعرض گروه‌های فعال آمینواسیدی که قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، ایجاد شده باشد[۳۰]. از طرفی تغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز تاثیر بسزایی در قدرت ضداکسایشی دارند[۳۱]. Sun و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی قدرت ضداکسایشی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز هموگلوبولین خوک اعلام کردند الزاما رابطه مستقیمی میان زمان هیدرولیز و خاصیت ضداکسیدانی وجود نداشته بلکه خاصیت ضداکسایشی پپتیدها جزء ویژگی‌های ذاتی آن بوده و وابسته به نوع اسیدآمینه موجود در پپتید است. به‌عنوان مثال تری‌پپتیدهای حاوی تریپتوفان یا تیروزین در انتهای پایانه C زنجیره یا یون هیدروکسیل اسیدهای آمینه آروماتیک درخاصیت ضداکسایشی پپتیدها موثر است [۳۰]. در نمودار سه‌بعدی شکل ٤ اثر هم‌زمان دما و E/S بر مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت زمان ۱۲۰min مشاهده می‌شود. با افزایش دما، شیب نمودار مهارکنندگی رادیکال DPPH ، ابتدا حالت نزولی به‌خود می‌گیرد و در دمای ٤۲/۵C° به کمترین مقدار خود می‌رسد اما مجددا با

افزایش دما شیب نمودار افزاینده و صعودی می‌شود و در دمای ٤٩/٩ C° بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده می‌شود. با افزایش مقدار E/S، افزایش فعالیت مهارکنندگی نسبی در نمودار مشاهده می‌شود که می‌تواند در اثر افزایش شدت هیدرولیز وتغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی حاصل، ایجادشده باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهد[٣٢].

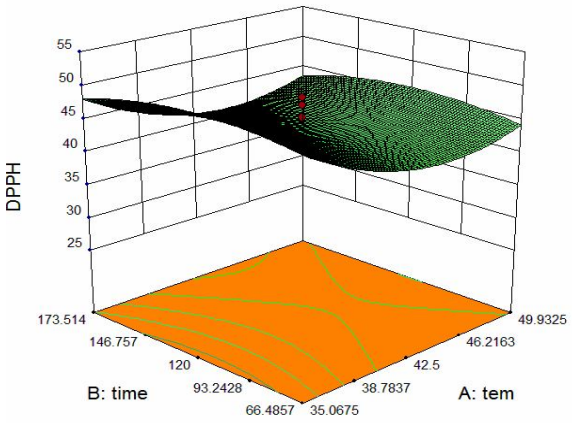

Fig 2 3D graph for the effect of hydrolysis time and temperature on the DPPH radical scavenging activity

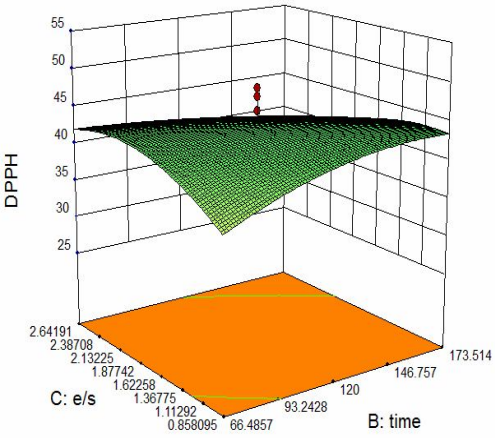

Fig 3 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and the hydrolysis time on the DPPH radical scavenging activity

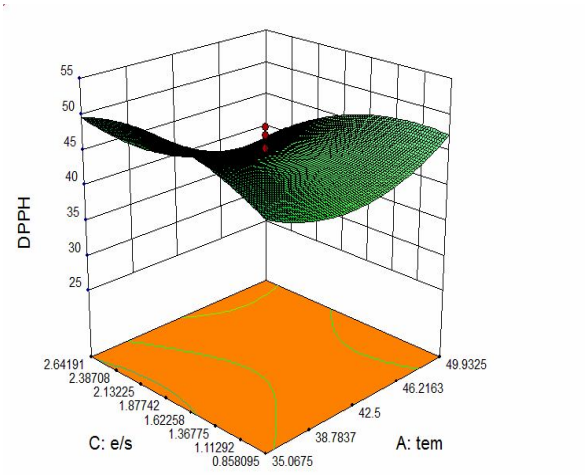

Fig 4 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and the hydrolysis temperature on the DPPH radical scavenging

٥-٣-١-٢- قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)

باتوجه به جدول ٦، آنالیز واریانس داده‌ها مشخص نمود که ارتباط بین قدرت احیاکنندگی یون آهن با متغیرهای واکنش از نوع درجه‌دوم و R^2 =٠/٩٦ می‌باشد و بیانگر این است که مدل رگرسیون، واکنش را به‌خوبی توضیح داده و مدل برازش‌شده توانسته ٩٦ ٪ از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این که مشخص‌گردد چه‌میزان از تغییرات توسط مدل شرح‌داده شده است. درمورد R^2 و R^2 تعدیل‌شده که به‌ترتیب ٠/٩٦ و ٠/٩١ به‌دست آمد، بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. مناسب‌بودن مدل بااستفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که معنی‌دار نبود. از آن‌جا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود ، مدل براساس قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجادشده، تغییرات در داده‌ها را به‌اندازه کافی توضیح داد. بنابراین این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورداستفاده مناسب بود. (معادله ٥) رابطه متغیرهای واکنش با قدرت احیاکنندگی را نشان می‌دهد:

معادله (٥) رابطه متغیرهای واکنش با قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) :

قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) =

$$+٠/٠٣٥BC - ٠/٠٥٢A^2 - ٠/١٢B^2 - ٠/٠٧٠\ C^2 + ٠/٠٦٧ABC$$

$$٠/٦٤ + ٠/١٧A + ٠/٠٢٢B - ٠/٠٢٨C + ٠/٠٢٥AB - ٠/٠٦٧AC$$

Table 6 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for ferric reducing activity

Coefficient	P-value	Degree of freedom	Sum of Square	Source
0/64	<0/0001	10	0/75	**Model**
0/17	<0/0001	1	0/38	**A-tem**
0/022	0/2068	1	31/6	**B-time**
-0/028	0/1081	1	0/011	**C- E/S**
0/025	0/2568	1	5/000	**AB**
−0/067	0/0097	1	0/036	**AC**
0/035	0/1243	1	9/8	**BC**
0/052	0/0080	1	0/039	**A2**
−0/12	<0/0001	1	0/20	**B2**
−0/070	0/0014	1	0/07	**C2**
0/067	0/0097	1	0/036	**ABC**
	0/0591	4	0/024	**Lack of fit**

در نمودار سه‌بعدی شکل ۵ اثر هم‌زمان دما و زمان بر قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت آنزیم به سوبسترا (E/S) در نقطه مرکزی ۱/۷۵٪ مشاهده می‌شود. با افزایش زمان هیدرولیز، ابتدا قدرت احیاکنندگی افزایش یافته به‌گونه‌ای که در زمان min ۱۲۰ به‌حداکثر میزان خود می‌رسد، سپس با افزایش زمان، شیب نمودار افت می‌کند. این روند با پژوهش نورمحمدی و همکاران(۲۰۱۷) مطابقت دارد. آن‌ها در تحقیق خود دلیل روند افزایشی نمودار را افزایش درجه‌هیدرولیز و در نتیجه افزایش تولید پپتیدهای دهنده الکترون و رهایش آن‌ها از زنجیره پروتئینی دانستند[۳۳]. از طرفی Khantaphant و همکاران(۲۰۱۱) در تحقیق خود علت افت مجدد شیب نمودار را به هیدرولیز بیش‌از اندازه و تجزیه پپتیدها که از میزان پپتیدهای الکترون‌دهنده می‌کاهد نسبت داده‌اند[۳٤]. در قسمت دیگر نمودار با افزایش دما، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش داشت به‌گونه‌ای که در دمای C° ٤۹/۹ حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده‌شد. این موضوع می‌تواند به این دلیل باشد که افزایش دما به‌علت ازهم‌گسستن باند بین پپتیدها و تبدیل آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر منجر به افزایش درجه هیدرولیز می‌گردد[۳۵]. و ازطرفی بسیاری از محققان گزارش نموده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهد[۳۳]. نمودار سه‌بعدی **شکل٦** اثر هم‌زمان دما و E/S را بر قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت زمان ۱۲۰min نشان می‌دهد. نمودار نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش مقدار دما پیوسته افزایش یافته به‌گونه‌ای که در دمای C° ٤۹/۹ به‌حداکثر میزان خود می‌رسد. با افزایش مقدار E/S ابتدا نمودار روند صعودی دارد و در مقدار حدودی ۱/۸۷٪ به بیشترین میزان خود می‌رسد اما با ادامه روند افزایش در E/S فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد. کاهش قابلیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش مقدار E/S می‌تواند به‌علت اثر هضم‌کنندگی آنزیم بر پپتیدهای تولیدی باشد. با افزایش مقدار E/S امکان اثر بر ماده پروتئینی افزایش یافته و این امر موجب شکستن تعدادی از پپتیدهای ضداکسایش تولیدشده می‌شود[۳٦]. نمودار سه‌بعدی **شکل ۷** اثر هم‌زمان زمان و E/S را بر قدرت احیاکنندگی یون آهن(III) پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت دما C°٤۲/۵ نشان می‌دهد. در نمودار موردنظر با افزایش زمان و E/S فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد. Bamdad و همکاران(۲۰۱۱) نیز با هیدرولیز پروتئین جو، گزارش نمودند که هیدرولیز تا min ۹۰ منجر به افزایش قدرت احیاکنندگی پپتیدهای حاصل شد اما هیدرولیز طولانی‌تر تاثیر منفی برقدرت احیاکنندگی آن‌ها داشت[۳۷].

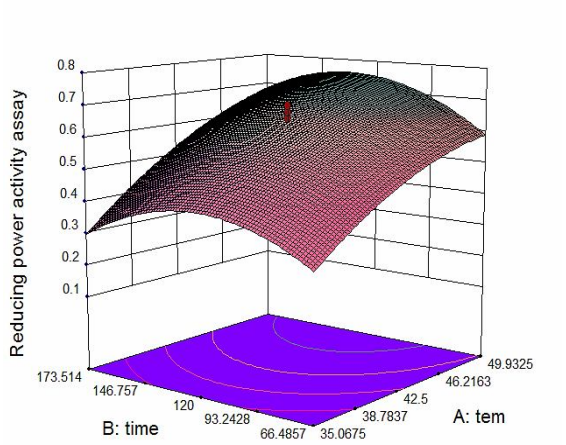

Fig 5 3D graph for the effect of temperature and hydrolysis time on the ferric reducing activity

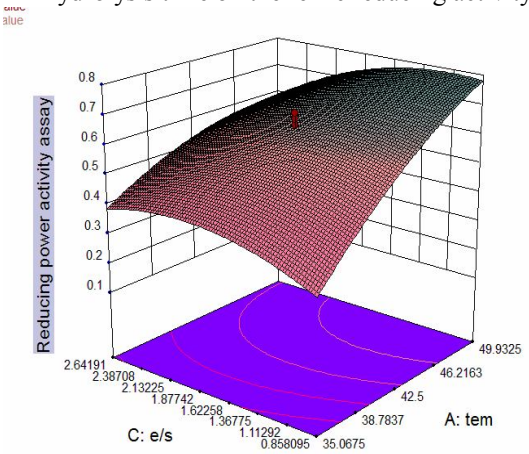

Fig 6 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis temperature on the ferric reducing activity

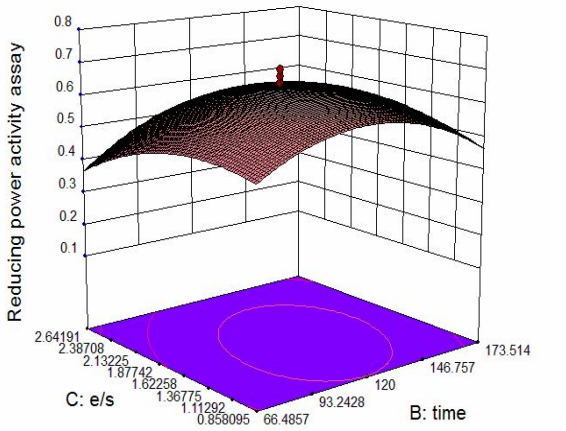

Fig 7 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis time on the ferric reducing activity

۵-۵-انتخاب تیمار بهینه و اعتبارسنجی مدل

پس از آنالیز داده‌ها، نرم‌افزار شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین قدرت احیاکنندگی (۰/۶۰) و مهار رادیکال DPPH (۴۸٪/۶۳) را در دمای C° ۴۹/۹ ، E/S ۰٪/۸۶ و زمان min ۱۷۳/۵ مشخص کرد، جهت ارزیابی اعتبار مدل، هیدرولیز پروتئین دانه طالبی توسط آنزیم آلکالاز، تحت این شرایط انجام و فعالیت مهار رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن به‌ترتیب ۵۰/۶۴ ٪ و ۰/۶۵ (جذب در ۷۰۰nm) به‌دست آمد. این نتایج بیانگر توانایی خوب مدل در پیش‌بینی اثر متغیرهای دما، زمان و غلظت آنزیم بر فرایند هیدرولیز می‌باشد.

۵-۵- درجه هیدرولیز تیمار بهینه

درجه هیدرولیز تیمار بهینه مقدار ۱/۱۵ ± ۳۸/۶۳ به‌دست آمد.

۵-۶-بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای بهینه

۵-۶-۱-فعالیت مهار رادیکال DPPH

رادیکال DPPH کاربرد گسترده‌ای به‌منظور ارزیابی فعالیت مهارکنندگی تعدادی از ترکیبات طبیعی دارد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ nm نشان می‌دهد. زمانی‌که رادیکال DPPH با یک ترکیب دهنده پروتون، مثلا ترکیب آنتی‌اکسیدانی، مواجه می‌شود، رادیکال‌ها مهارشده و میزان جذب کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش در مقدار جذب، معیاری برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌باشد[۳۸]. برای مقایسه فعالیت مهارکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک به‌عنوان یک عامل پروتون‌دهنده استفاده شد. به‌این صورت که غلظت‌های مختلف ۵۰ppm، ۱۰۰ ppm، ۱۵۰ ppm و ۲۰۰ ppm از اسیدآسکوربیک، پروتئین هیدرولیزشده و پروتئین هیدرولیزنشده تهیه‌شد. سپس آزمون سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بر روی غلظت‌های مختلف نمونه و استاندارد انجام شد. قدرت مهار رادیکال DPPH در پروتئین هیدرولیزنشده دانه طالبی به‌شکل معنی‌داری کمتر از پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از آنزیم‌های آلکالاز بود بنابراین آنزیم‌های مورد اسفاده در این پژوهش عملکرد مناسبی در رهایش پپتیدهای دهنده پروتون داشته‌اند. در تمامی غلظت‌های تهیه‌شده قدرت مهار رادیکال DPPH در اسیدآسکوربیک از پروتئین هیدرولیزشده بیشتر بود. در (جدول۷) اشاره شده‌است. قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به نوع پروتئاز به‌کار رفته، شرایط هیدرولیز، توالی و ترکیب آمینواسیدی آن‌ها بستگی دارد، به‌طور مثال

تری‌پپتیدهایی که دارای لیزین یا تریپتوفان در انتهای پایانه C خود هستند قدرت مهار رادیکال DPPH آن‌ها بسیار زیاد می‌باشد[۳۹]. نتایج این پژوهش موافق با یافته‌های Chi و همکاران(۲۰۱۵) بود که با هیدرولیز پروتئین نوعی جاندار دریایی با آنزیم نوترئاز به نسبت ۱/۵٪، به مدت ٦ ساعت، فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدها را وابسته به غلظت گزارش کردند، آن‌ها بیان کردند که با افزایش غلظت پپتیدها از ۰/۵ به (mg/ml) ۱۰، قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و از ۱٤/۳٪ به ۳۲/۱۷ ٪ رسید[٤۰].

Table 7 Comparison of DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed protein by alkalase, un hydrolyzed cantalupe seed protein and ascorbic acid at concentration of 50-200ppm

Un hydrolyzed Protein (%)	Hydrolyzed protein	Ascorbic acid(%)	Concentration(ppm)
12/26±0/05 ^{c}	53/33±0/20^{b}	65/19±0/11^{a}	50
15/27±0/14^{c}	58/41±0/29^{b}	68/23±0/09^{a}	100
19/26±0/11^{c}	64/19±0/17^{b}	74/15±0/11^{a}	150
24/35±0/19^{c}	68/23±0/09^{b}	82/29±0/20^{a}	200

STDEV±*Mean (p<0/05)

۵-٦-۲-قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)

در ارزیابی قدرت احیاکنندگی، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه‌های مورد بررسی موجب احیا کمپلکس فری‌سیانید Fe^{+3} به‌شکل فروس Fe^{+2} می‌شوند[٤۱]. با توجه به (جدول ۸) ، قدرت احیاکنندگی پروتئین دانه طالبی به‌میزان قابل ملاحظه‌ای کم‌تر از هیدرولیزشده‌ی حاصل از فعالیت آنزیم‌های آلکالاز بود، این امر حاکی از موفقیت‌آمیز بودن فرایند هیدرولیز در جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. با افزایش غلظت از ppm ۵۰-۲۰۰ قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از آلکالاز، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. به‌طور کلی تفاوت در قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها را می‌توان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پپتیدها مرتبط دانست. افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین که عموما از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردارند، موجب بهبود قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده می‌شود[٤۲]. Xie و همکاران(۲۰۰۸) نیز با هیدرولیز پروتئین برگ گیاه آلفالفا با آنزیم آلکالاز به مدت ٤ساعت و نسبت ۵٪، گزارش کردند که با افزایش غلظت تاmg/ml ۲/۵ قدرت احیاکنندگی هیدرولیزشده‌های حاصل افزایش یافت و به ۰/٦۹ (جذب در nm ۷۰۰) رسید اما این مقدار از بیشینه قدرت احیاکنندگی گلوتاتیون احیا (۱/۲) در غلظت mg/ml ۲/۵ کمتر بود[٤۳].

Table 8 Comparison of ferric reducing activity (Absorption at 700nm) of hydrolyzed protein by alkalase, un hydrolyzed cantalupe seed protein and ascorbic acid at concentration of 50-200ppm

Un hydrolyzed Protein(%)	Hydrolyzed protein	Ascorbic acid(%)	Concentration(ppm)
0/11±0/07 ^{c}	0/40 ±0/13^{b}	0/45±0/21^{a}	50
0/13±0/03^{c}	0/45±0/22^{b}	0/51±0/19^{a}	100
0/16±0/05^{c}	0/48±0/07^{b}	0/57±0/10^{a}	150
0/20±0/04^{c}	0/54±0/12^{b}	0/64±0/11^{a}	200

STDEV±*Mean (p<0/05)

۵-٦-۳-فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

یکی از گونه‌های اکسیژن فعال تولیدشده در بدن انسان رادیکال هیدروکسیل می‌باشد که به سهولت می‌تواند با مولکول‌های زیستی مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش و موجب اختلالات فیزیولوژیکی شود[٤٤]. از این رو حذف رادیکال هیدروکسیل موجب حفاظت بدن در برابر آن می‌شود. در(جدول۹) ، با افزایش غلظت از ppm ۵۰-۲۰۰ ، فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسل افزایش یافت و این قابلیت در پروتئین‌های هیدرولیزشده نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز نشده تفاوت قابل توجهی را نشان داد . از طرفی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نسبت به اسیدآسکوربیک کمتر بود. فعالیت ضداکسایشی پپتیدها به نوع اسیدآمینه و گروه‌های

فعالی بستگی دارد که طی فرایند هیدرولیز آزاد می‌شوند. ثابت شده‌است که آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با قابلت پروتون‌دهی به رادیکال‌های آزاد، دارای فعالیت ضداکسایشی در سیستم‌های غذایی هستند[٤٥]. youو همکاران (٢٠٠٩) نیز گزارش نمودند که فرایند هیدرولیز آنزیمی به شکل معناداری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین ماهی تیان شد. آن‌ها توانستند با افزایش درجه‌هیدرولیز به پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل به‌میزان ٥٦٪ دست‌یابند[٤٦].

Table 9 Comparison of OH radical scavenging activity of hydrolyzed protein by alkalase, un hydrolyzed cantalupe seed protein and ascorbic acid at concentration of 50-200ppm

Un hydrolyzed protein	Hydrolyzed protein	Ascorbic acid(%)	Concentration(ppm)
12/29±0/03^{c}	58/24±0/19^{b}	64/21±0/11^{a}	50
15/20±0/06^{c}	63/27±0/13^{b}	67/29±0/20^{a}	100
17/19±0/07^{c}	67/17±0/06^{b}	71/35±0/23^{a}	150
20/28±0/14^{c}	72/28±0/28^{b}	77/24±0/08^{a}	200

STDEV±*Mean (p<0/05)

٥-٦-٤-ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ارزیابی ظرفیت فسفومولیبدن، یک روش کمی برای بررسی قدرت انتی‌اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) است و برمبنای احیا مولیبدن ٦ظرفیتی به مولیبدن ٥ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است [٤٧]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز نشده دانه طالبی به‌میزان قابل توجهی کم‌تر از پروتئین‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز در محدوده غلظت ppm ٥٠-٢٠٠ بود. این امر نشان‌دهنده عملکرد مناسب آنزیم آلکالاز می‌باشد که با شکستن زنجیره پروتئین توانسته‌اند پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی تولید کنند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده درنتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است. با افزایش غلظت از ppm ٥٠-٢٠٠ طبق (جدول١٠) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های هیدرولیزشده توسط آنزیم آلکالاز به‌شکل معناداری افزایش یافت اما کمتر از اسیدآسکوربیک بود. کاوه(٢٠١٨) در پژوهش خود بر روی پروتئین هیدورلیزشده دانه شمبلیله توسط آنزیم آلکالاز و پانکراتین به این نتیجه دست یافت که با افزایش غلظت از (mg/ml) ١٠-٥٠ ، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و از ٠/٤٧ به ١/٣٢ (جذب در nm ٦٩٥) رسید اما در نمونه‌های حاصل از آنزیم پانکراتین ، با افزایش غلظت از (mg/ml) ١٠ به ٣٠ ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به‌طور معناداری افزایش یافت و به مقداربیشینه ١/٢١ رسید اما افزایش بیشتر غلظت تاثیری بر افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی نداشت[٤٧].

Table 10 Comparison of Total antioxidant capacity of hydrolyzed protein by alkalase, un hydrolyzed cantalupe seed protein and ascorbic acid at concentration of 50-200ppm

Un hydrolyzed Protein(%)	Hydrolyzed protein	Ascorbic acid(%)	Concentration(ppm)
0/10 ±0/09 ^{c}	**0/42±0/07^{b}**	**0/48±0/11^{a}**	**50**
0/13±0/05 ^{c}	**0/45±0/12^{b}**	**0/54±0/13^{a}**	**100**
0/17±0/06 ^{c}	**0/47±0/15^{b}**	**0/57±0/09^{a}**	**150**
0/19±0/10^{c}	**0/52±0/10^{b}**	**0/62±0/14^{a}**	**200**

STDEV±Mean (p< 0/05)

٦- نتیجه‌گیری

امروزه پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین در غذاهای گوناگون شناخته شده و تحقیقات زیادی بر روی آن‌ها انجام‌شده‌است .این پپتیدها نقش‌های بیولوژیکی متنوعی را ایفا می‌کنند، یکی از نقش‌های بسیار مهم آن‌ها فعالیت آنتی - اکسیدانی است. ارتباط معکوس

میان فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها و وقوع بیماری‌ها در شماری از مطالعات به اثبات رسیده است. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که فعالیت مهار رادیکال DPPH، احیاکنندگی یون آهن(III) پروتئین هیدرولیزشده دانه طالبی به‌شکل معناداری تحت تأثیر پارامترهای زمان هیدرولیز، دما و غلظت آنزیم می‌باشد. شرایط بهینه برای دست‌یابی به بیش‌ترین فعالیت مهار رادیکال DPPH و قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) در هیدرولیز پرونئین دانه طالبی با آنزیم آلکالاز، دمای ۴۹/۹ C°، نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) ۰٪/۸٦، زمان ۱۷۳/۵ min تعیین گردید. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز نشده ، اسیدآسکوربیک و پروتئین هیدرولیزشده حاصل از آلکالاز در شرایط تیمار بهینه با محدوده غلظت ppm ۵۰-۲۰۰ نشان داد که قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده نسبت به محلول استاندارد مقایسه شده شامل اسید آسکوربیک پایین‌تر بود اما در عین حال مقادیر قابل قبولی را از خود نشان داد. ازطرفی قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده با آلکالاز در مقایسه با پروتئین هیدرولیزنشده به‌مقدار قابل توجهی بالاتر بود. ارزیابی تأثیر غلظت پروتئین هیدرولیزشده بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل حاکی از وابستگی قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای مربوطه به غلظت مورد استفاده بود. به‌طورکلی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به‌میزان درجه هیدرولیز، شرایط فرایند، ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها بستگی دارد.

۷- منابع

[1] Chakrabarti, S., S. Guha, and K. Majumder. (2018). Food-derived bioactive peptides in human health*: Challenges and opportunities*. Nutrients. **10**(11): pp. 1738.1755.

[2] Nourmohammadi, E. and S. Mahoonak, A. (2018). Health implications of bioactive peptides: a review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 14(13): 319-343.

[3] Bhat, Z., S. Kumar, and H.F. Bhat. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*. **52**(9): pp. 5377-5392.

[4] Tu, M., Mano. C, Shado, N. (2018). Advancement and prospects of bioinformatics analysis for studying bioactive peptides from food-derived protein: Sequence, structure, and functions. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 10(5): pp. 7-17.

[5] Daliri, E.B.-M., D.H. Oh, and B.H. Lee. (2017). Bioactive peptides. *Foods*. **6**(5): pp. 32.53.

[6] Tacias-Pascacio, V.G., Akadi, s. Borno, C. (2020). Use of Alcalase in the production of bioactive peptides: A review. *International Journal of Biological Macromolecules,*. 48(2):pp. 73-86.

[7] Wattanasiritham L, Theerakulkait C, Wickramasekara S, Maier CS, Stevens JF. (2016). Isolation and identification of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed rice bran protein. *Food Chemistry*. 19(2):pp.156-162.

[8] Hamid A, Aiyelaagbe O, Usman L, Ameen O, Lawal A. (2010). Antioxidants: Its medicinal and pharmacological applications. *African Journal of pure and applied chemistry*. 4(8):pp.142-151.

[9] Ismail, H. I., K. W. Chan, A. Mariod, A and Ismail, M. (2010). Phenolic content and antioxidant activity of cantaloupe (*Cucumis melo*) methanolic extracts. *Food Chemistry*, 119(2):pp. 643-647.

[10] Fang X, Xie N, Chen X, Yu H, Chen J.(2012). Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*. 90(4): pp.676-82.

[11] 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. *Journal of Functional Foods*.18(4):pp.1125-37.

[12]Ye N, Hu P, Xu S, Chen M, Wang S, Hong J. (2018). Preparation and characterization of antioxidant peptides from carrot seed protein. *Journal of Food Quality*. 7(5):pp. 232-246.

[13] Görgüç, A., E. Gençdağ, and F.M. (2020).Yılmaz, Bioactive peptides derived from plant origin by-products: Biological activities and techno-functional utilizations in food developments–A review. *Food Research International*.7(10).pp. 104-109.

[14] Varidi M, Heydari F, Shokrolahi Yancheshmeh, B. (2016). Evaluation of Physicochemical and Functional Properties

palm (Elaeis guineensis Jacq.) kernel protein hydrolysate. *Journal of functional foods*. 14(2): pp.63-75.

[25] 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. *Analytical biochemistry*. 269(2):pp.337-341.

[26] Elsohaimy S, Refaay T, Zaytoun M. (2015). Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Annals of Agricultural Sciences*. 60(2):pp.297-305.

[27] Assadpour E, Jafari S..M, Sadeghi Mahoonak A.S, Ghorbani M. (2011). Evaluation Of Protein Solubility And Water And Oil Holding Capacity Of The Legume Flours. Iranian Food Science And Technology Reseach Journal .6(3):pp. 184-192.

[28] Guérard F, Guimas L, Binet A.(2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of molecular catalysis B: Enzymatic. 19(5):pp.489-98.

[29] Rafi N, Halim N, Amin A, Sarbon N.
(2015). Response surface optimization of enzymatic hydrolysis conditions of lead tree (Leucaena leucocephala) seed hydrolysate. International Food Research Journal. 22(3): pp.232-45.

[30] 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):pp.53-60.

[31] Sadeghi Mahoonak A, MG. AT. MA. (2013). Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (carassius carassius) protein hydrolysate by response surface methodology. Journal of Food Processing and Preservation. 5(1):pp.95-110.

[32] Rajapakse N, Mendis E, Byun H-G, Kim S-K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. The Journal of nutritional biochemistry. 16(9):pp.562-9.

[33] Nourmohammadi E, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Alami M, Sadeghi A, (2017). The optimization of The production of anti- oxidative peptides from Enzymatic of Flour Produced from Iranian Native Cucurbitaceae Seed (Melon, Cantaloupe, Watermelon and Cucurbit). *Journal of Research and innovation in food science and industry*. 5(3):pp. 249-264.

[15] Vella, F.M., D. Cautela, and B. Laratta. (2019). Characterization of polyphenolic compounds in cantaloupe melon by-products. *Foods*. **8**(6): pp. 196-215

[16] Fundo JF, Miller FA, Garcia E, Santos JR, Silva CL, Brandão TR. (2018). Physicochemical characteristics, bioactive compounds and antioxidant activity in juice, pulp, peel and seeds of Cantaloupe melon. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 12(1):pp. 292-300.

[17] Feyzi S, Varidi M, Zare F, Varidi MJ.(2015). Fenugreek (Trigonella foenum graecum) seed protein isolate: extraction optimization, amino acid composition, thermo and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 95(15): pp. 3165-3176.

[18] Kinsella JE, Melachouris N.(1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 7(3):pp.219-280.

[19] Parvaneh V. (2013).Quality Control & the Chemical Analysis of Food. University of Tehran Press. 7th Edition. pp.213-220.

[20] Sarabandi K, Mahoonak AS, Hamishehkar H, Ghorbani M, Jafari SM. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*. 25(1) :pp. 19-28.

[21] Wu H-C, Chen H-M, Shiau, C-Y.(2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). *Food research international*. 36(9-10): pp.949-957.

[22] Ahmadi F, Kadivar M, Shahedi M. (2007). Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. *Food chemistry*.105(1): pp.57-64.

[23] Kaewka K, Therakulkait C, Cadwallader KR. (2009). Effect of preparation conditions on composition and sensory aroma characteristics of acid hydrolyzed rice bran protein concentrate. *Journal of cereal science*. 50(1):pp. 56-60.

[24] Chang SK, Ismail A, Yanagita T, Esa NM, Baharuldin MTH. (2015). Antioxidant peptides purified and identified from the oil

hydrolysis of Pumpkin seed protein. Iranian Food Science and Technology Research Journal. 13(1): pp.14-26.

[34] Khantaphant S, Benjakul S, Ghomi MR. (2011). The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (Lutjanus vitta). LWT-Food Science and Technology. 44(4):pp.1139-48.

[35] Piri Sh, Sadeghi Mahoonak A,Ghorbani M, Alami M.(2018). Optimization of whey protein hydrolysate production process by alcalase enzyme. Journal of Science and Food Industry. 15(77): pp. 135-144.

[36] Nourmohammadi E, Sadeghi Mahoonak A, Ghorbani M, Alami M, Sadeghi A, (2017). Optimization of pumpkin oil cake protein hydrolysis with Alcalase to achieve the maximum antioxidant activity. Journal of Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.9(1).pp.1-12.

[37] Bamdad F, Wu J, Chen L. 2011. Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. Journal of Cereal Science. 54(1):pp.20-28.

[38] Yust MdM, Millán‐Linares MdC, Alcaide‐Hidalgo JM, Millán F, Pedroche J. (2012). Hypocholesterolaemic and antioxidant activities of chickpea (Cicer arietinum L.) protein hydrolysates. Journal of the Science of Food and Agriculture. 92(9):pp.1994-2001.

[39] Saito K, Jin D-H, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51(12):pp.3668-74.

[40] 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. Journal of Functional Foods.23(7): pp. 301-313.

[41] Dorman H, Peltoketo A, Hiltunen R, Tikkanen M. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of de-odourised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. Food chemistry. 83(2):pp.255-62.

[42] Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, Nokihara K. (1996). Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry. 44(9):pp. 2619-23.

[43] Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Food chemistry. 111(2):pp.370-6.

[44] Cacciuttolo MA, Trinh L, Lumpkin JA, Rao G. (1993). Hyperoxia induces DNA damage in mammalian cells. Free Radical Biology and Medicine. 14(3):pp.267-76.

[45] Chen H-M, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. (1998). Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry. 46(1):pp.49-53.

[46] You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. Innovative food science & emerging technologies. 10(2):pp. 235-40.

[47] Kaveh Sh, (2018). Evaluation of physical and antioxidant properties of nano Vesicles loaded With bioactive peptides derived from the enzymatic hydrolysis of fenugreek seed protein (Trigonella foenum graceum) with alcalase and pancreatin. A thesis submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree of M.Sc. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of cantalupe (Cucumis melo var cantalupensis) seed protein Concentrate to achieve maximum antioxidant activity

Masoomeh Khosravi Larijany1*, Alireza Sadeghi Mahoonak2 , Mohammad Ghorbani3, Hoda Shahiry Tabarestaany4

1. MSc student of food science and Chemistry, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. Prof, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3. Associate Prof, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4. Assistant Prof, Department of food science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

ABSTRACT

In this study, cantalupe seed protein (Cucumis melo var cantalupensis) were used to obtain bioactive peptides with maximum antioxidant power (DPPH radical scavenging activity and reducing power for alkalase treatment,. For this purpose, in this study, the response surface methodology and central composite design with different levels of independent variables of enzyme to substrate ratio (E / S) 0.25%-3.25% , hydrolysis time 30-210 min, temperature 30C°-55 °C for alkalase enzyme. Optimal condition treatment obtained as enzyme to substrate ratio (E / S) 0.86, hydrolysis time 173.51 min and temperature 49.93 °C and adjasted-R2 for DPPH radical scavenging activity were 0.80 and 0.58, respectively, and for Fe2+ reducing power were 0.96 and 0.91 (alkalase treatment), respectively., indicating that the fitted model had a relatively good description of the data distribution. Antioxidant tests were performed using different concentrations of 50-200 ppm of the optimal treatment, and the results showed a positive effect of concentration on antioxidant properties. In all samples, hydrolyzed protein with alkalase showed higher antioxidant properties compared to unhydrolyzed protein, but was lower than the antioxidant activity of ascorbic acid as a positive control. The antioxidant properties of bioactive peptides make it possible to use them as a natural alternative to common antioxidant compounds in the food industry.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2020/ 11/ 11
Accepted 2022/ 02/ 27

Keywords:

Cantalupe Seed Protein,
Response Surface Methodology,
Alkalase Enzyme,
Enzymatic Hydrolysis,
Antioxidant properties.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.285

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.5.2

*Corresponding Author E-Mail:
mkhosravilarijany@gmail.com