



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

معصومه خسروی لاریجانی<sup>۱\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲</sup>، محمد قربانی<sup>۳</sup>، هدی شهری طبرستانی<sup>۴</sup>

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.

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

## اطلاعات مقاله

## چکیده

## تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۸/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۰۸

## کلمات کلیدی:

پروتئین دانه طالبی،

روش سطح‌پاسخ،

آنزیم آلکالاز،

هیدرولیز آنزیمی،

ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی.

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 ۲۱۰ - ۳۰ min و دمای ۵۵°C - ۳۰°C برای آنزیم آلکالاز استفاده شد. تیمار بهینه توسط نرم‌افزار برای پروتئین‌های هیدرولیزشده، نسبت آنزیم به سوبسترای (E/S) ۰/۸۶، زمان هیدرولیز ۱۷۳/۵۱ min و دمای ۴۹/۹۳°C تعیین شد.  $R^2$  و  $R^2$ - تعدیل شده برای فعالیت مهار رادیکال DPPH به ترتیب ۰/۸۰ و ۰/۵۸ و قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۹۱ به دست آمد. این نتایج گویای این است که مدل برازش شده توصیف نسبتاً مناسبی از پراکنندگی داده‌ها داشته است. بر روی غلظت‌های ۵۰-۲۰۰ ppm از تیمار بهینه، آزمون‌های 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 می‌سازد.

DOI: 10.52547/fsct.19.124.285

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.124.5.2

\* مسئول مکاتبات:

mkhosravilarijany@gmail.com

## ۱- مقدمه

اخیرا شواهد علمی ثابت کرده‌اند 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 اسید آمینه می‌باشند که از شکسته شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می‌شوند [۲]. این توالی در ساختار پروتئین والد به شکل غیرفعال بوده اما زمانی که آزاد می‌شوند، می‌توانند اثرات سلامتی بخش خود را بروز دهند [۳]. رایج‌ترین و گسترده‌ترین روش مورد استفاده برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال هیدرولیز آنزیمی می‌باشد [۴]. اضافه نمودن آنزیم به پیش‌ماده پروتئینی باید در دما و pH بهینه آنزیم صورت گیرد. 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 [۵]. پروتئین‌ها، 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 در میان پروتئین‌ها محسوب می‌شود. دانسیته آن ۱/۸ g/ml بوده و فعالیت آن با (AU) بیان می‌شود. تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از آنزیم آلکالاز (به‌تنهایی و یا مشترک با آنزیم‌های دیگر) موجب تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر می‌شود [۶]. واکنش‌های اکسیداتیو نقش قابل توجهی را در بدن موجودات زنده به‌خصوص انسان و مواد غذایی 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 مهار کردن زنجیره‌های کاتالستی آغازکننده واکنش اکسیداسیون و حذف ROS<sup>۲</sup> و RNS<sup>۳</sup>، از سلول‌ها در برابر آسیب‌های ایجاد شده توسط این مولکول‌های ناپایدار محافظت می‌کنند [۸]. پپتیدهای آنتی‌اکسیدان معمولا حاوی ۱۶-۵ اسید آمینه می‌باشند. پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مشتق شده از مواد غذایی، عموما ترکیباتی ایمن، سالم با وزن مولکولی کم، فعالیت بالا و جذب آسان در نظر گرفته می‌شوند. اسیدهای آمینه Tyr, Trp, Met, Lys, Cys و His<sup>۴</sup> نمونه‌هایی از آمینواسیدهایی هستند که سبب فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند، همچنین اسیدهای آمینه‌ی دارای ساختار آروماتیک، می‌توانند به رادیکال‌های آزاد پروتون اهدا نموده در نتیجه قابلیت به دام اندازی آن‌ها را فراهم می‌کنند [۹]. Fang و همکاران (۲۰۱۲) بر روی پروتئین‌های عضله ماهی مرکب پرند (*Ommastrephes bartrami*) که توسط پنج آنزیم پیپسین، تریپسین، پاپائین، آلکالاز و فلاورزایم هیدرولیز شده بودند، قدرت مهار رادیکال DPPH را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد هیدرولیز شده‌های حاصل از عملکرد آنزیم پاپائین، بهترین پتانسیل فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند [۱۰]. Ambigaipalan و همکاران (۲۰۱۵) آرد تولید شده از هسته خرما را با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزایم و ترمولیزین تحت شرایط هیدرولیز قرار دادند. آنزیم‌ها به صورت جداگانه و ترکیبی، در pH و دمای ثابت مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج نشان داد در تیمارهایی که از ترکیب آنزیم آلکالاز و فلاورزایم برای هیدرولیز پروتئین استفاده شده بود، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شد [۱۱]. Yen و همکاران (۲۰۱۸)

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

1. Anson Unit

میوه طالبی (*Cucumis melo var cantalupensis*) از بازار تهیه شد و دانه‌ها به صورت دستی از میوه‌ها جدا شدند. سود، اسیدکلریدریک و فریک کلراید از برند مرک، رادیکال DPPH از برند سیگما، اتانول ۹۶٪ از برند پارس‌الکل تهیه شدند. تمام موارد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

## ۲-۱- چربی‌گیری از دانه طالبی

دانه‌های جداسازی شده پس از شست و شو با آب، در آونی که بر روی دمای  $50^{\circ}\text{C}$  تنظیم شده بود به مدت ۳ ساعت قرار گرفتند. به منظور تهیه پودر نرم (آرد)، از روش Feyzi و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی تغییرات استفاده شد. دانه‌های خشک شده به وسیله آسیاب الکتریکی تبدیل به پودر شدند. پودرهای حاصله با هگزان به نسبت (W/V) ۱:۴ مخلوط شده و برای مدت ۵ ساعت به صورت مکرر به وسیله شیکر با سرعت  $2000\text{ rpm}$  هم زده شد. سپس پودر چربی‌گیری شده به منظور تبخیر هگزان اضافی به مدت ۱۲ ساعت در آون با دمای  $50^{\circ}\text{C}$  قرار گرفت و سپس از الک با مش ۴۰ عبور داده شد [۱۷].

## ۲-۲- تعیین پروفایل حلالیت پروتئین آرد دانه

### طالبی به روش برادفورد

برای تعیین پروفایل حلالیت از روش Kinsella و Melachouris (۱۹۷۶) با اندکی تغییرات استفاده شد. ابتدا  $g$  ۰/۵ از آرد الک شده و چربی‌گیری شده‌ی دانه طالبی را در بشر  $100\text{ ml}$ ، به  $50\text{ ml}$  آب مقطر اضافه نموده و سوسپانسیون حاصل برای مدت یک ساعت در دمای اتاق بر روی همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس pH سوسپانسیون توسط سود و اسیدکلریدریک  $1\text{ N}$  در  $10^{\circ}\text{pH}$  (سطح ۱، ۲، ۳، ۴، ۵، ۶، ۷، ۸، ۹ و  $10^{\circ}\text{pH}$ ) تنظیم شده و پس از رسیدن به pH مورد نظر محتویات بشر به لوله فالكون منتقل شده سپس با سرعت  $4000\text{ rpm}$  و زمان  $15\text{ min}$  سانتریفیوژ انجام شد سپس سوپرناتانت را جدا کرده و میزان حلالیت پروتئین به روش برادفورد در طول

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی به دست آمده از تخم هویج را مورد بررسی قرار دادند. در این پژوهش، پروتئین تخم هویج پس از استخراج، توسط چهار آنزیم پاپائین، تریپسین، نوتراز و آلکالاز، هیدرولیز شد. پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز، بیشترین و قوی‌ترین میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH<sup>۱</sup> را نشان داد [۱۲]. دانه‌ها و کنجاله‌ها از رایج‌ترین محصولات جانبی می‌باشند که معمولاً ۵۰٪-۵٪ ماده خام اولیه را شامل می‌شوند. این محصولات که می‌توانند در نتیجه‌ی فعالیت‌های کشاورزی و صنعتی تولید شوند، به عنوان منابعی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال در نظر گرفته می‌شوند [۱۳]. در حال حاضر به جز بذر اصلاح شده‌ی این دانه‌ها که جهت کاشت توسط جهاد کشاورزی در اختیار کشاورزان قرار می‌گیرد و نیز مصرف محدود آن‌ها به صورت آجیل، استفاده دیگری از آن‌ها به عمل نمی‌آید [۱۴]. طالبی (*Cucumis melo var. cantalupensis*) از خانواده کدویان، یکی از پرمصرف‌ترین ملون‌ها در سراسر جهان به دلیل شیرینی، طعم مطلوب و ارزش تغذیه‌ای می‌باشد [۱۵]. از آن جایی که ضایعات طالبی (پوست و دانه) حدود ۳۲ درصد وزن کل طالبی را دربر می‌گیرد استفاده ارزشمند از آن‌ها، امروزه به عنوان یک چالش گسترش پیدا کرده است [۱۶]. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین استخراج شده از دانه طالبی با استفاده از آنزیم آلکالاز به روش سطح پاسخ برای دستیابی به بیشترین قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) و مهار رادیکال آزاد DPPH است. در این تحقیق، تأثیر غلظت‌های مختلف تیمار بهینه (۵۰-۲۰۰ ppm) بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن مورد بررسی قرار گرفت و با قدرت آنتی‌اکسیدانی اسیدآسکوربیک و پروتئین هیدرولیز نشده مقایسه شد.

## ۲- مواد و روش‌ها

2. Revolution per Minute

1. 2,2 - Diphenyl -1- picrylhydrazyl

## ۲-۵- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، ابتدا پروتئین دانه طالبی در غلظت ۵٪ (w/v) در بافر فسفات ۰/۲ M حل شد و pH سوسپانسیون حاصل در محدوده pH بهینه برای فعالیت آنزیم آلکالاز (pH=۸) به کمک سود و اسید ۱N تنظیم شده و امکان هیدراته شدن آن با شیک کردن به مدت ۳۰ min 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 ۵۰ C° - ۳۰ C° و زمان ۲۱۰ - ۳۰ min در pH=۸ در انکوباتور شیکردار انجام شد. پس از گذشت زمان موردنظر، با استفاده از حمام آب ۹۰ C° به مدت ۱۰ min غیرفعال‌سازی آنزیم صورت گرفت و نمونه‌ها با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. سپس برای حذف ترکیبات اضافی با دور ۵۰۰۰ ×g به مدت ۳۰ min سانتریفیوژ انجام شد، سوپرناتانت جدا شده با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۲۰ C° - نگره‌داری شد [۲۰].

## ۲-۶- بهینه‌سازی فرایند، جهت دستیابی به

### تیمار با بیشترین خواص آنتی‌اکسیدانی

به منظور بهینه‌سازی فرایند از نظر خواص ضد اکسایشی از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ<sup>۲</sup>، طرح مرکب مرکزی<sup>۳</sup> برای سه متغیر مستقل غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز در پنج سطح (+α، +، ۰، -۱، -α) استفاده شد. پاسخ مورد بررسی خاصیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (معادله ۱) و قابلیت احیاکنندگی یون آهن (III)<sup>۴</sup> (معادله ۲)، برای تیمارهای آنزیم آلکالاز می‌باشد. برای هر آنزیم ۲۰ تیمار تصادفی با در نظر گرفتن شش تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم‌افزار پیشنهاد شد. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در (جدول ۱) و تیمارهای مربوطه در (جدول ۲) نشان داد ه شده است.

موج ۵۹۵ nm اندازه‌گیری شد به این صورت که ۵۰ μl از سوپرناتانت با ۲/۵ ml معرف برادفورد ورتکس شده و جذب آن در ۵۹۵ nm خوانده شد. برای تهیه‌ی نمونه شاهد، ۵۰ μl آب مقطر با ۲/۵ ml معرف برادفورد ترکیب شد. برای تهیه‌ی منحنی استاندارد، از غلظت‌های مختلف آلبومین سرم گاوی (BSA)<sup>۱</sup> استفاده گردید. برای این کار ابتدا محلول غلیظ (۱ μg/ml) از BSA ساخته، سپس از این محلول، غلظت‌های ۵۰-۱۰ μg/ml تهیه شد. ۵۰ μl از غلظت‌های استاندارد با ۲/۵ ml از محلول برادفورد (با معادله خط - Y=0/001x - 0/0068) ترکیب و کاملاً مخلوط شده سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۹۵ nm ثبت گردید [۱۸].

## ۲-۳- استخراج پروتئین از دانه طالبی

برای استخراج پروتئین، از روش Feyzi و همکاران (۲۰۱۵) با اندکی اصلاحات انجام گرفت. ابتدا پودر چربی‌گیری شده به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر مخلوط شده سپس با استفاده از سود ۱ N، pH = ۱۰ تنظیم و به مدت ۱ ساعت هم‌زده شد. سوسپانسیون حاصل به مدت ۳۰ min با سرعت ۴۵۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. در مرحله بعد سوپرناتانت حاصل با استفاده از اسید کلریدریک ۱ N بر روی pH = ۳ که نقطه ایزوالکتریک پروتئین دانه طالبی می‌باشد تنظیم شده و به مدت ۲۰ min با سرعت ۴۵۰۰ rpm جهت رسوب پروتئین سانتریفیوژ شد. رسوب حاصل (کنسانتره پروتئینی) پس از شست و شو با آب مقطر جدا شده و در پلیت ریخته شد و با خشک‌کن انجمادی خشک گردید و در دمای ۲۰ C° - نگهداری شد [۱۷].

## ۲-۴- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی (رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین) آرد چربی‌گیری شده‌ی دانه طالبی و پروتئین استخراج شده انجام شد [۱۹].

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

1. Bovine Serum Albumin

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

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

**Table 2** The random treatments of hydrolysed-protein of cantaloupe 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

### ۳-۸- تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن

(III):

برای تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن در نمونه‌های هیدرولیزشده، ۰/۵ ml از نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۵ ml بافر فسفات ۰/۲ M (pH = ۶/۶) و ۰/۵ ml پتاسیم فری سیانید (w/v) ۱٪ مخلوط و در دمای ۳۰°C برای ۵۰ min انکوبه شد. سپس، ۰/۵ ml محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ min در ۲۵۰۰ rpm سانتیفریوژ شد. در نهایت، ۱ ml سوپرناتانت با ۱ ml آب مقطر و ۰/۲ ml فریک کلراید (w/v) ۰/۱٪ مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ nm پس از ۱۰ min نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل

### ۳-۷- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ابتدا پودرهای هیدرولیزشده در آب مقطر در غلظت (۴۰ mg/ml) حل شدند. سپس ۱/۵ ml از هر نمونه با ۱/۵ ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) مخلوط و به مدت ۲۰ S ورتکس شد. سپس مخلوط ۳۰ min در تاریکی نگهداری شد و بعد با دور ۲۵۰۰×g به مدت ۱۰ min سانتریفیوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شده و با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید [۲۱].

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

$A_{\text{Control}}$ : جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می‌شود)  $A_{\text{Sample}}$ : جذب نمونه می‌باشد

As: جذب نمونه  $A_{611}$ : جذب نمونه کنترل منفی که شامل تمام ترکیبات بالا به جز پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد.  $A_b$ : جذب نمونه بلانک که شامل ترکیبات بالا به جز نمونه پروتئین هیدرولیز شده و آب اکسیژنه می‌باشد.

#### ۴-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

جهت انجام این آزمون، برای این روش ابتدا  $100 \mu\text{l}$  محلول پروتئین هیدرولیز شده (غلظت ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰) را با  $1000 \mu\text{l}$  معرف مولیبدات آمونیوم (اسیدسولفوریک  $0.7 \text{ M}$ ، سدیم فسفات  $28 \text{ mM}$  و مولیبدات آمونیوم  $4 \text{ mM}$ ) مخلوط کرده و به مدت  $90 \text{ min}$  در بنماری  $95^\circ\text{C}$  قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج  $690 \text{ nm}$  اندازه‌گیری شد [۲۵].

#### ۴-۴- تجزیه و تحلیل آماری و رسم نمودار

تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۲ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیرها در سطح  $P < 0.05$  و رسم 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 استخراج شده از آن (جدول ۳)، مقدار پروتئین پس از استخراج، کنسانتره در نظر گرفته شد و نسبت به آرد چربی گیری شده، میزان پروتئین به شکل قابل توجهی افزایش و مقدار چربی، رطوبت و خاکستر نیز تا حدودی کاهش یافته‌است. کاهش میزان چربی و افزایش میزان پروتئین در کنسانتره می‌تواند به دلیل استخراج پروتئین در محیط قلیایی و رسوب آن در نقطه ایزوالکتریک باشد. کاهش رطوبت در کنسانتره می‌تواند به دلیل استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی برای خشک کردن رسوب پروتئینی حاصل از استخراج باشد و کاهش میزان خاکستر در کنسانتره به دلیل این است که هنگام استخراج پروتئین مقدار زیادی از ترکیبات غیر پروتئینی در  $10 = \text{pH}$  رسوب نمودند. طی اندازه‌گیری که وریدی و همکاران (۲۰۱۶) بر روی ترکیبات شیمیایی آرد چربی گیری شده حاصل از دانه‌ی طالبی و از نوع وارته‌ی تیل به انجام

استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، نشان‌دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی است [۲۲].

#### ۸-۳- تعیین درجه هیدرولیز تیمار بهینه

$10 \text{ ml}$  محلول پروتئین هیدرولیز شده با  $10 \text{ ml}$  اتری کلرواستیک اسید  $10\%$  (TCA) مخلوط شد و دردمای  $4^\circ\text{C}$  به مدت  $10 \text{ min}$  با سرعت  $10000 \text{ rpm}$  سانتریفیوژ شد. میزان نیتروژن موجود در سوپرناتانت و نیتروژن کل با روش کج‌دلال تعیین شد [۲۳]. در نهایت درجه هیدرولیز با استفاده از معادله (۲) محاسبه گردید:

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

Total nitrogen the hydrolyzed sample

#### ۴-۴- بررسی تأثیر غلظت بر خصوصیات

#### آنتی‌اکسیدانی تیمار بهینه هیدرولیز شده

#### ۴-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

#### تعیین قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)

برای تعیین تأثیر غلظت‌های مختلف تهیه شده از تیمار بهینه ( $50, 100, 150, 200 \text{ ppm}$ ) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، میزان قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) به ترتیب از روش Wu و همکاران [۲۱] (بند ۳-۶)، Ahmadi و همکاران [۲۲] (بند ۳-۷) استفاده شد.

#### ۴-۲- اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال

#### OH

جهت انجام آزمون، ابتدا  $100 \mu\text{l}$  از محلول فنانترولین  $1 \text{ mM}$  و  $1/865$  و  $200 \mu\text{L}$  محلول پروتئین هیدرولیز شده (در غلظت ppm ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰) با هم مخلوط شدند. سپس  $100 \mu\text{L}$  از محلول سولفات آهن  $1/865 \text{ mM}$   $\text{v.H}_2\text{O}$  به مخلوط فوق اضافه گردید و پس از مخلوط شدن،  $100 \mu\text{L}$  آب اکسیژنه  $3\% \text{ W/W}$  نیز به محتویات فوق افزوده شد و پس از انکوبه شدن محتویات دردمای  $37^\circ\text{C}$  به مدت  $60 \text{ min}$ ، در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج  $538 \text{ nm}$  قرائت گردید [۲۴] و درصد قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل از معادله (۳) محاسبه شد:

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

1. Part per Million

جاری را می‌توان ناشی از اختلاف در نوع واریته و نوع فرایند دانست.

رسانیدند، پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر را به ترتیب  $0.8 \pm$ ،  $58.9 \pm 0.9$ ،  $8.1 \pm 0.7$  و  $5.8 \pm 0.1$  و  $2.6 \pm 0.1$  گزارش نمودند [۱۴]، که تفاوت این اعداد با اعداد موجود در تحقیق

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

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

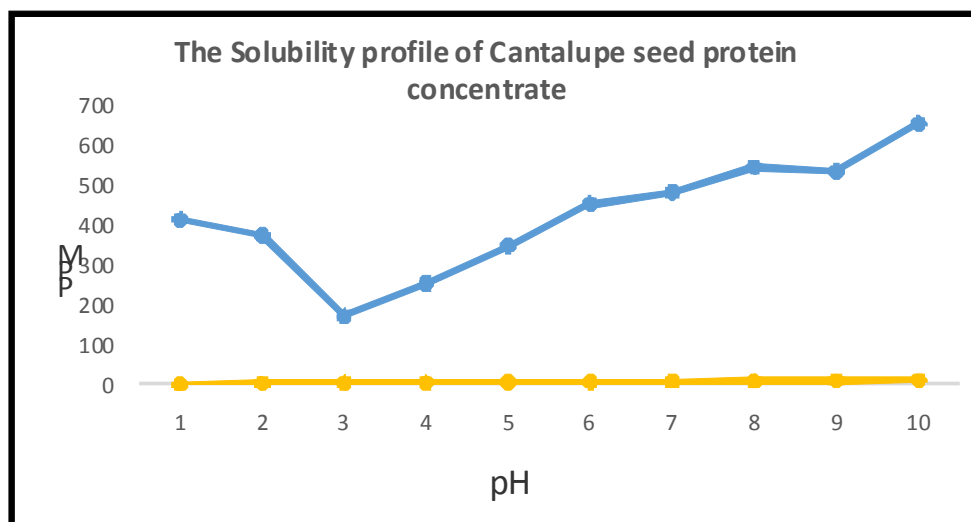
\*The values are based on dry weight  
STDEV $\pm$ \*Mean

مثبت و منفی و در نتیجه کاهش نیروی دافعه الکترواستاتیک عنوان شده است. مشاهده حداکثر میزان حلالیت در  $\text{pH} = 10$  با اکثر مقالات منتشر شده مطابقت دارد زیرا با کاهش یا افزایش از نقطه ایزوالکتریک، دامنه الکترواستاتیک زیاد شده و همچنین در این حالت تعداد زنجیره‌های جانبی آبریز کاهش یافته و آب‌گیری یونی به‌ویژه در مقادیر  $\text{pH}$  بالاتر بیشتر می‌شود [۲۷]. در پژوهشی که وریدی و همکاران (۲۰۱۶) به منظور تعیین پروفایل حلالیت پروتئین آرد حاصل از دانه طالبی از نوع واریته تیل به‌انجام رسانیدند، کمترین میزان حلالیت در  $\text{pH} = 4.5$  و بیشترین میزان حلالیت در  $\text{pH} = 12$  تعیین شد. همچنین اختلاف در پروفایل حلالیت آردهای مختلف را به دلیل تفاوت در ترکیب شیمیایی آن‌ها، تفاوت در مقدار و توزیع گروه‌های جانبی هیدروفیل و هیدروفوب (به‌خصوص در اسیدهای آمینه سطحی پروتئین) و دناتوراسیون پروتئین را در حین فرایند چربی‌گیری که تابع میزان و نوع اسید آمینه می‌باشد، دانسته‌اند [۱۴].

## ۵-۲- تعیین پروفایل حلالیت پروتئین در آرد

### دانه طالبی به‌روش برادفورد

حلالیت پروتئین آرد چربی‌زدایی شده‌ی دانه طالبی در (شکل ۱) آورده شده است. در نمودار موردنظر که محور زرد رنگ بیانگر  $\text{pH}$  و خط آبی‌رنگ بیانگر میزان حلالیت در  $\text{pH}$  موردنظر می‌باشد. حلالیت پروتئین آرد از  $\text{pH} = 1$  به تدریج کاهش یافته و در  $\text{pH} = 3$  به حداقل مقدار خود می‌رسد که نقطه ایزوالکتریک نامیده می‌شود. هرچه از  $\text{pH}$  نقطه ایزوالکتریک به سمت  $\text{pH}$  قلیایی پیش می‌رود مجدداً حلالیت افزایش پیدا کرده به‌گونه‌ای که در  $\text{pH} = 10$  حداکثر میزان حلالیت دیده می‌شود. در پژوهش‌های مختلف نقطه ایزوالکتریک برای پروتئین‌های گیاهی مانند حبوبات:  $4.6/4.8$ ، برنج:  $4.22/4.5$  و گندم:  $4.5$  گزارش شده است [۲۶]. دلیل کاهش حلالیت در نقطه ایزوالکتریک، کاهش نیروی دافعه در بین اسیدهای آمینه‌ی تشکیل‌دهنده پروتئین و توازن بین یون‌های



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

## ۳-۵- بهینه‌سازی

## ۳-۵-۱- 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 ۴)

**Table 4** The Central Composite Designs and antioxidant activity of hydrolysed-protein of cantaloupe 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

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 توضیح داده‌است. لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با پارامترهای واکنش، به‌صورت معادله (۴) نشان‌داده‌شده است.

معادله (۴)

= فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

$$AC-3/96 BC-4/20 A^2-2/04 B^2-3/16 C^2 -1/99 ABC$$

$$44/21 -2/40 A -0/46 B -1/20 C +0/14 AB-3/62$$

## ۳-۵-۱-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

باتوجه به‌جدول (۵) آنالیز سطح‌پاسخ مشخص نمود که رابطه مهار رادیکال آزاد DPPH با پارامترهای واکنش از نوع درجه‌دوم و  $R^2 = 0/8029$  می‌باشد و بیانگر این است که مدل برازش‌شده توانسته  $80/29\%$  از کل تغییرات را در دامنه موردنظر برای مقادیر مورد مطالعه توضیح دهد.  $R^2$  معیاری است برای این‌که مشخص گردد چه‌میزان از تغییرات توسط مدل بیان‌شده است و در مورد  $R^2$  و  $R^2$  تعدیل‌شده که به‌ترتیب  $0/8029$  و  $0/5840$  به‌دست‌آمد گویای آن است که مدل برازش‌شده توصیف نسبتاً مناسبی از پراکنندگی داده‌ها داشته‌است. مناسب‌بودن مدل با استفاده از آزمون عدم‌برازش مورد بررسی قرارگرفت. از آن‌جا که فرض آزمون عدم‌برازش

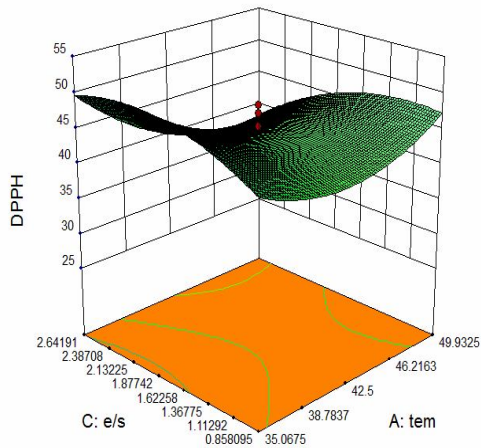


**Table 5** Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for DPPH radical scavenging activity

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 <sup>2</sup>
-2/04	0/1394	1	59/80	B <sup>2</sup>
-3/16	0/0328	1	144/35	C <sup>2</sup>
-1/99	0/2693	1	31/52	ABC
	0/0916	4	153/12	Lack of Fit

فعالیت و کارایی آن در تولید پپتیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی شده‌است. در نمودار سه‌بعدی شکل ۳، اثر هم‌زمان زمان و نسبت آنزیم به سویسترا (E/S) بر مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده در مقدار ثابت دما  $42/5^{\circ}\text{C}$  مشاهده می‌شود. با افزایش مقادیر زمان و E/S شاهد افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی می‌باشیم. این مساله می‌تواند به دلیل تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی که منجر به باز شدن ساختار و فرارگیری در معرض 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 هموگلوبین خوک اعلام کردند الزاماً 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 در خاصیت ضداکسایشی پپتیدها موثر است [۳۰]. در نمودار سه‌بعدی شکل ۴ اثر هم‌زمان دما و E/S بر مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده در مقدار ثابت زمان  $120\text{min}$  مشاهده می‌شود. با افزایش دما، شیب نمودار مهارکنندگی رادیکال DPPH، ابتدا حالت نزولی به‌خود می‌گیرد و در دمای  $42/5^{\circ}\text{C}$  به کمترین مقدار خود می‌رسد اما مجدداً با

در نمودار سه‌بعدی شکل ۲، اثر هم‌زمان دما و زمان بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده در مقدار ثابت آنزیم به سویسترا (E/S) در نقطه مرکزی  $1/75\%$  مشاهده می‌شود. با افزایش دما، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH کاهش جزئی داشته به‌گونه‌ای که در دمای  $42/5^{\circ}\text{C}$  به‌حداقل میزان خود رسیده و با افزایش دما مجدداً شیب نمودار روند افزایشی دارد و در دمای  $49/9^{\circ}\text{C}$  حداکثر میزان فعالیت مهارکنندگی مشاهده می‌شود. در نمودار موردنظر با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی افزایش یافته به‌گونه‌ای که در دمای  $120^{\circ}\text{C}$  بیشترین مقدار فعالیت مهارکنندگی و سپس با گذشت زمان روند جزئی کاهش در قابلیت مهارکنندگی رادیکال دیده می‌شود و می‌تواند به این دلیل باشد که با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و از شدت هیدرولیز، به دلیل 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  $55^{\circ}\text{C}$  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 به دلیل دناتوراسیون و تخریب ساختار پروتئینی آنزیم آلکالاز دانست که با افزایش دما باعث کاهش



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

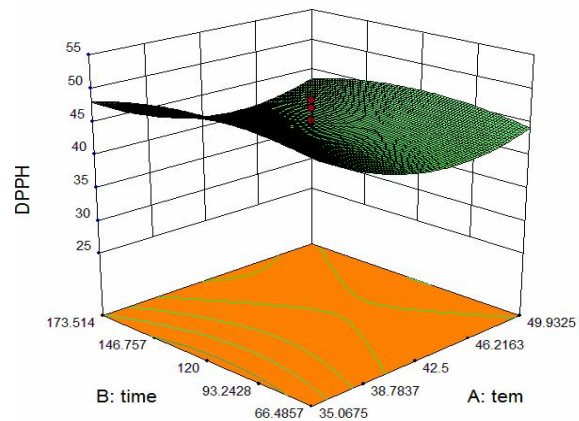
### ۵-۳-۱-۲- قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)

باتوجه به جدول ۶، آنالیز واریانس داده‌ها مشخص نمود که ارتباط بین قدرت احیاکنندگی یون آهن با متغیرهای واکنش از نوع درجه دوم و  $R^2 = 0.96$  می‌باشد و بیانگر این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۶٪ از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد.  $R^2$  معیاری است برای این که مشخص‌گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است. در مورد  $R^2$  و  $R^2$  تعدیل شده که به ترتیب ۰/۹۶ و ۰/۹۱ به دست آمد، بیانگر توصیف مناسبی از پراکنندگی داده‌ها بود. مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که معنی دار نبود. از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی دار نبود، مدل براساس قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجادشده، تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح داد. بنابراین این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود. (معادله ۵) رابطه متغیرهای واکنش با قدرت احیاکنندگی را نشان می‌دهد:

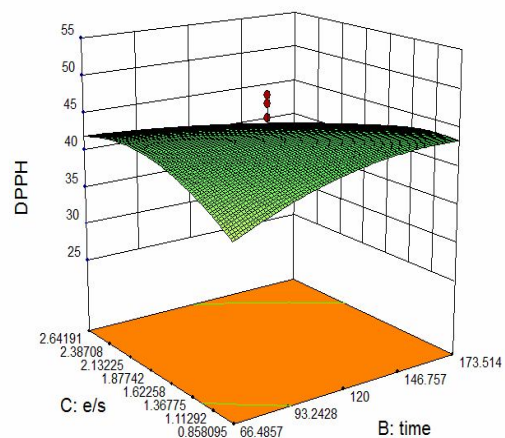
معادله (۵) رابطه متغیرهای واکنش با قدرت احیاکنندگی یون آهن (III):

$$\begin{aligned} \text{قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)} = & +0.035BC - 0.052A^2 - 0.112B^2 - 0.070C^2 + 0.067ABC \\ & + 0.764 + 0.17A + 0.22B - 0.28C + 0.25AB - 0.067AC \end{aligned}$$

افزایش دما شیب نمودار افزایشده و صعودی می‌شود و در دمای  $49/9\text{ }^\circ\text{C}$  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 و تغییر 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 [۳۲].



**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

**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

سه‌بعدی شکل ۶ اثر هم‌زمان دما و E/S را بر قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت زمان ۱۲۰ min نشان می‌دهد. نمودار نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش مقدار دما پیوسته افزایش یافته به‌گونه‌ای که در دمای  $49/9\text{ }^{\circ}\text{C}$  به‌حداکثر میزان خود می‌رسد. با افزایش مقدار E/S ابتدا نمودار روند صعودی دارد و در مقدار حدودی  $1/87\%$  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 [۳۶]. نمودار سه‌بعدی شکل ۷ اثر هم‌زمان زمان و E/S را بر قدرت احیاکنندگی یون آهن (III) پروتئین هیدرولیزشده در مقدار ثابت دما  $42/5\text{ }^{\circ}\text{C}$  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 ۹۰ min منجر به افزایش قدرت احیاکنندگی پپتیدهای حاصل شد اما هیدرولیز طولانی‌تر تاثیر منفی بر قدرت احیاکنندگی آن‌ها داشت [۳۷].

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  $1/75\%$  مشاهده می‌شود. با افزایش زمان هیدرولیز، ابتدا قدرت احیاکنندگی افزایش یافته به‌گونه‌ای که در زمان ۱۲۰ min 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 [۳۴]. در قسمت دیگر نمودار با افزایش دما، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش داشت به‌گونه‌ای که در دمای  $49/9\text{ }^{\circ}\text{C}$  حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شد. 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 از طرفی بسیاری از محققان گزارش نموده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهد [۳۳]. نمودار

( $48/63$ ) را در دمای  $49/9\text{ }^{\circ}\text{C}$ ،  $0/86\text{ E/S}$  و زمان  $\text{min}$   $173/5$  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 به ترتیب  $50/64\%$  و  $0/65$  (جذب در  $700\text{ nm}$ ) به دست آمد. این نتایج بیانگر توانایی خوب مدل در پیش‌بینی اثر متغیرهای دما، زمان و غلظت آنزیم بر فرایند هیدرولیز می‌باشد.

#### 5-5- درجه هیدرولیز تیمار بهینه

درجه هیدرولیز تیمار بهینه مقدار  $38/63 \pm 1/5$  به دست آمد.

#### 5-6- بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت

#### آنتی‌اکسیدانی تیمارهای بهینه

#### 5-6-1- فعالیت مهار رادیکال DPPH

رادیکال DPPH کاربرد گسترده‌ای به منظور ارزیابی فعالیت مهارکنندگی تعدادی از ترکیبات طبیعی دارد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که بیشترین جذب را در طول موج  $517\text{ nm}$  نشان می‌دهد. زمانی که رادیکال DPPH با یک ترکیب دهنده پروتون، مثلاً ترکیب آنتی‌اکسیدانی، مواجه می‌شود، رادیکال‌ها مهار شده و میزان جذب کاهش می‌یابد. بنابراین کاهش در مقدار جذب، معیاری برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH می‌باشد [38]. برای مقایسه فعالیت مهارکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده، از محلول اسیدآسکوربیک به عنوان یک عامل پروتون‌دهنده استفاده شد. به این صورت که غلظت‌های مختلف  $50\text{ ppm}$ ،  $100\text{ ppm}$ ،  $150\text{ ppm}$  و  $200\text{ ppm}$  از اسیدآسکوربیک، پروتئین هیدرولیز شده و پروتئین هیدرولیز نشده تهیه شد. سپس آزمون سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بر روی غلظت‌های مختلف نمونه و استاندارد انجام شد. قدرت مهار رادیکال DPPH در پروتئین هیدرولیز نشده دانه طالبی به شکل معنی‌داری کمتر از پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آنزیم‌های آلکالاز بود بنابراین آنزیم‌های مورد استفاده در این پژوهش عملکرد مناسبی در ره‌ایش پپتیدهای دهنده پروتون داشته‌اند. در تمامی غلظت‌های تهیه شده قدرت مهار رادیکال DPPH در اسیدآسکوربیک از پروتئین هیدرولیز شده بیشتر بود. در (جدول ۷) اشاره شده است. قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به نوع پروتئین به کار رفته، شرایط هیدرولیز، توالی و ترکیب آمینواسیدی آنها بستگی دارد، به طور مثال

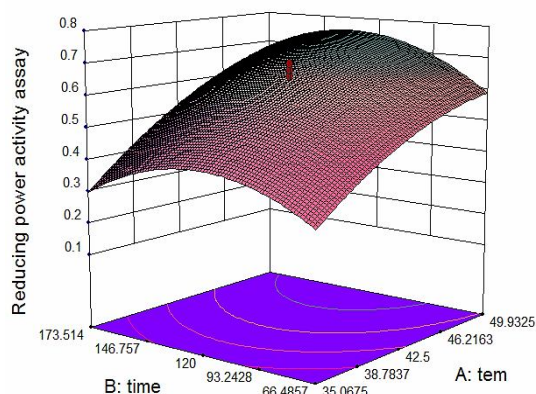


Fig 5 3D graph for the effect of temperature and hydrolysis time on the ferric reducing activity

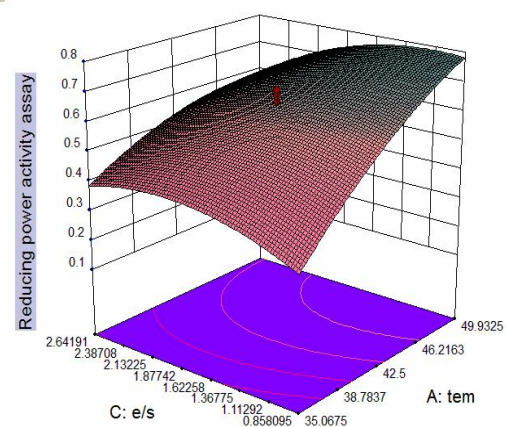


Fig 6 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis temperature on the ferric reducing activity

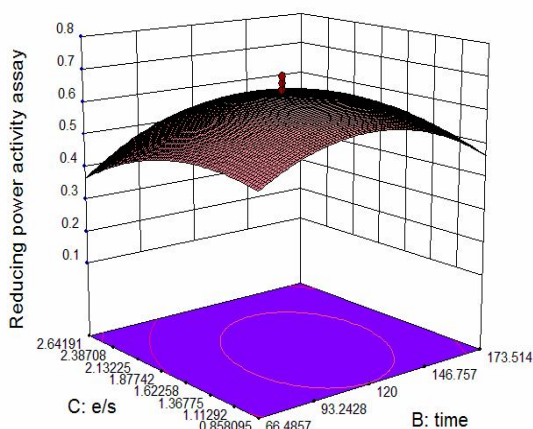


Fig 7 3D graph for the effect of concentration of alkalase enzyme and hydrolysis time on the ferric reducing activity

#### 5-5- انتخاب تیمار بهینه و اعتبارسنجی مدل

پس از آنالیز داده‌ها، نرم‌افزار شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین قدرت احیاکنندگی ( $0/60$ ) و مهار رادیکال DPPH

فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدها را وابسته به غلظت گزارش کردند، آن‌ها بیان کردند که با افزایش غلظت پپتیدها از ۰/۵ به ۱۰ (mg/ml)، قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و از ۱/۴/۳٪ به ۳۲/۱۷٪ رسید [۴۰].

تری‌پپتیدهایی که دارای لیزین یا تریپتوفان در انتهای پایه 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 نوترناز به نسبت ۱/۵٪، به مدت ۶ ساعت،

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

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

STDEV±\*Mean (p<0/05)

می‌توان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پپتیدها مرتبط دانست. افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین که عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردارند، موجب بهبود قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود [۴۲]. Xie و همکاران (۲۰۰۸) نیز با هیدرولیز پروتئین برگ گیاه آلفالفا با آنزیم آلکالاز به مدت ۴ ساعت و نسبت ۰/۵٪، گزارش کردند که با افزایش غلظت تا ۲/۵ mg/ml قدرت احیاکنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل افزایش یافت و به ۰/۶۹ (جذب در ۷۰۰ nm) رسید اما این مقدار از بیشینه قدرت احیاکنندگی گلوکاتایون احیا (۱/۲) در غلظت ۲/۵ mg/ml کمتر بود [۴۳].

### ۵-۶-۲- قدرت احیاکنندگی یون آهن (III)

در ارزیابی قدرت احیاکنندگی، آنتی‌اکسیدان‌های موجود در نمونه‌های مورد بررسی موجب احیا کمپلکس فری‌سیانید  $Fe^{+3}$  به شکل فرس  $Fe^{+2}$  می‌شوند [۴۱]. با توجه به (جدول ۸)، قدرت احیاکنندگی پروتئین دانه طالبی به‌میزان قابل ملاحظه‌ای کمتر از هیدرولیز شده‌ی حاصل از فعالیت آنزیم‌های آلکالاز بود، این امر حاکی از موفقیت‌آمیز بودن فرایند هیدرولیز در جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. با افزایش غلظت از ۲۰۰-۵۰ ppm قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز، به‌صورت معنی‌داری افزایش یافت. به‌طور کلی تفاوت در قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها را

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

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

STDEV±\*Mean (p<0/05)

در (جدول ۹)، با افزایش غلظت از ۲۰۰-۵۰ ppm، فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل افزایش یافت و این قابلیت در پروتئین‌های هیدرولیز شده نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز نشده تفاوت قابل توجهی را نشان داد. از طرفی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نسبت به اسیدآسکوربیک کمتر بود. فعالیت ضدآکسایشی پپتیدها به نوع اسیدآمینو و گروه‌های

### ۵-۶-۳- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

یکی از گونه‌های اکسیژن فعال تولید شده در بدن انسان رادیکال هیدروکسیل می‌باشد که به سهولت می‌تواند با مولکول‌های زیستی مانند آمینواسیدها، پروتئین‌ها و DNA واکنش و موجب اختلالات فیزیولوژیکی شود [۴۴]. از این رو حذف رادیکال هیدروکسیل موجب حفاظت بدن در برابر آن می‌شود.

معناداری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین ماهی تیان شد. آن‌ها توانستند با افزایش درجه هیدرولیز به پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل به میزان ۵۶٪ دست‌یابند [۴۶].

فعالیت بستگی دارد که طی فرایند هیدرولیز آزاد می‌شوند. ثابت شده‌است که آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با قابلیت پروتون‌دهی به رادیکال‌های آزاد، دارای فعالیت ضد اکسایشی در سیستم‌های غذایی هستند [۴۵]. You و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند که فرایند هیدرولیز آنزیمی به شکل

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

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

STDEV±\*Mean (p<0/05)

افزایش یافته است. با افزایش غلظت از ۲۰۰-۵۰ ppm طبق (جدول ۱۰) ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلكالاز به شکل معناداری افزایش یافت اما کمتر از اسید آسکوربیک بود. کاوه (۲۰۱۸) در پژوهش خود بر روی پروتئین هیدرولیز شده دانه شمبله توسط آنزیم آلكالاز و پانکراتین به این نتیجه دست یافت که با افزایش غلظت از (mg/ml) ۱۰-۵۰، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به میزان قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت و از ۰/۴۷ به ۱/۳۲ (جذب در ۶۹۵ nm) رسید اما در نمونه‌های حاصل از آنزیم پانکراتین، با افزایش غلظت از (mg/ml) ۱۰ به ۳۰ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به طور معناداری افزایش یافت و به مقدار بیشینه ۱/۲۱ رسید اما افزایش بیشتر غلظت تاثیری بر افزایش قدرت آنتی‌اکسیدانی نداشت [۴۷].

### ۵-۶-۴- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ارزیابی ظرفیت فسفومولیدن، یک روش کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی‌اکسیدانی کل) است و بر مبنای احیا مولیدن ۶ ظرفیتی به مولیدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیدن در محیط اسیدی همراه است [۴۷]. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز نشده دانه طالبی به میزان قابل توجهی کم‌تر از پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلكالاز در محدوده غلظت ۲۰۰-۵۰ ppm بود. این امر نشان‌دهنده عملکرد مناسب آنزیم آلكالاز می‌باشد که با شکستن زنجیره پروتئین توانسته‌اند پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی تولید کنند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل

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

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

STDEV±Mean (p< 0/05)

تحقیقات زیادی بر روی آن‌ها انجام شده‌است. این پپتیدها نقش‌های بیولوژیکی متنوعی را ایفا می‌کنند، یکی از نقش‌های بسیار مهم آن‌ها فعالیت آنتی-اکسیدانی است. ارتباط معکوس

### ۶- نتیجه‌گیری

امروزه پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان فرآورده‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین در غذاهای گوناگون شناخته شده و

- 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 Bioprocess Technology*. 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
- 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 به شکل 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 پروتئین دانه طالبی با آنزیم آلكالاز، دمای ۴۹/۹ C°، نسبت آنزیم به سویسترا (E/S) ۰/۱۸۶٪، زمان ۱۷۳/۵ min تعیین گردید. مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، اسیدآسکوربیک و پروتئین هیدرولیزشده حاصل از آلكالاز در شرایط تیمار بهینه با محدوده غلظت ۲۰۰-۵۰ ppm 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. از طرفی قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده با آلكالاز در مقایسه با پروتئین هیدرولیزشده به مقدار 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. به‌طور کلی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز به میزان 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

- 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 Research 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. 7<sup>th</sup> 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



- 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. 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.



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

Masoomeh Khosravi Larijany<sup>1\*</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak<sup>2</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>3</sup>, Hoda Shahiry Tabarestaany<sup>4</sup>

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, cantaloupe 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 30°C-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 adjusted-R<sup>2</sup> for DPPH radical scavenging activity were 0.80 and 0.58, respectively, and for Fe<sup>2+</sup> 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:

Cantaloupe 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](mailto:mkhosravilarijany@gmail.com)