



## بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کنجاله بادام شیرین به وسیله پیش تیمار فراصوت و آنزیم آلکالاز

ساناز معیری<sup>۱</sup>، محمد قربانی<sup>۲\*</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۳</sup>، مهدی کاشانی نژاد<sup>۴</sup>، مجتبی رئیس<sup>۵</sup>

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

۲- استاد صنایع غذایی، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استاد صنایع غذایی، گروه شیمی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴- استاد صنایع غذایی، گروه مهندسی مواد غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۵- دانشیار معاونت غذا و دارو، گروه غلات، دانشگاه علوم پزشکی گرگان

### اطلاعات مقاله

### چکیده

#### تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۱۳

#### کلمات کلیدی:

آنتی اکسیدان،

امواج فراصوت،

بادام شیرین،

پروتئین هیدرولیز شده،

هیدرولیز آنزیمی،

آلکالاز

بادام شیرین یک منبع خوبی از پروتئین های با کیفیت بالا می باشد و مقدار پروتئین در بادام بر اساس وزن خشک ۲۲-۱۶٪ گزارش شده است (سات، ۱۹۹۳). پروتئین های بادام قابلیت هضم بالایی دارند و آلبومین و گلوبولین ۹۹-۸۸٪ از پروتئین های اصلی آن را تشکیل می دهند (سانگ و همکاران، ۲۰۰۲). در این پژوهش بهینه سازی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین بادام شیرین با استفاده از آنزیم آلکالاز و پیش تیمار فراصوت انجام گرفت. متغیرهای مورد بررسی زمان هیدرولیز، غلظت آنزیم و زمان اعمال امواج فراصوت و پاسخ های مورد بررسی درجه هیدرولیز، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن بود. سپس تاثیر غلظت آنزیم بر فعالیت احیاء کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تیمار بهینه ارزیابی شد. در ادامه، مقایسه خصوصیات عملکردی (حلالیت، خاصیت کف کنندگی و خاصیت امولسیون کنندگی) تیمار بهینه هیدرولیز شده با پروتئین هیدرولیز نشده در pH های مختلف انجام گرفت. نتایج نشان داد بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال DPPH (۶۲/۹۷ درصد)، شلاته کنندگی یون آهن (۷۲/۸۵ درصد) و درجه هیدرولیز مناسب (۳۱/۳۸ درصد) با کاربرد آنزیم آلکالاز در شرایط زمان اعمال امواج فراصوت (۴۰۰ وات) ۳/۵۹ دقیقه، زمان هیدرولیز ۱۷۱/۵۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۵ درصد حاصل شد. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به غلظت وابسته بود و هیدرولیز به میزان قابل توجهی سبب افزایش خصوصیات عملکردی پروتئین بادام شیرین شد. با توجه به نتایج به دست آمده در این پژوهش، محصول پروتئین هیدرولیز شده قابلیت استفاده در صنایع غذایی به عنوان یک نگهدارنده طبیعی و ترکیب مغذی و در فرآورده های دارویی جهت افزایش خواص عملکردی و بهبود خصوصیات تغذیه ای را دارد.

DOI: 10.22034/FSCT.22.165.135.

\* مسئول مکاتبات:

moghorbani@yahoo.com

## ۱-مقدمه

اکسیداسیون لیپیدها به عنوان واکنش تخریبی در طول فرآوری و عامل کاهش عمر نگهداری در مواد غذایی به شمار می رود. آنتی اکسیدان ها ترکیباتی هستند که قادر به کاهش سرعت اکسیداسیون و تشکیل رادیکال های آزاد هستند و در نتیجه باعث محافظت سلول ها در برابر آسیب اکسیداتیو می شوند. به طور کلی ترکیبات آنتی اکسیدانی را یا می توان به صورت سنتزی تولید کرد و به ماده غذایی اضافه نمود. در عین حال برخی از این ترکیبات به صورت طبیعی در ماده غذایی وجود دارند (۲). در میان آنتی اکسیدان های ، پتیدهای زیست فعال توجه بسیاری از محققان را به خود جلب نموده است. گزارش شده این ترکیبات توانایی رقابت با آنتی اکسیدانی های سنتزی را نیز دارند. مشخص شده است که این ترکیبات با جلوگیری از اکسیداسیون و فساد میکروبی قادر به حفظ کیفیت مواد غذایی هستند (۳). ویژگی های پتیدهای زیست فعال به ترکیب و توالی آمینواسیدی آنها وابسته است (۴). از جمله این ویژگی ها می توان به اثرات ایمنی بخشی (۵)، آنتی اکسیدانی (۶)، ضد سرطانی (۷)، ضد فشار خون (۸) اشاره نمود. تحقیقات زیادی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده را به اثبات رسانده است. لانگیان و همکاران (۲۰۲۱) با هیدرولیز پروتئین بذر کتان جهت آزادسازی پتیدهای زیست فعال مختلف با استفاده از سه پروتئاز گیاهی فیسین، پاپائین و بروملین گزارش کردند که از بین پتیدهای تولیدی، ۲۰ پتید با فعالیت بیولوژیکی قابل توجه شناسایی شد. در نهایت آنها بیان کردند که این پروتئین منبع بالقوه پتیدهایی با فعالیت مهارکننده آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE) و دی پتیدیل پپتیداز-IV (DPP-IV) است (۹). آیدو و همکاران (۲۰۱۹) با تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی سالمون با آنزیم های آلکالاز و پاپائین بیان کردند که نوع آنزیم پروتئاز تاثیر معنی داری بر ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده داشت (۱۰). اخیراً، در تولید پتیدهای زیست فعال، از

پیش تیمارهای مختلفی استفاده می شود که در این میان به کاربرد امواج امواج فراصوت در بهبود خواص پروتئین ها بسیار مورد توجه قرار گرفته است. امواج فراصوت به عنوان امواج صوتی با فرکانسهای بالاتر از آستانه شنوایی انسان در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز تعریف می شوند. مطالعات نشان داده اند که امواج فراصوت سبب تغییراتی در ساختار ثانویه و سوم پروتئین ها می شود که در نتیجه با باز شدن جزئی ساختار آنها و باعث قرار گرفتن بهتر پروتئین ها در برابر آنزیم ها می شود (۱۱). در این راستا لی و همکاران (۲۰۱۸) تاثیر شدت های مختلف پیش تیمار فراصوت را بر ویژگی های آنتی اکسیدانی ایزوله پروتئین کینوا هیدرولیز شده با آلکالاز بررسی کردند. شدت های مختلف فراصوت ۲۰۰، ۴۰۰ و ۶۰۰ وات بود. ساختمان دوم پروتئین ها و آبگریزی سطحی ایزوله پروتئین تیمار شده با فراصوت بررسی شد. نتایج نشان داد تیمار فراصوت با شدت ۴۰۰ وات بصورت مشخصی درجه هیدرولیز و ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده را بهبود داد و همچنین تغییرات ساختمان دوم پروتئین ها و هیدروفوبیسیته سطحی در اثر باز شدن ساختمان پروتئین ها ایجاد شد و SEM هم نشان دهنده تغییر شکل در پروتئین ها بود (۱۲). در سال های اخیر، پروتئین های هیدرولیز شده و پتیدهای زیست فعال با خواص سلامتی بخش از منابع حیوانی و گیاهی متنوعی استخراج شده اند. در بین منابع گیاهی و حیوانی مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده، منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب تر و آلرژی زایی کمتر بیشتر مورد توجه قرار گرفته اند (۱۳). در این بین بادام شیرین با نام علمی *Prunus dulcis* یک ماده غذایی سرشار از مواد مغذی بوده و منبع غنی از ویتامین E، فیبر رژیمی، ویتامین های گروه B و مواد معدنی ضروری مانند منیزیم، مس، منگنز، کلسیم و پتاسیم است. مقدار پروتئین در ارقام تجاری بادام ۲۳-۱۶ درصد گزارش شده است که این پروتئین ها درصد قابلیت هضم بالایی داشته و آلبومین و گلوبولین بخش مهمی از پروتئین های اصلی آن (۹۱-۸۸

سانتریفوژ گردید. در مرحله بعد pH سوپرناتانت روی  $pH=4$  (pH ایزوالکتریک بادام شیرین) تنظیم شد و برای رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در  $10000 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در  $5000 \times g$  به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس کنسانتره پروتئینی حاصل با خشک کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای  $-20^\circ C$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۴).

### ۲-۳- پیش تیمار فراصوت

۵ گرم از کنسانتره پروتئینی بادام شیرین به ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ( $0.05 M$ ،  $pH=7$ ) افزوده و بمدت ۲ ساعت همزده شد. به‌منظور اعمال پیش تیمار فراصوت، نمونه‌ها تحت تاثیر پروب فراصوت با فرکانس ثابت  $20 KHz$  و توان ثابت ( $200$ ) در زمان‌های ذکر شده در جدول ۱ قرار گرفتند (۱۱). ۲-۳- هیدرولیز آنزیمی

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، کنسانتره پروتئین بادام شیرین در غلظت  $(w/v)$  ۵ درصد در بافر فسفات  $0.2 M$  مولار و  $pH=8$  به‌منظور فعالیت آنزیم آلکالاز حل شد و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم شد. پس از رسیدن دمای انکوباتور به دمای  $50^\circ C$  درجه سانتی‌گراد برای آلکالاز نمونه‌ها درون انکوباتور قرار داده شده و پس از ثابت شدن دمای انکوباتور، آنزیم به نسبت‌های ذکر شده در جدول ۱ به محلول اضافه شد. واکنش در زمان‌های ذکر شده در جدول ۱ انجام شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب  $90^\circ C$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شده و سپس با استفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. سپس نمونه‌ها با دور  $10000 \times g$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند و سوپرناتانت آن‌ها جدا شد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای  $-20^\circ C$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۶).

درصد از کل پروتئین) را تشکیل می‌دهند (۱۴). بنابراین با توجه به محتوای مناسب پروتئینی کنجاله بادام و خواص سلامتی بخش آن، کنجاله بادام منبعی مناسب جهت تولید پپتید زیست فعال می‌باشد. (۱۵). در این پژوهش جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص عملکردی و تغذیه‌ای بهتر از پروتئین اولیه از آنزیم آلکالاز مورد استفاده قرار گرفت. هدف از این پژوهش بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کنجاله بادام شیرین با خاصیت آنتی اکسیدانی به وسیله آنزیم آلکالاز و بررسی تاثیر درجه ی هیدرولیز بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، شلاته کنندگی یون آهن، احیا کنندگی یون آهن، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل پپتیدهای حاصل در مقایسه با پروتئین اولیه بود.

### ۲- مواد و روش‌ها

#### ۲-۱- مواد

آنزیم آلکالاز، کوماسی بریلیانت بلو (G250)، DPPH، پتاسیم فری سیانید و فریک کلراید از شرکت سیگما و سود، اسیدکلریدریک از شرکت مرک تهیه شدند. کنجاله بادام شیرین از فروشگاه محلی تهیه شد. سایر مواد مورد استفاده از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

#### ۲-۲- تهیه کنسانتره پروتئین بادام شیرین

ابتدا کنجاله بادام شیرین با آسیاب پودر شد؛ سپس جهت چربی گیری، پودر حاصل به نسبت  $1:10$  (وزنی/حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۷ ساعت با استفاده از شیکر با دور  $200 rpm$  در دمای اطاق همزده شد. پس از ته نشین شدن پودر بادام شیرین هگزان جدا و برای حذف حداکثری هگزان پودر چربی‌گیری شده به مدت ۱ ساعت در آون با دمای  $30^\circ C$  درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و برای همگن سازی و از الک با مش  $40$  عبور داده شد. به منظور استخراج پروتئین بادام شیرین، پودر چربی‌گیری شده به نسبت  $1:10$  با آب مقطر مخلوط و  $pH$  آن با افزودن سود  $1$  نرمال روی  $pH=11$  تنظیم و به مدت ۱ ساعت همزده شد، سپس محلول حاصل در  $7000 \times g$  به مدت ۳۰ دقیقه در دمای  $4^\circ C$  درجه سانتی‌گراد

Table 1. Enzymatic hydrolysis treatments of sweet almond protein from Design Expert software

| زمان امواج فراصوت (دقیقه) | زمان هیدرولیز (دقیقه) | غلظت آنزیم (درصد) |    |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|----|
| 5                         | 120                   | 2                 | 1  |
| 0                         | 120                   | 2                 | 2  |
| 10                        | 120                   | 2                 | 3  |
| 10                        | 210                   | 1                 | 4  |
| 0                         | 30                    | 3                 | 5  |
| 5                         | 120                   | 1                 | 6  |
| 10                        | 30                    | 3                 | 7  |
| 5                         | 120                   | 3                 | 8  |
| 5                         | 30                    | 2                 | 9  |
| 10                        | 30                    | 1                 | 10 |
| 10                        | 210                   | 3                 | 11 |
| 5                         | 120                   | 2                 | 12 |
| 0                         | 210                   | 1                 | 13 |
| 5                         | 210                   | 2                 | 14 |
| 0                         | 210                   | 3                 | 15 |
| 0                         | 30                    | 1                 | 16 |
| 5                         | 120                   | 2                 | 17 |

$$DH (\%) = \frac{\text{Protein (TCA+Supernatant)}}{\text{Protein (almond hydrolysate suspension)}} \times 100$$

#### ۴-۲- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴M) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰۰×g و به مدت ۱۰min سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش برادفورد (۱۷) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از معادله ۱ تعیین شد:

معادله ۱

## ۲-۵-۵- بررسی ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین

هیدرولیز شده

## ۲-۵-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تعیین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ابتدا پروتئین هیدرولیز شده 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 ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله ۲ محاسبه گردید (۱۸).

۲

معادله

$$I (\%) = \left[ \frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100$$

$A_{\text{control}}$  جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط شد) و  $A_{\text{sample}}$  جذب نمونه می‌باشد.

## ۲-۵-۲- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

جهت ارزیابی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۰۵ میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (۲ mM) و ۱/۸۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵ mM) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ nm خوانده شد (۱۹). از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید:

معادله ۳

Chelating

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

$A_{\text{control}}$  جذب شاهد و  $A_{\text{sample}}$  جذب نمونه می‌باشد.

## ۲-۵-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت (mg/ml) ۱۰-۱۰۰ با ۱ میلی لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ M، فسفات سدیم ۲۸ Mm و آمونیوم مولیبدات ۴ mM) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ nm خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت ضد اکسایشی کل بیشتر است (۲۰).

## ۲-۵-۴- فعالیت احیاء کنندگی یون آهن

جهت ارزیابی قدرت احیاء کنندگی یون آهن نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت (mg/ml) ۲۰-۱۰۰ با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ M (pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید ۱٪ (W/V) مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر فریک کلراید (W/V) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ nm پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاء کنندگی است. در انتها قدرت احیاء کنندگی پروتئین با منبع ویتامین ث مقایسه می‌شود (۲۱).

۲-۶- بررسی ویژگی‌های عملکردی پروتئین هیدرولیز شده

## ۲-۶-۱- حلالیت

برای تعیین حلالیت کنسانتره پروتئینی و پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین از روش Jamdar و همکاران (۲۰۱۰) استفاده شد. ۲۰۰ میلی گرم پروتئین هیدرولیز شده در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل و pH مخلوط با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال روی ۱ تا ۱۲ تنظیم شد. محلول در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد، سپس میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت با استفاده از روش بردفورد تعیین و درصد حلالیت بر اساس مقدار پروتئین محلول بر پروتئین کل نمونه تعیین شد (۲۲).

## ۲-۶-۲- امولسیون کنندگی

ابتدا ۵ میلی لیتر روغن هسته انگور و ۱۵ میلی لیتر محلول ۱٪ کنسانتره پروتئین و یا پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین با هم مخلوط و pH با استفاده از سود یا اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۳، ۵، ۷ و ۹ تنظیم شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر در سرعت ۲۰۰۰ rpm برای ۱ دقیقه هموژن گردید، سپس، ۵۰ میکرو لیتر نمونه امولسیون در زمان ۰ و ۱۰ دقیقه پس از هموژنیزاسیون از ظرف برداشته و با ۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده با استفاده از اسپکتروفتومتر در ۵۰۰ نانومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه ( $A_0$ ) و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون ( $A_{10}$ ) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) با استفاده از معادله ۴ استفاده شد (۲۳).

معادله ۴

$$EAI (m^2/g) = (2 \times 2.303 \times A_0) / 0.25 \times \text{protein weight (g)}$$

## ۲-۶-۳- کف کنندگی

۱۵ میلی لیتر محلول ۰/۵ درصد از نمونه با استفاده از سود یا اسیدکلریدریک ۱ نرمال، در ۳، ۵، ۷ و ۹ تنظیم و هموژنیزاسیون با سرعت ۱۶۰۰ rpm برای ۲ دقیقه با هدف ورود هوا به درون محلول در دمای محیط انجام گرفت،

سپس نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج ۲۵ میلی لیتر منتقل و حجم کل پس از ۱ دقیقه یادداشت شد. ظرفیت کف کنندگی (FC) با استفاده از معادله ۵ محاسبه شد (۲۳).

$$FC (\%) = (A/B) \times 100$$

معادله ۵

A حجم کف پس از زدن (میلی لیتر) و B حجم اولیه قبل از زدن (میلی لیتر) می باشد.

## ۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها در قالب طرح فاکتوریل و با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. کلیه آزمون ها در ۳ تکرار انجام و جهت بررسی معنی دار بودن متغیر در سطح  $P < 0.05$ ، مقایسه میانگین ها با استفاده از آزمون چنددامنه ای دانکن و رسم نمودارها با نرم افزار Excel انجام گرفت.

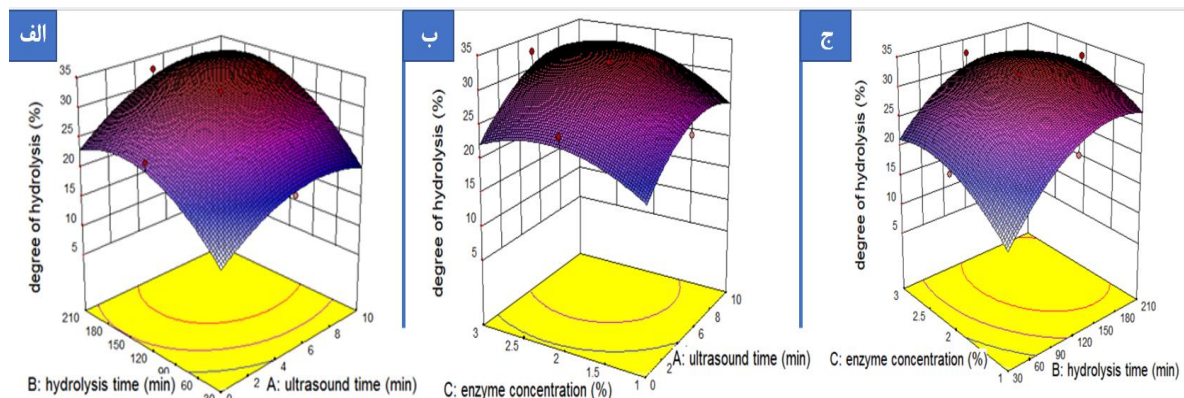
## ۳- نتایج و بحث

### ۳-۱- تاثیر زمان هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا، نوع پروتئاز و زمان اعمال پیش تیمار امواج فراصوت بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین

با توجه به شکل ۱ قسمت الف، در زمان های ثابت اعمال امواج فراصوت، افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم آلکالاز تا ۱۲۰ دقیقه به طور معنی داری باعث افزایش میزان درجه هیدرولیز تا ۳۲/۸۲ درصد شد و افزایش بیشتر زمان تا ۲۱۰ دقیقه باعث کاهش درجه هیدرولیز پروتئین های هیدرولیز شده تولیدی شد و در زمان های ثابت هیدرولیز، افزایش زمان اعمال امواج فراصوت تا ۷ دقیقه باعث افزایش درجه هیدرولیز شد اما پس از این زمان از شیب افزایشی درجه هیدرولیز کاسته شد. بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۳۴/۰۶۲ درصد) در هیدرولیز با آنزیم آلکالاز در زمان ۱۷۷/۲۵ دقیقه و زمان اعمال امواج فراصوت ۸/۴۲ دقیقه به دست آمد. در شکل ۱ قسمت ب، تاثیر غلظت آنزیم و زمان اعمال امواج فراصوت بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین نشان داده شده است. با توجه به شکل در غلظت های

می‌تواند به دلیل هیدرولیز بیش از حد پروتئین و اثر بازدارندگی پپتیدهای تولید شده باشد (۲۴). در مورد تاثیر امواج فراصوت بر میزان درجه هیدرولیز گزارش شده است که امواج فراصوت با تغییر در ساختار ثانویه و سوم پروتئین‌ها، منجر به بازشدن ساختار پروتئین‌ها شده که این باعث عملکرد بهتر آنزیم‌های پروتئازی می‌شود (۲۵). نتایج مشابهی توسط Kaveh و همکاران (۲۰۲۲) و Farzanfar و همکاران (۲۰۲۴) به ترتیب در هیدرولیز پروتئین شنبلیله و بذر کتان گزارش شده است (۱۱ و ۱۵).

نتایج نشان داد که تاثیر تمام متغیرهای مورد بررسی بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز تاثیر معنی دار داشتند و در این میان تاثیر زمان هیدرولیز معنی دارتر بود ( $p < 0.05$ )



**Figure 1- The effect of hydrolysis time, enzyme concentration and ultrasound application time on the degree of hydrolysis of sweet almond hydrolyzed protein with alcalase enzyme**

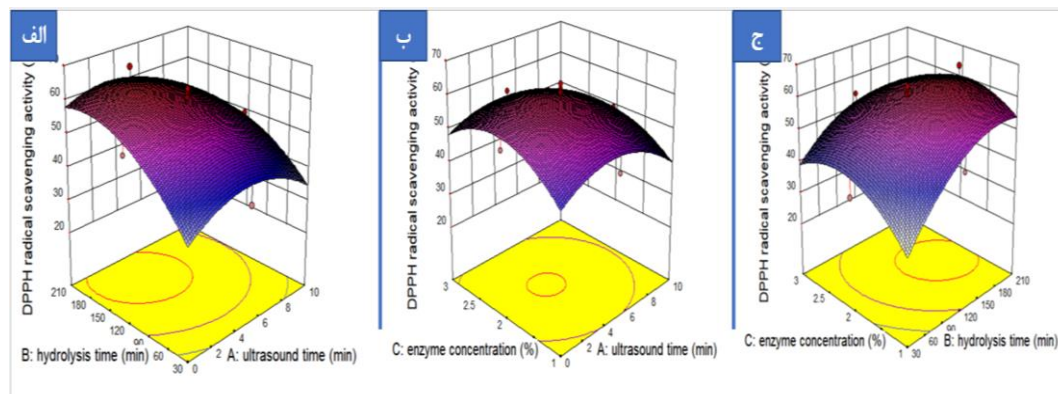
در غلظت‌های ثابت آنزیم نیز با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه فعالیت مهار رادیکال DPPH افزایش یافت و افزایش بیشتر تاثیر معنی داری نداشت. به طور کلی بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH (۶۲/۲۹ درصد) در زمان هیدرولیز ۱۶۳/۲۳ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۴ درصد حاصل شد. در این راستا گزارش شده است که هیدرولیز با افزایش زمان باعث تولید پپتیدهای دهنده پروتون که می‌توانند با رادیکال ازاد DPPH، واکنش دهند اما هیدرولیز بیشتر سبب تجزیه این پپتیدها شده در نتیجه از قدرت آنتی اکسیدانی کاسته می‌شود (۲۶). در تطابق با این یافته‌ها Wen و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که اعمال امواج فراصوت با فرکانس ۲۰

ثابت آنزیم افزایش زمان امواج فراصوت تا ۸ دقیقه باعث افزایش معنی دار درجه هیدرولیز شد اما پس از آن با افزایش بیشتر زمان شیب افزایشی درجه هیدرولیز کم شد. در زمان‌های ثابت امواج فراصوت نیز افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۸ درصد به طور معنی‌داری باعث افزایش درجه هیدرولیز شد و با افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر معنی داری مشاهده نشد. با توجه به شکل ۱ قسمت ج، در زمان‌های ثابت هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۵ درصد باعث افزایش درجه هیدرولیز شد اما افزایش بیشتر تاثیر قابل توجهی نداشت. عدم افزایش بیشتر میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیشتر زمان هیدرولیز

۲-۳- تاثیر زمان هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوپسترا، نوع پروتئاز و زمان اعمال پیش تیمار امواج فراصوت بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین

در شکل ۲ اثر زمان هیدرولیز، غلظت آنزیم و زمان اعمال فراصوت بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین با آنزیم آلکالاز نشان داده شده است. در زمان‌های ثابت هیدرولیز افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۵ درصد به طور معنی داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH شد و با افزایش بیشتر کاهش یافت. از سوی دیگر

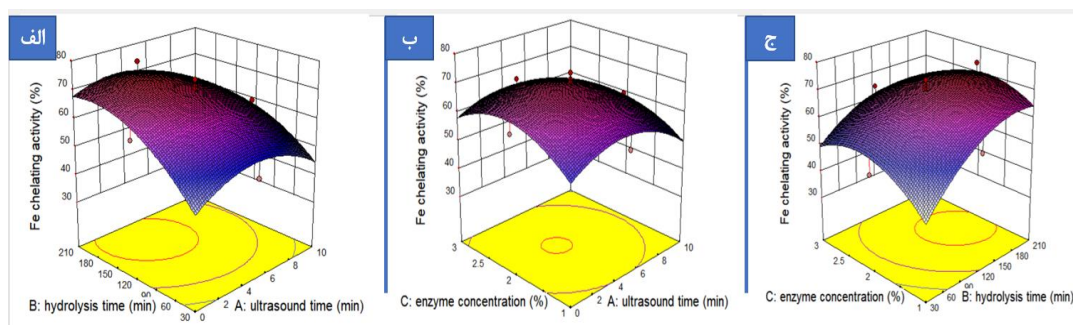
کیلوهرتز و توان ۲۰۰ وات تاثیر مثبتی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه داشت (۲۷).



**Figure 2- Effect of hydrolysis time, enzyme concentration and ultrasound application time on DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed sweet almond protein with alcalase enzyme**

شلاته کنندگی یون آهن شد و افزایش بیشتر تاثیر منفی داشت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۷۵ دقیقه به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت شلاته کنندگی یون آهن و با افزایش بیشتر زمان از این قابلیت کاسته شد. بیشترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (۶۸/۱۴ درصد) در زمان هیدرولیز ۱۸۴/۲۵ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۵۷ درصد حاصل شد. به‌طور کلی گزارش شده است که عوامل زیادی بر قابلیت شلاته کنندگی پروتئین هیدرولیز شده تاثیر می‌گذارند از جمله: ترکیب آمینواسیدی پروتئین اولیه، نوع آنزیم مورد استفاده، توالی آمینواسیدی و درجه هیدرولیز (۲۸). این نتایج در تطابق با یافته‌های Jamdar و همکاران (۲۰۱۰) در هیدرولیز پروتئین بادام زمینی می‌باشد (۲۲).

۳-۳- تاثیر زمان هیدرولیز، نسبت آنزیم به سوبسترا، نوع پروتئاز و زمان اعمال پیش تیمار فراصوت بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین نتایج تجزیه واریانس نشان داد که تاثیر تمام متغیرهای مورد بررسی به جز غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز تاثیر معنی‌دار داشتند. در این میان تاثیر زمان هیدرولیز به‌طور معنی‌داری بیشتر از سایر متغیرها بود. در شکل ۳ تاثیر زمان هیدرولیز، غلظت آنزیم و زمان اعمال فراصوت بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین با آنزیم آلکالاز نشان داده شده است. با توجه به نتایج به دست آمده مشخص شد در زمان‌های ثابت هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۷ درصد به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت



**Figure 3- The effect of hydrolysis time, enzyme concentration and ultrasound application time on iron ion chelating activity of hydrolyzed sweet almond protein with alcalase enzyme**

بادام شیرین به طور معنی داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز نشده و کمتر از ویتامین ث در غلظت (mg/ml) ۱۰۰ بود ( $p < 0.05$ ). ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بالای هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین نشان می دهد که آنزیم آلکالاز قادر به تولید هیدرولیز شده های با توانایی الکترون دهنده گی بوده که می توانند به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان باعث مهار رادیکال های آزاد شوند (۲۹). مشابه با این نتایج کاوه و همکاران (۱۳۹۸) در هیدرولیز پروتئین دانه شبلیله بود، آنها گزارش کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شبلیله وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت هیدرولیز شده از (mg/ml) ۱۰ به (mg/ml) ۴۰ به طور معنی داری باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد و افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی داری نداشت؛ همچنین گزارش کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده تولیدی در تمامی غلظت ها کمتر از قدرت آنتی اکسیدانی کل ویتامین ث در غلظت (mg/ml) ۵۰ بود (۳۰). همچنین بوگنائف و همکاران (۲۰۰۹) ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده نوعی کوسه (کوسه صیقلی) را وابسته به غلظت گزارش کردند و بیان کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی کل کمتر از آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود (۳۱).

### ۳-۴- بهینه سازی و ارزیابی اعتبار مدل

پس از آنالیز داده ها، نرم افزار شرایط بهینه جهت حصول بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH (۶۲/۹۷ درصد)، شلاته کنندگی یون آهن (۷۲/۸۵ درصد) و درجه هیدرولیز مناسب (۳۱/۳۸ درصد) را با آنزیم آلکالاز زمان اعمال فراصوت ۳/۵۹ دقیقه، زمان هیدرولیز ۱۷۱/۵۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۵ درصد گزارش کرد. هیدرولیز در شرایط ذکر شده انجام و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن ۷۵/۲۴ درصد و فعالیت مهار رادیکال DPPH ۵۷/۳۴ درصد و درجه هیدرولیز ۲۸/۵۶ درصد محاسبه شد.

### ۳-۵- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

با توجه به شکل ۴ افزایش غلظت هیدرولیز شده بادام تا (mg/ml) ۸۰ به طور معنی داری باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی شد ( $p < 0.05$ ) اما افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی داری نداشت ( $p > 0.05$ ). بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مربوط به هیدرولیز شده با غلظت (mg/ml) ۸۰ و (mg/ml) ۲۰ به میزان ۰/۹۲۴ و ۰/۴۱۰ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. از ظرف دیگر در تمامی غلظت ها ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده

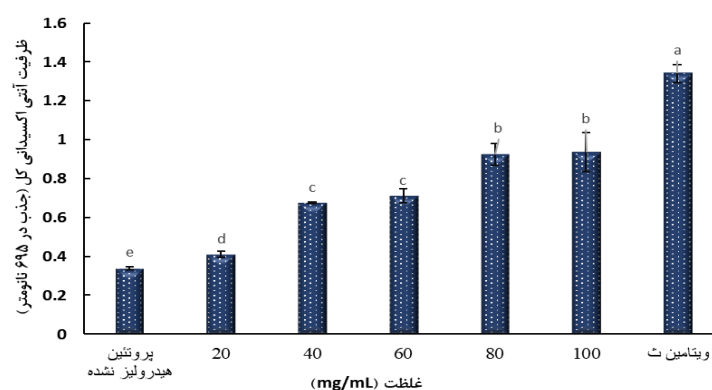


Figure 4- The effect of concentration on the total antioxidant capacity of sweet almond hydrolyzed protein compared to non-hydrolyzed protein and vitamin C at a concentration 100 (mg/ml)

## ۳-۶- فعالیت احیاء کنندگی یون آهن

با توجه به شکل ۵ قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام شیرین به‌طور معنی‌داری بیشتر از قدرت پروتئین هیدرولیز نشده بود. از سوی دیگر افزایش غلظت از  $(\text{mg/ml})$  ۲۰ تا  $(\text{mg/ml})$  ۸۰، باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های تولیدی از ۰/۴۵۲ به ۰/۹۶۸ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) شد؛ افزایش بیشتر غلظت تا  $(\text{mg/ml})$  ۱۰۰، باعث کاهش معنی‌دار قدرت احیاء کنندگی شد ( $p < 0.05$ ). مقایسه قدرت احیاء کنندگی نمونه‌ها با قدرت

آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث نشان داد که در تمامی غلظت‌ها پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین قدرت احیاء کنندگی کمتری داشت. به‌طور کلی علت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بادام شیرین را می‌توان به رهائش آمینواسید-هایی با قابلیت احیاء کنندگی مانند تریپتوفان، لیزین و متیونین دانست (۲۲). این نتایج در تطابق با یافته‌های Xie و همکاران (۳۲) و Zhao و همکاران (۳۳)، بود که به ترتیب تاثیر غلظت را بر قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده یونجه و کانولا بررسی کردند.

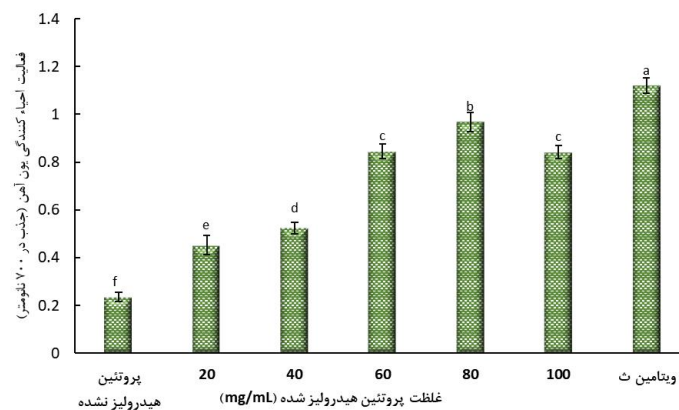


Figure 5- The effect of concentration on iron ion reduction activity of sweet almond hydrolyzed protein compared to non-hydrolyzed protein and vitamin C at a concentration 100 (mg/ml)

pH به‌طور معنی‌داری افزایش یافت به‌طوری‌که بیشترین میزان حلالیت (۹۸/۶۸ درصد) در pH ۱۰ حاصل شد. در این راستا گزارش شده است که با هیدرولیز و کاهش وزن مولکولی پپتیدها و تولید آمینواسیدها، حساسیت به pH کم و حلالیت در محدوده وسیعی از pH حفظ می‌شود. افزایش حلالیت پروتئین‌ها در pHهای مختلف را می‌توان به تأثیر مثبت هیدرولیز آنزیمی کنترل شده بر کاهش وزن مولکولی و افزایش گروه‌های باردار نسبت داد. همچنین، هیدرولیز آنزیمی با شکست توده‌های پروتئینی نامحلول، تولید پپتیدهای کوچکتر، افزایش دسترسی گروه‌های هیدروفیل و تسهیل واکنش آمینواسیدهای هیدروفیل با محیط آبی موجب افزایش حلالیت پروتئین‌ها می‌شود (۳۴). مشابه با این یافته‌ها مطالعات نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کدو توسط آنزیم آلکالاز دارای حلالیت زیادی در pH قلیایی

## ۳-۷- ویژگی‌های عملکردی

## ۳-۷-۱- حلالیت

در شکل ۶ پروفیل حلالیت کنسانتره پروتئینی بادام و پروتئینی هیدرولیز شده‌ی آن در pH های ۱-۱۲ نشان داده شده است. به‌طور کلی کمترین میزان حلالیت کنسانتره پروتئینی (۲۶/۵ درصد) در pH های اسیدی به‌ویژه pH ۴ (نقطه ایزوالکتریک آن) رخ داد. مطالعات نشان داده است که افت حلالیت در pH های اسیدی و ایزوالکتریک یک پروتئین به‌دلیل رسوب پروتئین‌ها و پپتیدهای اولیه با وزن مولکولی بالا می‌باشد. در نقطه ایزوالکتریک قابلیت انحلال پروتئین بسیار کم و نیروی دافعه بین ملکول‌های پروتئین مجاور به حداقل رسیده، ملکول‌ها یکدیگر را جذب کرده و پروتئین رسوب می‌نماید (۲۳). حلالیت کنسانتره پروتئینی با افزایش

باقلا افزایش میزان حلالیت هیدرولیز شده‌های تولیدی را نسبت به روتین اولیه گزارش دادند.

به ویژه pH ۱۱ در مقایسه با pH های اسیدی به میزان ۹۳/۴۰ درصد بود (۳۵). تاثیر مثبت فرآیند هیدرولیز در افزایش حلالیت پروتئین‌ها در پژوهش‌های مختلفی گزارش شده است از جمله لی و همکاران (۲۲) و سمائی و همکاران (۳۶) به ترتیب با تولید پروتئین هیدرولیز شده بذر چای و

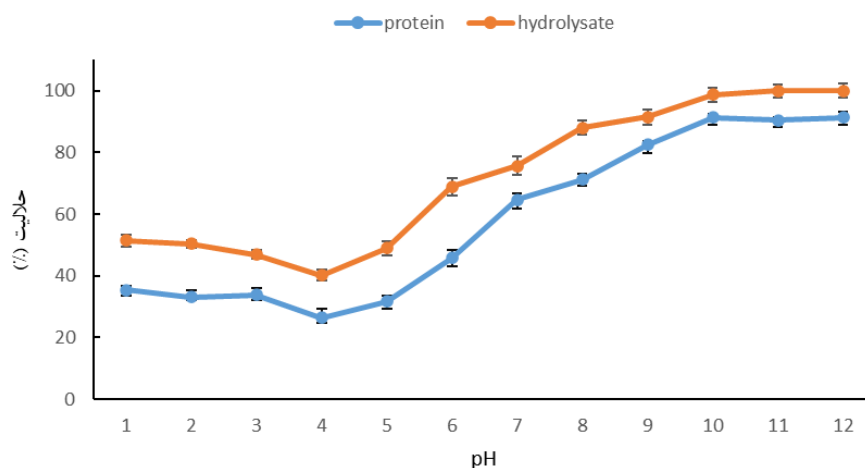


Figure 6- Solubility of hydrolyzed protein and sweet almond protein concentrate at pH 1-12

این نتایج نشان می دهد که پروتئین بادام شیرین قابلیت استفاده به عنوان یک امولسیفایر را در محصولات غذایی اسیدی ندارد. افزایش قدرت امولسیون کنندگی با هیدرولیز آنزیمی را می توان به حفظ حلالیت، بهبود فعالیت امولسیون کنندگی در نتیجه تغییر در ترکیب پپتیدها و قابلیت تشکیل فیلم در اطراف قطرات روغن در pH اسیدی نسبت داد (۳۷). مشابه با این نتایج سرابندی و همکاران (۲۳) و شریعت علوی و همکاران (۳۸) به ترتیب افزایش قابیت امولسیون کنندگی پروتئین کازئین و دانه گوجه فرنگی را با هیدرولیز آنزیمی گزارش کردند. همچنین آنها بیان کردند که تمامی هیدرولیز شده‌ها از قابلیت امولسیون کنندگی بیشتری در pH قلیایی نسبت به pH اسیدی برخوردار بودند.

### ۳-۴-۴- کف کنندگی

ظرفیت کف کنندگی یکی دیگر از ویژگی‌های مهم عملکردی پروتئین‌ها و هیدرولیز شده‌های آنها است. مطالعات نشان داده است که ظرفیت کف کنندگی پروتئین به میزان زیادی تحت تأثیر نوع پروتئین اولیه، pH و شرایط هیدرولیز،

### ۲-۷-۳- امولسیون کنندگی

ظرفیت امولسیون کنندگی به توانایی یک امولسیفایر در تشکیل و پایداری قطرات کوچک فاز پراکنده در طول هموژنیزاسیون و در زمان نگهداری امولسیون تازه تهیه شده است (۲۳). قابلیت امولسیون کنندگی پروتئین هیدرولیز شده و کنسانتره پروتئینی بادام شیرین در شکل ۷ نشان داده شده است. به طور کلی هیدرولیز به طور معنی داری باعث افزایش قابلیت امولسیون کنندگی پروتئین بادام شیرین شد و هر دو پروتئین هیدرولیز شده و کنسانتره پروتئینی بادام شیرین در pH های قلیایی از قابلیت امولسیون کنندگی بیشتری برخوردار بودند. کمترین (۵۰/۲) و بیشترین میزان امولسیون کنندگی (۱۶۰/۷۸) به ترتیب مربوط به پروتئین هیدرولیز شده در pH=9 و کنسانتره پروتئینی در pH=3 بود. کمتر بودن قابلیت امولسیون کنندگی نمونه‌ها در pH اسیدی (نزدیک به نقطه ایزوالکتریک) به دلیل کم بودن میزان حلالیت آنهاست که باعث رسوب پروتئین‌ها و ازدست رفتن ویژگی‌های امولسیون کنندگی آنها می شود (۷).

های اسیدی بود ( $p < 0.05$ ). ظرفیت کف کنندگی پایین نمونه‌ها در pH های اسیدی می‌تواند به دلیل حلالیت پائین آنها باشد. از سوی دیگر بهبود قابلیت کف کنندگی با هیدرولیز آنزیمی می‌تواند به دلیل افزایش انعطاف پذیری پپتیدها، تسهیل تشکیل غشای بین سطحی و فیلم در اطراف حبابهای هوا و در نتیجه تولید کف باشد (۳۹). در این راستا Popović و همکاران (۴۰) افزایش قابلیت کف کنندگی پروتئین کدو را پس از هیدرولیز آنزیمی گزارش دادند.

درجه هیدرولیز و غلظت و نوع آنزیم مورد استفاده است. از سوی دیگر حلالیت، بار سطحی، قابلیت واکنش زنجیره‌های پپتیدی و تشکیل فیلم در سطح مشترک حباب‌ها از سایر عوامل موثر بر کارایی کف کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده به حساب می‌آیند (۲۳). ظرفیت کف کنندگی پروتئین بادام شیرین و هیدرولیز شده‌ی آن در شکل ۸ نشان داده شده است. به‌طور کلی هیدرولیز شده‌ی بادام در تمامی pH ها از ظرفیت کف کنندگی بیشتری در مقایسه با کنسانتره پروتئینی آن برخوردار بود. همچنین ظرفیت کف کنندگی هر دو نمونه در pH های قلیایی به‌طور معنی داری بیشتر از pH

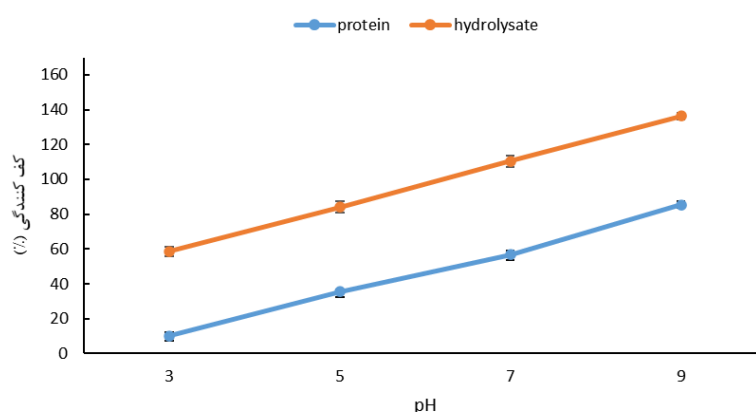


Figure 7- Foaming capacity of hydrolyzed protein and sweet almond protein concentrate

آنزیم ۱/۹۵ درصد حاصل شد. بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت احیاء کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تیمار بهینه پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که پتانسیل آنتی اکسیدانی آن به طور معنی داری به غلظت وابسته است. از طرف دیگر ارزیابی خواص عملکردی (حلالیت، کف کنندگی و امولسیون کنندگی) پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با پروتئین هیدرولیز نشده نشان داد که هیدرولیز به طور معنی داری باعث اصلاح خواص عملکردی آن شده بود.

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج بهینه سازی شرایط هیدرولیز (غلظت آنزیم، زمان هیدرولیز) و زمان اعمال فراصوت بر پروتئین هیدرولیز شده بادام شیرین نشان داد که بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال DPPH (۶۲/۹۷ درصد)، شلاته کنندگی یون آهن (۷۲/۸۵ درصد) و درجه هیدرولیز مناسب (۳۱/۳۸ درصد) با آنزیم آلكالاز در شرایط زمان اعمال فراصوت ۳/۵۹ دقیقه، زمان هیدرولیز ۱۷۱/۵۰ دقیقه و غلظت

#### ۵- منابع

- [1] Steinbrenner, H., Speckmann, B. and Klotz, L.O., (2016). Selenoproteins: Antioxidant selenoenzymes and beyond. Archives of Biochemistry and Biophysics, 595, pp.113-119.
- [2] Parcheta, M., Świsłocka, R., Orzechowska, S., Akimowicz, M., Chojińska, R. and Lewandowski,

- W., (2021). Recent developments in effective antioxidants: The structure and antioxidant properties. Materials, 14(8), p.1984.
- [3] Sánchez, A. and Vázquez, A., 2017. Bioactive peptides: A review. Food quality and safety, 1(1), pp.29-46.

- [4] Chen, C., Chi, Y.J., Zhao, M.Y. and Xu, W. (2012). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant and ACE inhibitory activities of egg white protein hydrolysate. *Food Science and Biotechnology*, 21: 27-34.
- [5] Gauthier, SF., Pouliot, Y., and Saint-Sauveur, D. (2006). Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. *International Dairy Journal*, 16(11):1315-23.
- [6] Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Zielińska, E. and Zieliński, D., (2020). Current trends of bioactive peptides—New sources and therapeutic effect. *Foods*, 9(7), p.846.
- [7] Wang, C., Tian, L.L., Li, S., Li, H.B., Zhou, Y., Wang, H., Yang, Q.Z., Ma, L.J. and Shang, D.J., 2013. Rapid cytotoxicity of antimicrobial peptide tempoprin-1CEa in breast cancer cells through membrane destruction and intracellular calcium mechanism. *PloS one*, 8(4), p.e60462.
- [8] Ganguly, A., Sharma, K. and Majumder, K., (2019). Food-derived bioactive peptides and their role in ameliorating hypertension and associated cardiovascular diseases. *Advances in food and nutrition research*, 89, pp.165-207.
- [9] Langyan, S., Khan, F. N., Yadava, P., Alhazmi, A., Mahmoud, S. F., Saleh, D. I., Zuan, A. T. K. (2021). In silico proteolysis and analysis of bioactive peptides from sequences of fatty acid desaturase 3 (FAD3) of flaxseed protein. *Saudi journal of biological sciences*, 28(10), 5480-5489.
- [10] Idowu, A.T., Benjakul, S., Sinthusamran, S., Sookchoo, P. and Kishimura, H., (2019). Protein hydrolysate from salmon frames: Production, characteristics and antioxidative activity. *Journal of Food Biochemistry*, 43(2), p.e12734.
- [11] Farzanfar, F., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Hosseini Qaboos, S.H., Kaveh, S. (2024). The effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant properties of hydrolyzed protein from flaxseed meal using alcalase and pancreatin enzymes by response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 21(147), 187-205.
- [12] Li, X., Da, S., Li, C., Xue, F. and Zang, T., (2018). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment with different levels of power output on the antioxidant properties of alcalase hydrolyzates from Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein isolate. *Cereal Chemistry*, 95(4), pp.518-526.
- [13] Rutherford-Markwick, K.J., (2012). Food proteins as a source of bioactive peptides with diverse functions. *British Journal of Nutrition*, 108(S2), pp.S149-S157.
- [14] Udenigwe, C.C., Je, J.Y., Cho, Y.S. and Yada, R.Y., (2013). Almond protein hydrolysate fraction modulates the expression of proinflammatory cytokines and enzymes in activated macrophages. *Food & function*, 4(5), pp.777-783.
- [15] Kaveh, S., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2022). Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 182, 114908.
- [16] Sadeghi Mahoonak, A.R., & Kaveh, S. (2022). Assessment of ACE-inhibitory and antioxidant activities of the peptide fragments from pumpkin seeds. *Iranian-Journal Nutrition Science Food Technology*, 17(3), 45-56.
- [17] Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248-54.
- [18] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M., Sarabandi, K. (2019). Optimization of production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed. *Journal of Food Science and Technology*, 15 (84), pp. 75-88.
- [19] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Erfanimoghaddam, V., Ghorbani, M., Gholamhossein pour, A.A., & Raeisi, M. (2024). Optimization of the effect of hydrolysis conditions and type of protease on the degree of hydrolysis and antioxidant properties of the protein hydrolysate from the skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) viscera by the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology (Iran)*, 20(144), 131-152.
- [20] Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H. and Kaveh, S., (2022). Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase. *Food Engineering Research*, 21(2), pp.75-90.
- [21] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Erfani Moghadam, V., Ghorbani, M., Gholamhosseinpour, A., Raeisi, M. (2023). Evaluation the antioxidant properties of purified bioactive peptides from the wastes of skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) processing, by pepsin and trypsin digestive enzymes. *Journal of Food Science and Technology*, 20 (141):200-222
- [22] Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A., (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*, 121(1), pp.178-184.
- [23] Sarabandi K, Sadeghi Mahoonak A, Hamishekar H, Ghorbani M, Jafari M. (2019). Functional and Antioxidant Properties of Casein Hydrolysate Prepared with Pancreatin. *Iranian Journal of nutrition science and food technology*, 13 (4) :61-74.
- [24] Kaveh, S., Sadeghi, M. A., Ghorbani, M., Jafari, M., & Sarabandi, K. (2019). Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek

seed's protein hydrolysate by response surface methodology.

- [25] Jin, J., Ma, H., Wang, K., Yagoub, A. E. G. A., Owusu, J., Qu, WYe, X. (2015). Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics sonochemistry*, 24, 55-64.
- [26] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18-24.
- [27] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2019). Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates. *Food chemistry*, 299, 125165.
- [28] Torres-Fuentes, C., Alaiz, M., & Vioque, J. (2012). Iron-chelating activity of chickpea protein hydrolysate peptides. *Food chemistry*, 134(3), 1585-1588.
- [29] Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*, 102(4), pp.1233-1240.
- [30] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Sarabandi K. (2020). Comparison of antioxidant properties of fenugreek seed protein hydrolyzed with alcalase and pancreatin. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 11(4), 77-88.
- [31] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, 114(4), pp.1198-1205.
- [32] Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*, 111(2), pp.370-376.
- [33] Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q., 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chemistry*, 134(3), pp.1360-1367.
- [34] Cui, Q., Sun, Y., Zhou, Z., Cheng, J., & Guo, M. (2021). Effects of enzymatic hydrolysis on physicochemical properties and solubility and bitterness of milk protein hydrolysates. *Foods*, 10(10), 2462.
- [35] Muhamyankaka, V., Shoemaker, C. F., Nalwoga, M., & Zhang, X. M. (2013). Physicochemical properties of hydrolysates from enzymatic hydrolysis of pumpkin (*Cucurbita moschata*) protein meal. *International Food Research Journal*, 20(5), 2227.
- [36] Samaei, S. P., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A., & Alami, M. (2021). Investigation of functional and antioxidant properties of faba bean protein hydrolysates using combines hydrolysis. *Food Processing and Preservation Journal*, 12(2), 25-38
- [37] Mohanty, U., Majumdar, R. K., Mohanty, B., Mehta, N. K., & Parhi, J. (2021). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysates from visceral waste of *Labeo rohita*. *Journal of Food Science and Technology*, 58, 4349-4358.
- [38] Shariat, A. M., Sadeghi, M. A., Ghorbani, M., & Alami, M. (2020). Evaluation of Functional Properties of bioactive protein hydrolysate derived from tomato seed. *Journal of food science and technology*, 16(96), 185-197.
- [39] Betancur-Ancona, D., Sosa-Espinoza, T., Ruiz-Ruiz, J., Segura-Campos, M. and Chel-Guerrero, L., 2014. Enzymatic hydrolysis of hard-to-cook bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein concentrates and its effects on biological and functional properties. *International journal of food science & technology*, 49(1), pp.2-8.
- [40] Popović, L., Peričin, D., Vaštag, Ž., Popović, S., Krimer, V., & Torbica, A. (2013). Antioxidative and functional properties of pumpkin oil cake globulin hydrolysates. *Journal of the American oil chemists' society*, 90, 1157-1165.



## Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: [www.fsct.modares.ir](http://www.fsct.modares.ir)

### Scientific Research

#### Optimizing production of hydrolyzed protein of sweet almond meal by ultrasound pretreatment and alcalase enzyme

Sanaz moayeri<sup>1</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>2\*</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak<sup>3</sup>, Mehdi kashani nejad<sup>4</sup> Mojtaba Reisi<sup>5</sup>

1- Ph.D. candidate of food chemistry, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2\* -Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3 -Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran..

4- Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

5 -Associate Professor, Food, Drug and Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

#### ARTICLE INFO

##### Article History:

Received: 2024/9/18

Accepted: 2024/1/2

##### Keywords:

antioxidant,  
ultrasound waves,  
sweet almond,  
hydrolyzed protein,  
enzymatic hydrolysis,  
alkalase

**DOI:** 10.22034/FSCT.22.165.135.

\*Corresponding Author E-  
moghorbani@yahoo.com

#### ABSTRACT

Sweet almonds are a good source of high quality proteins and the amount of protein in almonds is reported to be 16-22% based on dry weight (Sat, 1993). Almond proteins have high digestibility and albumin and globulin constitute 88-99% of its main proteins (Song et al., 2002). In this research, optimization of sweet almond protein enzymatic hydrolysis process was done using alcalase enzyme and ultrasound pretreatment. The investigated variables were hydrolysis time, enzyme concentration and ultrasound application time, and the investigated responses were hydrolysis degree, total antioxidant capacity and iron ion chelating activity. Then the effect of enzyme concentration on iron ion reduction activity and antioxidant capacity of the whole optimal treatment was evaluated. Next, a comparison of functional properties (solubility, foaming properties and emulsifying properties) of optimal hydrolyzed treatment with non-hydrolyzed protein was done at different pH. The results showed the highest amount of antioxidant activity (DPPH radical inhibition activity (62.97%), iron ion chelation (72.85%) and appropriate hydrolysis degree (31.38%) with the use of alcalase enzyme under conditions of application of ultrasound waves. (400 W) 3.59 minutes, the hydrolysis time was 171.50 minutes and the enzyme concentration was 1.95%. The antioxidant activity of the hydrolyzed protein was dependent on the concentration and the hydrolysis significantly increased the functional properties of the sweet almond protein. According to the results obtained in this research, the hydrolyzed protein product can be used in the food industry as a natural preservative and nutrient composition and in pharmaceutical products to increase functional properties and improve nutritional properties.