



## بهینه‌یابی هیدرولیز پروتئین دانه سیب با استفاده از آنزیم آلکالاز و بررسی ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن

محراب باقر<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲\*</sup>، محمد قربانی<sup>۲</sup>، مرتضی خمیری<sup>۲</sup>

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

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

### اطلاعات مقاله

### چکیده

#### تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۹/۰۹

تاریخ داوری: ۱۴۰۵/۰۲/۰۲

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۲/۱۳

#### کلمات کلیدی:

پیش تیمار فراصوت،

ویژگی آنتی‌اکسیدانی،

پروتئین دانه سیب،

هیدرولیز آنزیمی،

روش سطح پاسخ

DOI: 10.48311/fsct.2026.118036.82958

\* مسئول مکاتبات:

sadeghiaz@gau.ac.ir

با افزایش نگرانی‌ها درباره اثرات مخرب آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بر سلامت، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌ویژه پپتیدهای زیست‌فعال، اهمیت فزاینده‌ای یافته است. در این پژوهش بهینه‌یابی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه سیب توسط آنزیم آلکالاز و پیش تیمار فراصوت بررسی شد. هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه سیب با آنزیم آلکالاز، در دماهای ۴۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد، نسبت آنزیم به سویسترا ۱ تا ۲ درصد و در بازه زمانی ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه انجام شد. محلول پروتئینی پیش از هیدرولیز به مدت ۵ دقیقه با دستگاه فراصوت پالسی (۲۰۰ وات، ۶۰ هرتز) تیمار شد. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی شامل سنجش مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل صورت گرفت. نمونه‌های بدون پیش تیمار فراصوت بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از خود نشان دادند. شرایط بهینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این حالت، به ترتیب شامل زمان هیدرولیز ۱۴۹/۶۰ دقیقه، دمای ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سویسترا ۱/۸۰٪ بود. آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (در طول موج ۶۹۵ نانومتر) نشان داد که جذب نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب پیش تیمار شده با فراصوت بین ۰/۵۲۱ تا ۰/۸۱۷ و نمونه‌های بدون پیش تیمار بین ۰/۵۱۳ تا ۰/۹۸۲ قرار داشت. در آزمون قدرت احیاء آهن (در طول موج ۷۰۰ نانومتر)، جذب نمونه‌های پیش تیمار شده با فراصوت در بازه ۰/۷۹۳ تا ۰/۸۷۰ و نمونه‌های بدون پیش تیمار در بازه ۰/۶۲۳ تا ۱/۰۹۵ به دست آمد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH برای نمونه‌های پیش تیمار شده با فراصوت بین ۴۵/۱۷ تا ۶۳/۸۹ درصد و برای نمونه‌های بدون پیش تیمار بین ۴۵/۲۲ تا ۶۶/۹۷ درصد قرار داشت. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که این پپتیدها می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی، در فرمولاسیون محصولات غذایی استفاده شده و موجب کاهش اکسیداسیون و افزایش ماندگاری آنها شوند.

## ۱-مقدمه

برای جلوگیری از فساد مواد غذایی و محافظت از بدن در برابر طیف گسترده‌ای از بیماری‌ها، مهار پراکسیداسیون چربی‌ها و جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد در محصولات غذایی و سلول‌های زنده ضروری است. اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌عنوان افزودنی‌های غذایی برای جلوگیری از کاهش کیفیت به‌کار می‌روند، اما دغدغه‌هایی در خصوص ایمنی و پیامدهای مرتبط با سلامت آن‌ها مطرح است. از این رو، توسعه و به‌کارگیری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌عنوان جایگزینی مناسب برای انواع مصنوعی، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده است [۱]. در سال‌های اخیر، رشد آگاهی مصرف‌کنندگان درباره نقش تغذیه در حفظ و ارتقای سلامت سبب شده است تا تمایل به استفاده از مواد غذایی فراسودمند به شکل قابل توجهی افزایش یابد [۲]. پپتیدهای زیست‌فعال، که از ۳ تا ۲۰ اسیدآمینو تشکیل می‌شوند، طی فرایند تجزیه پروتئین و تولید پپتیدهای کوتاه و اسیدهای آمینه آزاد ایجاد می‌گردند [۳]. این پپتیدها بخش‌هایی ویژه از ساختار پروتئین هستند که افزون بر ارزش تغذیه‌ای، می‌توانند آثار سودمند فیزیولوژیک بر سلامت داشته باشند. با این حال، این توالی‌ها در پروتئین اولیه به حالت غیرفعال قرار دارند و تنها پس از آزاد شدن در قالب پپتیدهای کوتاه، توان بروز ویژگی‌های سلامت‌بخش خود را پیدا می‌کنند [۴]. متداول‌ترین شیوه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال، هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها است. یکی از آنزیم‌های رایج مورد استفاده در هیدرولیز آنزیمی، آلکالاز است که توسط باکتری *Bacillus licheniformis* تولید می‌شود. این آنزیم، نوعی پروتئاز قلیایی و غیر اختصاصی با فعالیت کاتالیتیکی بالا است. آلکالاز در مقایسه با سایر آنزیم‌های طبیعی و اسیدی، در زمان کوتاه‌تر و در pH قلیایی، درجه هیدرولیز مناسبی ایجاد می‌کند. قدرت بالای پروتئولیتیک و عملکرد اختصاصی آن باعث شده تا آلکالاز انتخاب مناسبی برای هیدرولیز پروتئین‌های گیاهی باشد [۵]. در پژوهش Abbasi و همکاران (۲۰۲۲)، اثربخشی آلکالاز و تریپسین بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین کینوا

بررسی شد. یافته‌ها نشان دادند که آلکالاز طی ۳۰ دقیقه و تریپسین پس از ۴ ساعت، به ترتیب بیشترین میزان تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان را ایجاد کردند [۶]. پژوهش‌های گسترده‌ای در حوزه تولید پروتئین‌های هیدرولیزشده صورت گرفته است. با این حال، فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی با محدودیت‌هایی مانند بازده پایین عملکرد آنزیم، طولانی بودن زمان انجام واکنش و کاهش نرخ تبدیل سویسترا به محصول مواجه هستند [۷]. به همین دلیل، امروزه از فناوری‌های متعددی همچون فراصوت، مایکروویو، انجماد و فرایندهای فشار بالا به‌عنوان روش‌های پیش‌تیمار پروتئین برای رفع محدودیت‌های یادشده استفاده می‌شود [۸]. فراصوت که به‌عنوان یک فناوری سبز، کم‌هزینه و کارآمد شناخته می‌شود که به طور گسترده در استخراج پروتئین‌ها و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به‌کار می‌رود [۹ و ۱۰]. این فرآیند با وجود آنکه ساختار نخستین پروتئین را دست‌نخورده باقی می‌گذارد، موجب دگرگونی در پیکربندی‌های سوم و چهارم می‌شود؛ تغییری که می‌تواند بر خصوصیات عملکردی و زیستی پروتئین اثرگذار باشد [۱۱ و ۱۲]. Pacheco و همکاران (۲۰۲۳) تأثیر پیش‌تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی کنسانتره پروتئین دانه کدو را بررسی کردند. نتایج نشان داد که نمونه‌های پیش‌تیمار شده با فراصوت ظرفیت مهار رادیکال آزاد بیشتری نسبت به نمونه‌های هیدرولیز شده به روش معمول بودند [۱۳]. فرآیندهای مرتبط با تبدیل آماده‌سازی میوه‌ها و سبزی‌ها حجم قابل توجهی از ضایعات گیاهی ایجاد می‌کنند که قابلیت بازیافت و بهره‌برداری مجدد را دارند؛ با این حال بخش عمده‌ای از این مواد بدون استفاده رها شده و مورد توجه قرار نمی‌گیرند [۱۴]. سیب با نام علمی *Malus domestica* یکی از پرمصرف‌ترین و محبوب‌ترین میوه‌ها در جهان به‌شمار می‌رود که به‌دلیل طعم مطبوع، ارزش غذایی بالا و کاربردهای متنوع در صنایع غذایی مورد توجه قرار گرفته است. آمارها نشان می‌دهند که تولید جهانی آن در سال ۲۰۲۴ از مرز ۸۶/۱۴ میلیون تن عبور کرده است. بخش عمده‌ای از تولید جهانی سیب، صرف تهیه فرآورده‌هایی مانند آب‌میوه می‌شود و در طی این فرآیند،

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد

آنزیم آلکالاز، تری کلرواستیک اسید، پتاسیم فری سیانید، آمونیوم هپتا مولیبدات، کلرید آهن (III)، هگزان، سولفوریک اسید ۹۵-۹۸ درصد، اتانول ۹۶ درصد، هیدروکلریک اسید، دی پتاسیم هیدروژن فسفات، <sup>۱</sup>DPPH، کوماسی برلیانت بلو (G250)، سدیم دی هیدروژن فسفات مونو هیدرات، سدیم هیدروکسید از شرکت های معتبر سیگما و مرک خریداری شدند. مراحل اجرایی این پژوهش در آزمایشگاه گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان صورت گرفت. دانه سیب از ضایعات حاصل از بخش میوه خشک پایلوت دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان تهیه شد.

### ۲-۲- آماده سازی و روغن گیری مواد اولیه

ابتدا دانه‌ها به صورت دستی جدا شد و در دستگاه آسیاب برقی (آسان توس شرق A500) به صورت پودر یکنواخت به دست آمد [۲۰]. سپس جهت روغن گیری، پودر دانه سیب با حلال هگزان به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) مخلوط و به مدت ۷۲ ساعت با شیکر در سرعت ۴۴۰ دور در دقیقه هم‌زده شد. سپس باقیمانده حلال در کنجاله از طریق آون فن دار (ممرت-۱۷۲۰-آلمان) و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت جدا شد. در نهایت پودر حاصل شده از الک (صنایع الک دماوند-ایران) با مش ۴۰ عبور داده شد و پودر دانه سیب چربی گیری شده تا زمان استخراج پروتئین در دمای یخچال نگهداری شد [۲۱].

### ۲-۳- تهیه کنسانتره پروتئین دانه سیب

تفاله‌ای به‌جا می‌ماند که حدود ۲۰ تا ۳۵ درصد از وزن اولیه میوه را تشکیل می‌دهد. این تفاله شامل بخش‌هایی مانند پوست، گوشت و مقدار اندکی دانه می‌باشد [۱۵]. مطالعات نشان داده‌اند که استفاده از این ضایعات در خوراک دام نه تنها ضایعات را کاهش می‌دهد، بلکه به افزایش محتوای پروتئینی و بهبود وضعیت روده در حیوانات کمک می‌کند، ضمن آنکه تجزیه پذیری خوبی نیز دارد [۱۶]. دانه‌های سیب در اغلب موارد به دلیل وجود ترکیبات ضد تغذیه‌ای مانند آمیگدالین استفاده نمی‌شوند [۱۷]. آمیگدالین، گلیکوزید سیانوزنی، بیشترین ترکیب سمی در دانه سیب است که در شرایط مناسب می‌تواند به وسیله بتا-گلوکوزیداز موجود در روده، به سیانید تبدیل شود. با این حال، مطالعات جدید نشان داده‌اند که مقادیر معمول در مصرف متعادل انسانی یا حیوانی، اثر سمی معنی‌دار ایجاد نمی‌کنند و برخی اثرات ضد التهابی و ضد تکثیر نیز از آن گزارش شده است [۱۸]. دانه سیب منبعی غنی از ترکیبات فنولی از جمله فنلیک‌ها (مانند کلروژنیک اسید)، فلاونوئیدها (کاتچین، کوئرستین، فلوریدزین) و تریپنوئیدها است. این ترکیبات فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد سرطانی بالایی دارند [۱۸]. بررسی‌ها نشان داده‌اند که این دانه‌ها سرشار از ترکیبات مغذی و زیست‌فعال هستند. میزان پروتئین دانه سیب کامل (چربی گیری نشده) حدود ۴۹/۵ گرم در هر ۱۰۰ گرم و مقدار چربی آن حدود ۲۴ گرم در هر ۱۰۰ گرم گزارش شده است. همچنین این دانه‌ها حاوی ۲/۵ تا ۴/۳۱ درصد خاکستر، مقادیر قابل توجهی فیبر رژیمی و ترکیبات فنلی می‌باشند. این ویژگی‌ها دانه سیب را به منبع بالقوه‌ای برای تولید پروتئین‌های گیاهی و کاربردهای غذایی و دارویی تبدیل کرده است [۱۹].

هدف از این مطالعه، بهینه‌یابی فرآیند هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه سیب با آنزیم آلکالاز است تا بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی حاصل شود.

انکوباتور شیکردار (ویژن-8480 vs-کره جنوبی) و در بازه‌های زمانی بین ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه انجام شد. جهت غیرفعال‌سازی فعالیت آنزیمی، مخلوط حاصل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در بن‌ماری (ممرت-22 WNB-آلمان) جهت حرارت‌دهی قرار داده شد و سپس با استفاده از حمام آب سرد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شد. به‌منظور جداسازی مواد نامحلول، نمونه‌ها با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند و سپس فاز مایع (سوپرناتانت) با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی، به صورت پودر درآمد و تا زمان استفاده در دمای ۱۸- سانتی‌گراد نگهداری شد [۲۳].

#### ۲-۶- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز پروتئین از طریق محاسبه نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به مجموع پروتئین‌های نمونه تعیین می‌گردد. بدین منظور، نمونه با تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد با نسبت ۱:۱ ترکیب شده و پس از ۱۰ دقیقه ورتکس (لاپرتون-LS 100-آلمان) با سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه، به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین موجود در بخش محلول (سوپرناتانت) به روش برادفورد در طول موج ۵۹۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (بی‌جی اینسترومنت-T80-انگلستان) اندازه‌گیری شده و درجه هیدرولیز با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد [۲۴].

$$100 \times \frac{\text{نیروزن محلول در تری کلرواستیک اسید 10 درصد}}{\text{کل نیروزن در نمونه ی هیدرولیز شده}} = \text{درجه هیدرولیز} (\%) \quad (1)$$

#### ۲-۷- آنالیز ترکیبات شیمیایی

آزمایش‌های شیمیایی مختلف بر روی دانه خام، دانه چربی‌زدایی‌شده و کنسانتره پروتئینی حاصل انجام شد. درصد رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر (بر حسب وزن مرطوب) به روش AOAC(2003) اندازه‌گیری شد. مقدار کربوهیدرات کل از حاصل تفریق مقادیر پروتئین، خاکستر، رطوبت و چربی از ۱۰۰ به دست آمد [۲۵].

برای استخراج پروتئین دانه سیب، پودر دانه سیب روغن‌گیری شده با نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی-حجمی) در آب مقطر پخش شد. برای باز کردن ساختار پروتئین‌ها، pH مخلوط با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید 1 نرمال تا عدد ۱۱ (pH حلالیت دانه سیب) تنظیم شد و سپس مخلوط به مدت یک ساعت در دمای محیط، با کمک همزن مغناطیسی (جنوی-انگلستان) هم زده شد. به‌منظور جداسازی اجزای محلول، نمونه‌ها توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار (هانیل-Combi 514R-کره جنوبی) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از جمع‌آوری سوپرناتانت، باقی‌مانده جامد مجدداً در آب مقطر حل شد و مرحله استخراج تکرار شد. سپس سوپرناتانت‌های به‌دست‌آمده با هم ترکیب شده و pH آن‌ها با استفاده از اسیدکلریدریک 1 نرمال تا عدد ۴ (pH ایزوالکتریک دانه سیب) تنظیم شد. در ادامه، بار دیگر سانتریفیوژ در همان شرایط قبلی تکرار شد و در نهایت، رسوب حاصل با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (اوپرون-FDB 5503-کره جنوبی) خشک شده و در ظروف دربسته، در محیطی خشک و خنک نگهداری شد [۲۲].

#### ۲-۴- پیش‌تیمار فراصوت

ابتدا محلولی با غلظت ۵ درصد (وزنی-حجمی) از کنسانتره پروتئین دانه سیب در آب مقطر و pH برابر ۸ آماده شد. برای اعمال پیش‌تیمار فراصوت، از دستگاه فراصوت پالسی با فرکانس ثابت ۶۰ هرتز، به مدت ۵ دقیقه و توان ۲۰۰ وات استفاده شد. به‌منظور جلوگیری از افزایش دما در طول عملیات فراصوت، از حمام یخ استفاده شد [۹].

#### ۲-۵- هیدرولیز آنزیمی

به‌منظور تهیه هیدرولیز پروتئینی از کنسانتره پروتئین دانه سیب، از آنزیم آلكالاز استفاده شد. آنزیم آلكالاز با غلظت‌های ۱ تا ۲ درصد (نسبت وزنی آنزیم به سوبسترا) به محلول پروتئینی اضافه و فرآیند هیدرولیز در شرایط دمایی بین ۴۰ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در pH برابر ۸، به کمک

## ۲-۸- محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی

مرحله بعد، ۱۰۰۰ میکرولیتر از فاز سوپرناتانت با ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۲۰۰ میکرولیتر از محلول ۰/۱ درصد کلرید آهن ترکیب شد. پس از گذشت چند دقیقه، جذب محلول در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به جای سوپرناتانت حاصل از هیدرولیز از ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. هرچه میزان جذب بیشتر باشد، نشان‌دهنده قدرت احیاکنندگی بالاتر نمونه است [۲۷].

برای ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، سه آزمون شامل مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن و سنجش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل انجام شد.

## ۲-۸-۱- اندازه‌گیری مهار رادیکال آزاد DPPH

## ۲-۸-۳- اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نهایی حاصل از هیدرولیز با ۱۰۰۰ میکرولیتر معرف (سولفوریک اسید ۰/۶ مولار، سدیم فسفات ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب گرم با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد. در نمونه شاهد به جای سوپرناتانت حاصل از هیدرولیز از ۱۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد. مقدار جذب بیشتر نشانگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر بود [۲۸].

در این روش، ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نهایی حاصل از هیدرولیز با ۱۰۰۰ میکرولیتر محلول DPPH با غلظت ۰/۱۵ میلی‌مولار مخلوط شدند و پس از ۲۰ ثانیه هم‌زدن، مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس، نمونه‌ها با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و جذب سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه (۲) محاسبه گردید. در نمونه شاهد به جای سوپرناتانت حاصل از هیدرولیز از ۱۰۰۰ میکرولیتر آب مقطر استفاده شد [۲۶].

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} = \text{درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (۲)}$$

## ۲-۹- آنالیز آماری

## ۲-۸-۲- آزمون قدرت احیاکنندگی آهن

آزمایشات با بهره‌گیری از روش سطح پاسخ ( $RSM^2$ )، با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت نسخه ۱۳ بر پایه طرح مرکب مرکزی ( $CCD^3$ )، برای سه متغیر مستقل زمان (A) و دمای فرآیند هیدرولیز آنزیمی (B) و نسبت آنزیم به سویسترا (C) انجام شد (جدول ۲). به این منظور ۲۰ تیمار تصادفی، با در نظر گرفتن ۶ تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم افزار دیزاین اکسپرت پیشنهاد شد. سطوح مورد استفاده به فاصله +۱، -۱، + $\alpha$  و - $\alpha$  از نقطه مرکزی (۰) قرار داشتند. فاکتور  $\alpha$  معادل ۱/۴۱۴ بود. پاسخ‌های مورد بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاء آهن، فعالیت مهارکنندگی

ابتدا ۱۰۰۰ میکرولیتر از سوپرناتانت نهایی حاصل از هیدرولیز با ۲۵۰۰ میکرولیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH برابر ۶/۵ و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول ۱ درصد پتاسیم فری‌سیانید مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در گرمخانه قرار گرفت. سپس ۵۰۰ میکرولیتر از محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد (وزنی-حجمی) به آن افزوده شد. مخلوط حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. در

2- Response Surface Methodology

3- Central Composite Designs

رادیکال DPPH در نظر گرفته شدند. سطوح مختلف متغیرهای مستقل در جدول ۱ نشان داده شده است.

**Table 1- Levels of independent variables used to optimize the conditions for hydrolysis of apple seed protein with alcalase enzyme with and without ultrasound application**

Independent variables code	Levels variables				
	+ $\alpha$	+1	0	-1	- $\alpha$
Hydrolysis process time (A)	180	149.595	105	60.4047	30
Process hydrolysis temperature (B)	55	51.9595	47.5	43.0405	40
Enzyme to substrate ratio % (C)	2	1.7973	1.5	1.2027	1

**Table 2- Treatments designed using the response surface method in two modes with and without ultrasound**

Treatment	Enzyme to substrate ratio (%)	Temperature (°C)	Time (minutes)
1	1.50	47.50	30
2	1.20	43.04	60.40
3	1.80	51.96	60.40
4	1.80	43.04	60.40
5	1.20	51.96	60.40
6	1.50	40	149.60
7	1.50	47.50	149.60
8	1.50	47.50	149.60
9	1.50	47.50	149.60
10	1.50	47.50	149.60
11	1.50	47.50	149.60
12	1.50	47.50	149.60
13	2	47.50	149.60

14	2	47.50	149.60
15	1.50	55	149.60
16	1.20	43.04	149.60
17	1.80	51.96	149.60
18	1.80	43.04	149.60
19	1.20	51.96	149.60
20	1.50	47.50	180

### ۳- نتایج و بحث

نتایج آنالیز ترکیبات تقریبی پودر دانه سیب بدون چربی، پودر دانه سیب با چربی و کنسانتره پروتئین دانه سیب مورد استفاده در پژوهش حاضر در جدول ۳ ارائه شده است.

۳-۱- ترکیبات تقریبی پودر دانه سیب چربی‌گیری نشده، چربی‌گیری شده و کنسانتره پروتئینی

**Table 3- Approximate compositions of defatted, non-defatted and apple seed protein concentrate powders**

Sample	Protein (%)	Moisture (%)	Oil (%)	Ash (%)	Carbohydrate (%)
defatted apple seed powder	28.78 ± 0.01 <sup>b</sup>	9.58 ± 0.35 <sup>a</sup>	7.20 ± 0.20 <sup>b</sup>	2.64 ± 0.00 <sup>a</sup>	51.80
Apple seed powder with fat	19.51 ± 0.01 <sup>c</sup>	9.42 ± 0.29 <sup>a</sup>	19.88 ± 0.42 <sup>a</sup>	2.55 ± 0.01 <sup>b</sup>	48.64
Apple seed protein concentrate	72.01 ± 0.26 <sup>a</sup>	5.68 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.20 ± 0.20 <sup>c</sup>	0.75 ± 0.01 <sup>c</sup>	19.36

Means with the same letter in each column indicate no significant difference at the  $p > 0.05$  level. Values are mean ± standard deviation.

پروتئین کنجاله چربی‌گیری شده دانه کدو کمتر از ایزوله آن به دست آمد. مقادیر پروتئین ( $0.01 \pm 19/51$ )، رطوبت ( $0.29 \pm 9/42$ )، چربی ( $0.42 \pm 19/88$ ) و خاکستر ( $0.01 \pm 2/55$ ) پودر چربی‌گیری نشده دانه سیب به دست آمده در این مطالعه کمتر از مقادیر این ترکیبات (به ترتیب، ۳۴، ۱۰/۲، ۲۷/۷، ۴/۱ درصد) در تحقیق Yu و همکاران (۲۰۰۷) بود [۲۹]. علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه در این پژوهش با پژوهش‌های قبل را می‌توان به دلیل اختلاف در نوع واریته نسبت داد.

میزان پروتئین در پودر چربی‌گیری شده دانه سیب کمتر از کنسانتره پروتئین دانه سیب (چربی‌گیری شده) بود، درحالی‌که میزان رطوبت، چربی و خاکستر در پودر چربی‌گیری شده دانه سیب بیشتر از کنسانتره پروتئین دانه سیب (چربی‌گیری شده) به دست آمد. همسو با نتایج به دست آمده در این پژوهش Bazi و همکاران (۲۰۲۴) پس از بررسی کنجاله چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئینی دانه کدو گزارش کردند که میزان چربی، رطوبت و خاکستر در کنجاله چربی‌گیری شده دانه کدو بیشتر از ایزوله پروتئینی آن و میزان

## ۳-۲- محاسبه درجه هیدرولیز

(جدول ۴). مطابق با (شکل 1a)، در دمای ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب پیش‌تیمار شده با فراصوت افزایش می‌یابد. درحالی‌که باتوجه به (شکل 1d) هنگام عدم استفاده از پیش‌تیمار فراصوت، در دمای ۴۳/۰۴ درجه سانتی‌گراد با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز، بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب مشاهده شد. (شکل 1b) نمودار سطح پاسخ فعالیت مهار رادیکال DPPH را به عنوان تابعی از زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا نشان می‌دهد. در زمان فرآیند هیدرولیز ۱۴۹/۶۰ دقیقه، مشخص شد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده پیش‌تیمار شده با فراصوت در نسبت‌های آنزیم به سوسترا ۱/۲۰ و ۱/۸۰ درصد در بالاترین مقدار خود قرار داشت. همان‌گونه که در نمودار سطح پاسخ سه بعدی (شکل 1c) اثر متقابل زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا نمایان است، در مقادیر حداکثر زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت حداکثر است. افزایش فعالیت مهار رادیکال پروتئین‌های دانه سیب هیدرولیز شده احتمالاً ناشی از تغییرات ساختاری در پروتئین است که منجر به توانایی بیشتر در مهار کردن رادیکال‌ها می‌شود. اختلال در ساختار پروتئین‌های دانه سیب توسط هیدرولیز آنزیمی ممکن است پروتئین را باز کرده و بقایای اسید آمینه را که دهنده الکترون هستند و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند، آشکار کند [۳۲]. نتایج این بخش از پژوهش حاضر با یافته‌های Promjeen و همکاران (۲۰۲۵) سازگار است، که نشان دادند افزایش غلظت آنزیم و افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهار رادیکال DPPH را افزایش می‌دهد. این افزایش در درجه اول به تغییرات ساختاری، کاهش وزن مولکولی و افزایش مواجهه با گروه‌های عاملی نسبت داده می‌شود [۳۳]. با نگاهی به (شکل 1c) می‌توان دریافت در دمای هیدرولیز ۴۳/۰۴ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوسترا ۱/۲۰ درصد بالاترین

درجه هیدرولیز یکی از شاخص‌های متداول برای سنجش میزان هیدرولیز پروتئین محسوب می‌شود. این شاخص به‌عنوان نسبت پیوندهای پپتیدی گسسته‌شده به مجموع پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین تعریف می‌گردد و در ارزیابی فعالیت‌های زیستی هیدرولیزها و ویژگی‌های عملکردی اهمیت دارد [۳۰]. بر اساس داده‌ها، درجه هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه سیب تحت پیش‌تیمار فراصوت برابر با ۲۱/۱۳ درصد و در شرایط بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت معادل ۲۴/۳۹ درصد گزارش شد.

## ۳-۳- بهینه‌یابی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب به روش سطح پاسخ

برای رسیدن به بیش‌ترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و خاصیت احیا کنندگی یون آهن (III) از روش سطح پاسخ استفاده شد. بعد از انجام دادن فرآیند هیدرولیز طبق تیمارهایی که نرم افزار Design expert مشخص کرده بود، هر یک از تیمارها از نظر آزمون‌های نام برده شده مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۳-۱- تاثیر زمان و دمای هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب با و بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت ترکیبات الکترون‌دهنده و احیاکننده مانند آنتی‌اکسیدان‌ها در مواجهه با رادیکال DPPH بنفش‌رنگ آن را به محلول غیررادیکالی با رنگ زرد تا بی‌رنگ تبدیل می‌کنند و در نتیجه جذب کاهش می‌یابد. انتظار می‌رود هیدرولیز شده‌های دانه سیب حاوی پپتیدها یا اسیدهای آمینه با قابلیت الکترون دهنده‌گی باشند و بتوانند رادیکال آزاد را مهار کنند [۳۱]. بر اساس نتایج، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت در محدوده ۴۵/۲۲ تا ۶۶/۹۷ درصد و با اعمال پیش‌تیمار فراصوت در محدوده ۴۵/۱۷ تا ۶۳/۸۹ درصد قرار داشت

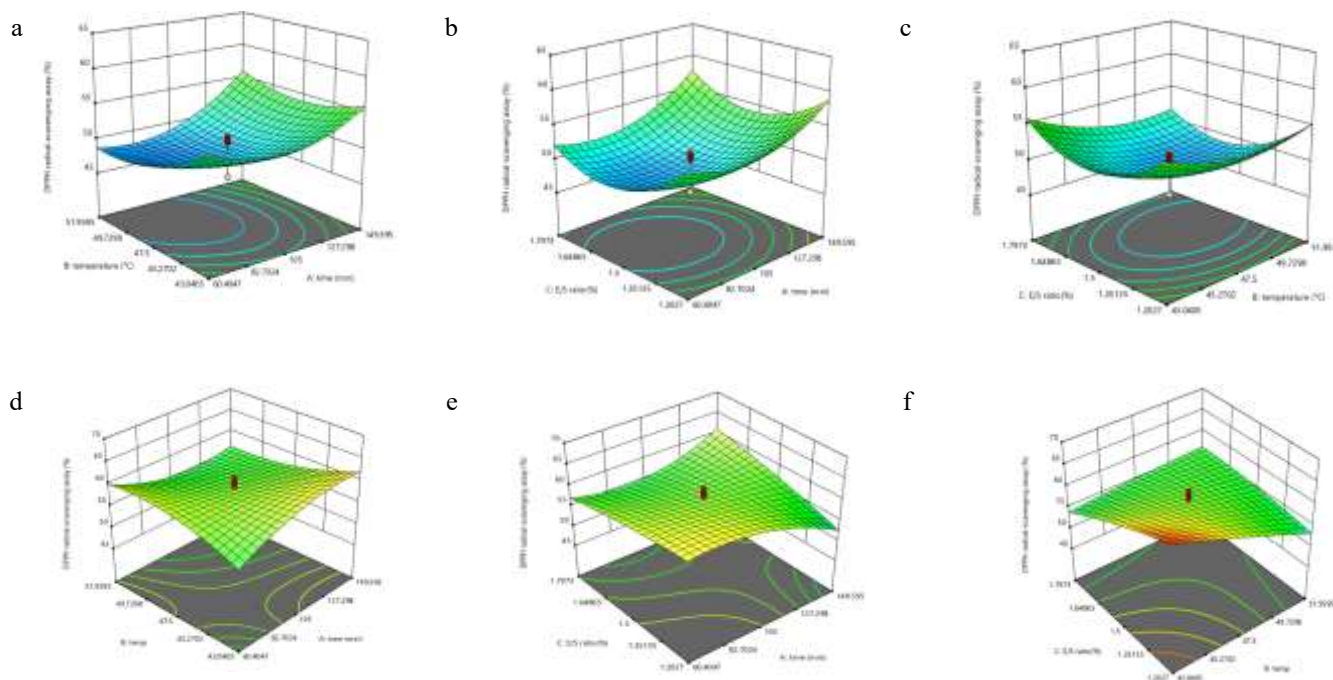
فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده با پیش‌ تیمار فراصوت مشاهده می‌شود. Vaštaj و همکاران (۲۰۱۰) در تحقیقی بیان کردند دما به شدت بر فعالیت ضد رادیکالی هیدرولیزات‌ها تأثیر می‌گذارد و دماهای بالاتر هیدرولیز (نزدیک به ۵۰ درجه سانتیگراد)، برای تولید هیدرولیزات‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی ترجیح داده می‌شود [۳۴]. همانطور که در (شکل 1f) اثر همزمان دمای هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا نشان داده شده است، بیشترین فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده بدون اعمال پیش تیمار فراصوت در محدوده دمایی ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوسترا ۱/۸۰ درصد مشاهده شد.

**Table 4- DPPH free radical scavenging activity data with and without ultrasound pretreatment**

Treatment	DPPH	DPPH(U)
1	60.85	49.10
2	58.14	62.95
3	58/57	50.86
4	51.71	62.32
5	60.88	57.97
6	62.05	50.39
7	57.27	50.96
8	59.24	50.21
9	59.79	50.39
10	61.05	50.58
11	60.07	45.17
12	52.87	45.18
13	60.31	58.95
14	52.06	56.47
15	52.59	52.16
16	64.38	63.89
17	66.97	59.46
18	59.15	62.00
19	45.22	61.01
20	56.72	60.19

U: ultrasound pretreatment

DPPH: DPPH radical scavenging activity(%)



**Figure 1- Three-dimensional response surface plot of the effect of hydrolysis time (minutes), hydrolysis temperature (°C), and enzyme to substrate ratio (percent) on changes in DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed apple seed proteins with (a-c) and without ultrasound pretreatment (d-f).**

فراصوت (شکل 2a) و بدون پیش تیمار فراصوت (شکل 2d) نشان دادند که در نسبت آنزیم به سوپسترای ثابت (۱/۵۰ درصد) فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها هنگامی به حداکثر رسید که زمان فرآیند هیدرولیز معادل ۱۴۹/۶۰ دقیقه و دمای آن ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد بود. گزارش شده است که با گذشت زمان و افزایش دمای هیدرولیز به دلیل پیشرفت فرآیند هیدرولیز، از هم گسستن پیوندهای بین پپتیدها و تبدیل آن‌ها به پپتیدهای کوچکتر، طول زنجیره پپتیدی تغییر می‌کند و این امر تأثیر قابل توجهی بر خاصیت ضداکسایش آن دارد به طوری که مشخص شده است که پپتیدهای تولیدی با وزن مولکولی کمتر دارای قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری هستند [۳۷]. Izanloo و همکاران (۲۰۲۲) پس از مطالعه هیدرولیز پروتئین قارچ خوراکی دریافتند که افزایش هر دو پارامتر دما و زمان هیدرولیز تأثیر صعودی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت [۳۸]. باتوجه به نمودار سطح پاسخ (شکل 2b) می‌توان دریافت بیشترین فعالیت

۳-۳-۲- تأثیر زمان و دمای هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوپسترا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب با و بدون اعمال پیش تیمار فراصوت

این آزمون بر پایه کاهش  $\text{Mo(VI)}$  (یون مولیبدن با بار مثبت +۶) به  $\text{Mo(V)}$  (یون مولیبدن با بار مثبت +۵) توسط نمونه و تشکیل کمپلکس سبزرنگ  $\text{Mo(V)}$ /فسفات در pH اسیدی انجام می‌شود [۲۷]. افزایش میزان جذب نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بالاتر است [۳۶]. مطابق نتایج حاصل از آزمایش‌ها (جدول ۵)، جذب نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب تحت پیش تیمار فراصوت در آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (در طول موج ۶۹۵ نانومتر) بین ۰/۵۲۱ تا ۰/۸۱۷ و در نمونه‌های بدون پیش تیمار فراصوت بین ۰/۵۱۳ تا ۰/۹۸۲ قرار گرفت. اثر متقابل زمان در دمای فرآیند هیدرولیز روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه سیب پیش تیمار شده با پیش تیمار

نمونه‌ها در دمای ۴۳/۰۴ تا ۴۵/۲۷ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوپسترا ۱/۲۰ تا ۱/۳۵ درصد به دست آمد. نمودار سه بعدی (شکل 2f) اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوپسترا (در زمان ثابت ۱۰۵ دقیقه) را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده نشان می‌دهد. مشخص است که در دمای ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد با افزایش نسبت آنزیم به سوپسترا فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش می‌یابد. به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که آنزیم آلكالاز با هیدرولیز باندهای پپتیدی موجود در پروتئین دانه سیب قادر به رهايش پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی بوده‌است که باعث تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدار شده و در نهایت منجر به افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل می‌شود [۳۹].

آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه سیب پیش‌تیمار شده با فرآیند فراصوت در زمان‌های انتهایی فرآیند هیدرولیز (در محدوده ۱۲۷/۳۰ تا ۱۴۹/۶۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوپسترا ۱/۲۰ تا ۱/۷۰ درصد بود. با توجه به نمودار سطح پاسخ (شکل 2e) می‌توان دریافت بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه سیب بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت هنگامی به دست آمد که زمان فرآیند هیدرولیز آنزیمی و نسبت آنزیم به سوپسترا در بالاترین حد خود (زمان ۱۴۹/۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوپسترا ۱/۸۰ درصد) قرار داشتند. اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوپسترا روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در (شکل 2c) نشان داده شده است، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

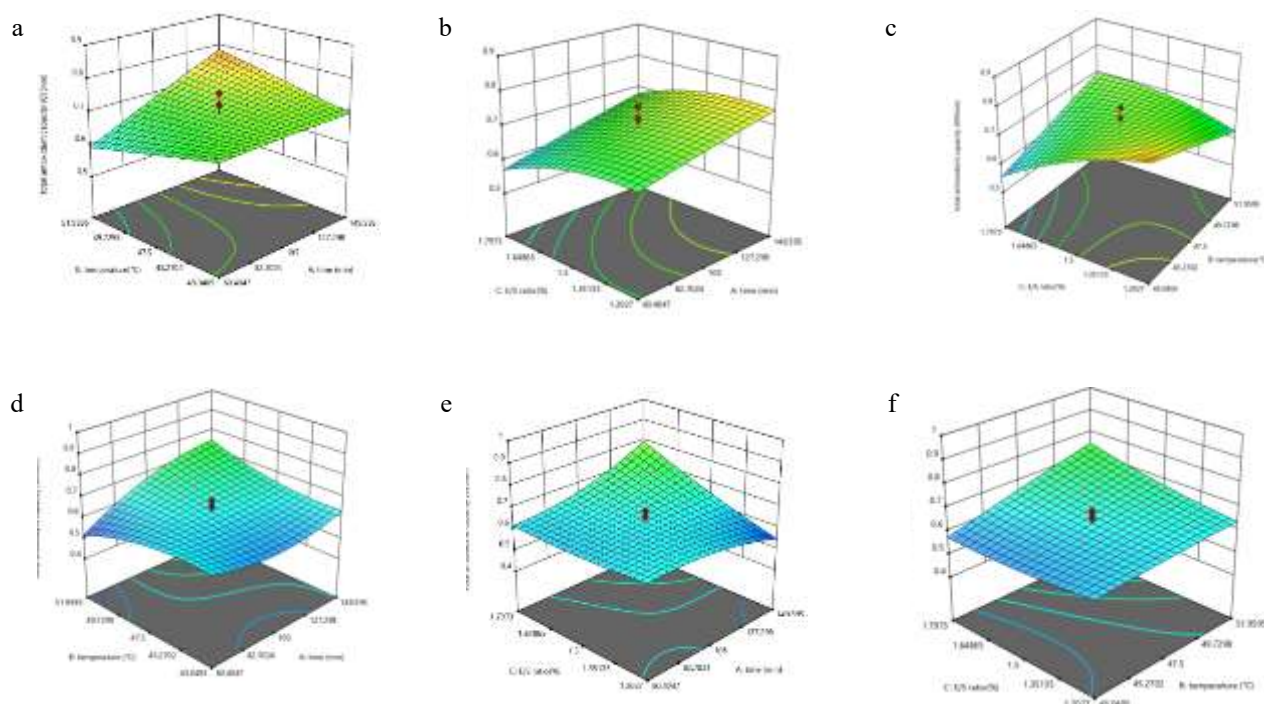
**Table 5- Total antioxidant capacity data with and without ultrasound pretreatment**

Treatment	AOT	AOT(U)
1	0.581	0.556
2	0.653	0.806
3	0.528	0.591
4	0.657	0.556
5	0.561	0.620
6	0.513	0.697
7	0.654	0.721
8	0.616	0.693
9	0.609	0.671
10	0.621	0.667
11	0.618	0.675
12	0.682	0.757
13	0.611	0.586
14	0.682	0.581
15	0.687	0.627
16	0.621	0.821
17	0.982	0.817

18	0.706	0.521
19	0.573	0.753
20	0.659	0.756

U: ultrasound pretreatment

AOT: total antioxidant activity



**Figure 2- Three-dimensional response surface plot of the effect of hydrolysis time (minutes), hydrolysis temperature (°C), and enzyme to substrate ratio (%) on changes in total antioxidant activity of hydrolyzed apple seed proteins with (a-c) and without ultrasound pretreatment (d-f).**

واکنش‌های زنجیره‌ای، تشکیل رادیکال‌های آزاد و یا واکنش با برخی از پیش‌سازهای پراکسید و جلوگیری از تشکیل آن‌ها ایفا می‌کنند [۲۷]. اساس نتایج، جذب نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب پیش‌تیمار شده با فراصوت در آزمون قدرت احیاء یون آهن (در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در محدوده ۰/۷۹۳ تا ۰/۸۷ و بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت در محدوده ۰/۶۲۳ تا ۱/۰۹۵ به دست آمد (جدول ۶). با افزایش زمان هیدرولیز آنزیمی در نسبت آنزیم به سویسترا ثابت (۱/۵۰ درصد) قدرت احیاء آهن نمونه‌های هیدرولیز شده با شیب ملایمی افزایش یافته است (شکل 3a). برای

۳-۳-۳- تاثیر زمان و دمای هیدرولیز و نسبت آنزیم به سویسترا بر قدرت احیاء یون آهن پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب با و بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت

سنجش قدرت کاهندگی اغلب برای ارزیابی توانایی آنتی‌اکسیدان در اهدای الکترون استفاده می‌شود. این آزمون به طور معمول در رابطه با ردوکتان‌ها است. ردوکتان‌ها نقش آنتی‌اکسیدانی خود را از طریق اهداء هیدروژن و مختل کردن

Varedesara و همکاران (۲۰۲۱) پس از بررسی هیدرولیز پروتئین دانه انگور با آنزیم آلکالاز بیان کردند با افزایش زمان هیدرولیز، میزان قدرت احیاکنندگی یون فریک افزایش یافت که با نتیجه به دست در مطالعه حاضر همخوانی دارد. مطابق (شکل 3c)، مشاهده شد که افزایش همزمان نسبت آنزیم به سوبسترا و دما، باعث ارتقای قدرت احیاء آهن در نمونه‌های هیدرولیز شده می‌گردد. بیشترین قدرت احیاکنندگی آهن نمونه‌های قرار گرفته تحت پیش تیمار فراصوت در بیشینه نسبت آنزیم به سوبسترا هنگامی که دمای فرآیند هیدرولیز پایین (۴۳/۰۴ تا ۴۵/۲۷ درجه سانتی‌گراد) بود مشاهده شد. اما، هنگام عدم استفاده از پیش تیمار فراصوت (شکل 3f) در نسبت آنزیم به سوبسترای بالا (۱/۸۰ درصد)، با افزایش دمای فرآیند هیدرولیز، قدرت احیاء آهن نمونه‌های هیدرولیز شده دانه سیب با شیب تندی افزایش یافت. قدرت کاهشندگی بالای هیدرولیزات‌های پروتئین دانه سیب احتمالاً ناشی از افزایش دسترسی گروه‌های هیدروژنی آزاد حاصل از هیدرولیز پپتیدها است [۳۲].

پروتئین‌های هیدرولیز شده دانه سیب بدون اعمال پیش تیمار فراصوت، براساس مدل سطح پاسخ در نسبت آنزیم به سوبسترای ثابت (۱/۵۰ درصد) بالاترین قدرت احیاء آهن نمونه‌ها در دقیقه ۱۰۵ و دمای ۵۱/۹۶ درجه سانتی‌گراد به دست آمد (شکل 3d). واکنش هیدرولیز احتمالاً ساختار پروتئین دانه سیب را تغییر داده و منجر به آشکار شدن باقیمانده‌های اسید آمینه شده است که دهنده الکترون بوده و قادر به واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند [۴۰]. همسو با نتایج به دست آمده در این مطالعه، Zhidong و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند دما و زمان هیدرولیز در یک محدوده مشخص، قدرت احیاکنندگی پروتئین آب پنیر را بهبود بخشید، اما در دما و زمان بالا، قدرت احیاکنندگی کاهش یافت. با توجه به نتایج به دست آمده توسط قدرت احیاء آهن نمونه‌های هیدرولیز شده قرار گرفته تحت پیش تیمار فراصوت (شکل 3b) بالاترین پاسخ مورد نظر با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز از ۱۱۰ تا ۱۴۹/۶۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۵۵ تا ۱/۸۰ درصد مشاهده شد. Zhidong و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند قدرت احیاکنندگی با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، افزایش یافت [۳۵]. با افزایش زمان هیدرولیز و کاهش اندازه پپتیدهای تولید شده، توانایی پپتیدها در حذف رادیکال‌های آزاد افزایش یافت [۴۱]. Samadi

**Table 6- Iron reduction property data with and without ultrasound pretreatment**

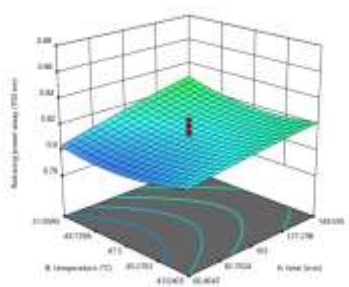
Treatment	Fe	Fe(U)
1	0.691	0.799
2	0.763	0.793
3	0.638	0.803
4	0.767	0.843
5	0.671	0.802
6	0.623	0.811
7	0.764	0.814

8	0.726	0.794
9	0.719	0.824
10	0.731	0.804
11	0.728	0.819
12	0.792	0.809
13	0.721	0.795
14	0.792	0.840
15	0.797	0.835
16	0.731	0.814
17	1.095	0.845
18	0.816	0.870
19	0.683	0.834
20	0.769	0.803

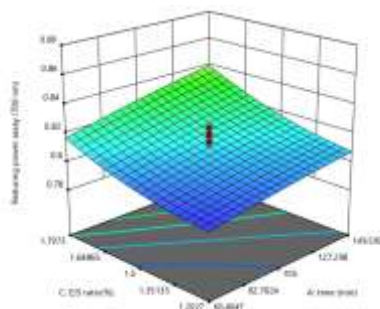
U: ultrasound pretreatment

Fe: Iron reducing power

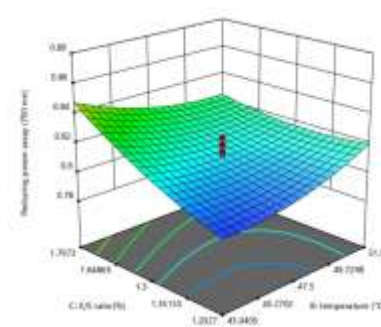
a



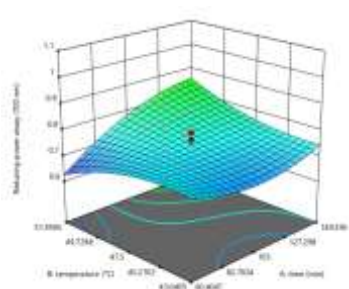
b



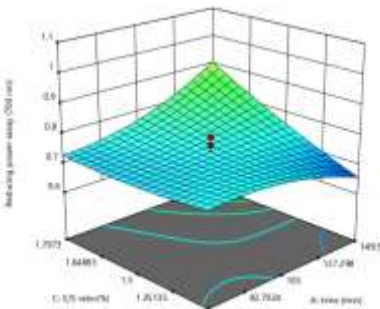
c



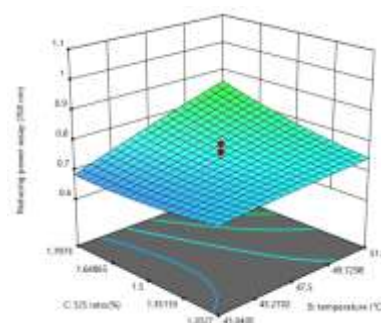
d



e



f



**Figure 3- Three-dimensional response surface plot of the effect of hydrolysis time (minutes), hydrolysis temperature (°C), and enzyme to substrate ratio (%) on changes in the iron reducing power of hydrolyzed apple seed proteins with(a-c) and without ultrasound pretreatment (d-f).**

درجه سانتی گراد، نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۸۰ درصد (نقطه بهینه برای هر دو فرآیند یکسان بود)، حاصل شد. در چنین شرایطی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (در طول موج ۶۹۵ نانومتر)، قدرت احیاء آهن (در طول موج ۷۰۰ نانومتر) و فعالیت مهار رادیکال DPPH با و بدون اعمال پیش تیمار فراصوت، به ترتیب، معادل ۰/۸۰ و ۰/۹۷، ۰/۸۴ و ۱/۰۸، ۵۸/۹۰ و ۶۶/۶۷ درصد بود (جدول ۷).

۳-۳-۴- تعیین شرایط بهینه هیدرولیز جهت تولید پروتئین های هیدرولیز شده دانه سیب با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا با استفاده از روش سطح پاسخ

نتایج به دست آمده نشان داد که شرایط بهینه جهت هیدرولیز پروتئین دانه سیب با فعالیت بهینه، توسط آنزیم آلکالاز با و بدون اعمال پیش تیمار فراصوت، زمان فرآیند هیدرولیز ۱۴۹/۶۰ دقیقه، دمای فرآیند هیدرولیز ۵۱/۹۶

**Table 7- Predicted and actual values of dependent variables under optimal enzymatic hydrolysis conditions**

Target factors	Total antioxidant activity (absorbance at 695nm)	Iron reduction power (absorbance at 700nm)	DPPH radical scavenging activity (%)
Predicted value by applying ultrasound pretreatment	0.80	0.84	58.90
Predicted value without applying ultrasound pretreatment	0.97	1.08	66.67
Actual value with ultrasonic pretreatment	0.92	0.78	47.27
Actual value without ultrasonic pretreatment	0.77	0.93	59.42

درجه سانتی گراد، نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ تا ۲ درصد و بازه زمانی ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه انجام شد. آزمون ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (در طول موج ۶۹۵ نانومتر) نشان داد که جذب نمونه های پروتئین هیدرولیز شده دانه سیب پیش تیمار شده با فراصوت بین ۰/۵۲۱ تا ۰/۸۱۷ و نمونه های بدون پیش تیمار بین ۰/۵۱۳ تا ۰/۹۸۲ قرار داشت. در آزمون قدرت احیاء آهن (در طول موج ۷۰۰ نانومتر)، جذب نمونه های

#### ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش ابتدا آزمایشات با بهره گیری از روش سطح پاسخ (RSM)، با استفاده از نرم افزار دیزاین اکسپرت بر پایه طرح مرکب مرکزی (CCD)، برای سه متغیر مستقل زمان و دمای فرآیند هیدرولیز آنزیمی و نسبت آنزیم به سوبسترا انجام شد. فرآیند هیدرولیز آنزیمی در دماهای ۴۰ تا ۵۵

و افزایش ماندگاری آن‌ها شوند. یافته‌ها همچنین اهمیت بازیابی ضایعات میوه و بهره‌برداری از منابع پروتئینی گیاهی را برای توسعه محصولات غذایی سالم و فراسودمند نشان می‌دهند.

### دسترس‌ی به داده‌ها

بنا به درخواست در دسترس قرار خواهند گرفت.

### تضاد منافع

نویسندگان هیچگونه تضاد منافی ندارند.

### بیانیه تأمین مالی

هیچ بودجه جداگانه‌ای برای این تحقیق دریافت نشده است.

### ۵- منابع

- [1] Kruk, J., Aboul-Enein, H. Y., Kladna, A., and Bowser, J. E. 2019. Oxidative stress in biological systems and its relation with pathophysiological functions: the effect of physical activity on cellular redox homeostasis. *Free radical research*. 53(5): 497-521.
- [2] FitzGerald, R.J., and Meisel, H. 2000. Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*. 84(S1): 33-37.
- [3] Chalamaiah, M., Yu, W., and Wu, J. 2018. Immunomodulatory and anticancer protein hydrolysates (peptides) from food proteins: A review. *Food chemistry*: 245: 205-222.
- [4] Bhat, Z.F., Kumar, S., and Bhat, H.F. 2015. Bioactive peptides of animal origin: a review. *Journal of Food Science and Technology*. 52(9): 5377-5392.
- [5] Yang, P., H. Ke, P. Hong, S. Zeng, W. Cao. 2011. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *Int. J. Food Sci. Technology*. 46: 2460-2466.
- [6] Abbasi, S., Moslehishad, M., and Salami, M. 2022. Antioxidant and alpha-glucosidase enzyme inhibitory properties of hydrolyzed protein and

- پیش‌تیمار شده با فراصوت در بازه ۰/۷۹۳ تا ۰/۸۷۰ و نمونه‌های بدون پیش‌تیمار در بازه ۰/۶۲۳ تا ۱/۰۹۵ به‌دست آمد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH برای نمونه‌های پیش‌تیمار شده با فراصوت بین ۴۵/۱۷ تا ۶۳/۸۹ درصد و برای نمونه‌های بدون پیش‌تیمار بین ۴۵/۲۲ تا ۶۶/۹۷ درصد قرار داشت. نتایج به دست آمده نشان داد که شرایط بهینه جهت هیدرولیز پروتئین دانه سیب با بالاترین مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاء آهن و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط آنزیم آلکالاز بدون اعمال پیش‌تیمار فراصوت معادل زمان فرآیند هیدرولیز ۱۴۹/۶۰ دقیقه، دمای فرآیند هیدرولیز ۵۱/۹۶ درجه‌سانتی‌گراد، نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۸۰ درصد به‌دست آمد. دانه‌های سیب، به‌عنوان منبع غنی پروتئین و ترکیبات زیست‌فعال، پتانسیل بالایی برای تولید پپتیدهای گیاهی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند این نتایج نشان می‌دهد که پپتیدهای تولید شده از دانه سیب، می‌توانند به‌عنوان افزودنی‌های طبیعی آنتی‌اکسیدانی در محصولات غذایی به کار روند و موجب کاهش اکسیداسیون bioactive peptides of quinoa. *International Journal of Biological Macromolecules*. 213: 602-609.
- [7] Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.A., Zhang, Y., Ma, H., and Otu, P.N.Y. 2017. Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*. 77: 488- 496.
  - [8] Li, X.R., Chi, C.F., Li, L., and Wang, B. 2017. Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. *Marine Drugs*. 15(3): 61.
  - [9] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., et al. 2018. Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. *Ultrasonics Sonochemistry*. 48: 538-549.
  - [10] Walters, M.E. 2019. Effects of Ultrasonication on the Antioxidant and Anti-diabetic Properties of Hydrolyzed Oat Proteins (Doctoral dissertation, Carleton University).
  - [11] Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C., and O'Donnell, C.P. 2015. Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science and*

- Technology*. 46(1): 60-67.
- [12] Chen, L., Chen, J., Ren, J., and Zhao, M. 2011. Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 59(6): 2600-2609.
- [13] Pacheco, A. F. C., de Souza, L. B., Paiva, P. H. C., Lelis, C. A., Vieira, E. N. R., Tribst, A. A. L., and Júnior, B. R. D. C. L. 2023. Impact of ultrasound on pumpkin seed protein concentrate hydrolysis: effects on Alcalase, protein, and assisted reaction. *Applied Food Research*. 3(1): 100281.
- [14] Sánchez, A., and Vázquez, A. 2017. Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*. 1(1): 29-46.
- [15] FAO. 2024. Apple industry: Wastes and possibilities: Global apple production reached 86.14 million metric tons in 2024. *In Processes*.
- [16] Morozova, K., Umezawa, S., and Ferrentino, G. 2023. Apples and Apple Seeds: Antioxidant Properties and Food Applications. *Antioxidants*. 12(7): 1456.
- [17] Yildizhan, H., Taki, M., Özilgen, M., and Gorjian, S. 2021. Renewable energy utilization in apple production process: A thermodynamic approach. *Sustainable Energy Technologies and Assessments*. 43: 100956.
- [18] Chakraborty, A., Deb, J. S., Saha, M., and Chatterjee, S. 2023. Apple seeds: phytochemistry, medicinal property and toxicology. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 14(3): 1038-1045.
- [19] Manzoor, M., Singh, J., and Gani, A. 2021. Characterization of apple (*Malus domestica*) seed flour for its structural and nutraceutical potential. *LWT*. 151: 112138.
- [20] Sitohy, M. Z., Desoky, E. M., Osman, A., and Rady, M. 2020. Pumpkin seed protein hydrolysate treatment alleviates salt stress effects on *Phaseolus vulgaris* by elevating antioxidant capacity and recovering ion homeostasis. *Scientia Horticulturae*. 271: 109495.
- [21] Papalamprou, E.M., Doxastakis, G. I., Biliaderis C. G., and Kiosseoglou, V. 2009. Influence of preparation methods on physiochemical and gelation properties of chickpea protein isolates. *Food Hydrocolloids*. 23: 337-43.
- [22] Mazloomi-Kiyapey, S. N., Sadeghi-Mahoonak, A., Ranjbar-Nedamani, E., and Nourmohammadi, E. 2019. Production of antioxidant peptides through hydrolysis of medicinal pumpkin seed protein using pepsin enzyme and the evaluation of their functional and nutritional properties. *Arya Atherosclerosis*: 15(5): 218.
- [23] Sarbandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., and Jafari, S. M. 2019. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*. 251: 19-28.
- [24] Sathivel, S., Bechtel, P. J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K. D., and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *Journal of Food Science*. 68(7): 2196-2200.
- [25] AOAC Method 983.23. 2003. Fat in foods, chloroform-methanol extraction. In Official methods of analysis. Association of Official Analytical Chemists. 15: 101-111.
- [26] Wu, H. C., Chen, H. M., and 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): 949-957.
- [27] 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): 1198-1205.
- [28] Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, Z. R., and Luo, H. Y. 2015. Influence of Amino Acid Compositions and Peptide Profiles on Antioxidant Capacities of Two Protein Hydrolysates from Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Muscle. *Marine Drugs*. 13(5): 2580-2601.
- [29] Yu, X., Van De Voort, F. R., Li, Z., and Yue, T. 2007. Proximate Composition of the Apple Seed and Characterization of Its Oil. *International Journal of Food Engineering*. 3(5).
- [30] Tabarestani, H. S., Shahram, H., Mahoonak, A. S., Moayedi, A., and Kaveh, S. 2024. Enzymatic hydrolysis of white-cheek shark skin gelatin: Optimization, structural transformations, functional characteristics, and antioxidant potential. *LWT*. 213: 117060.
- [31] Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and

- functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*. 114(3): 976-983.
- [32] Peng, X., Kong, B., Xia, X., and Liu, Q. 2010. Reducing and radical-scavenging activities of whey protein hydrolysates prepared with Alcalase. *International Dairy Journal*. 20(5): 360-365.
- [33] Promjeen, K., Phongthai, S., Singh, K., Chaisan, W., Pakakaew, P., Srichairatanakool, S., and Utama-Ang, N. 2025. Optimization of Enzymatic Protein Hydrolysate from Mung Bean (*Vigna radiata L.*), and Its Functional Properties. *Foods*. 14(14): 2459.
- [34] Vaštag, Ž., Popović, L., Popović, S., Krimer, V., and Peričin, D. 2010. Hydrolysis of pumpkin oil cake protein isolate and free radical scavenging activity of hydrolysates: influence of temperature, enzyme/substrate ratio and time. *Food and Bioproducts Processing*. 88(2-3): 277-282.
- [35] Zhidong, L., Benheng, G., Xuezhong, C., Zhenmin, L., Yun, D., Hongliang, H., and Wen, R. 2013. Optimisation of hydrolysis conditions for antioxidant hydrolysate production from whey protein isolates using response surface methodology. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*. 53-65.
- [36] Prieto, P., Pineda, M., and 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): 337-341.
- [37] Meshginfar, N., Mahoonak, A. S., Hosseinian, F., Ghorbani, M., and Tsopmo, A. 2018. Production of antioxidant peptide fractions from a by-product of tomato processing: mass spectrometry identification of peptides and stability to gastrointestinal digestion. *Journal of Food Science and Technology*. 55(9): 3498-3507.
- [38] Izanloo, I., Mahoonak, A. S., Taberestani, H. S., Mazloomi, S. N., and Rashidi, M. 2022. Optimization of production of hydrolyzed protein with antioxidant properties from edible mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Processing and Preservation*. 14(3): 55-78.
- [39] Kaveh, S., Mahoonak, A. S., Erfanimoghadam, V., Ghorbani, M., Gholamhosseinpour, A., and Reisi, M. 2024. Evaluation 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*. 20(144): 2008-8787.
- [40] Cumby, N., Zhong, Y., Naczek, M., and Shahidi, F. 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food chemistry*. 109(1): 144-148.
- [41] Sheng, L., Olsen, S. A., Hu, J., Yue, W., Means, W. J., and Zhu, M. J. 2016. Inhibitory effects of grape seed extract on growth, quorum sensing, and virulence factors of CDC "top-six" non-O157 Shiga toxin producing *E. coli*. *International Journal of Food Microbiology*. 229: 24-32



## Scientific Research

## Optimization of apple seed protein hydrolysis using alkalase enzyme and investigation of its antioxidant properties

Mehrab Bagher<sup>1</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak<sup>2\*</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>2</sup>, Morteza Khomeiri<sup>2</sup>

1- Master's Student of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

## ARTICLE INFO

## ABSTRACT

## Article History:

Received: 2025/11/30

Review: 2026/04/22

Accepted: 2026/05/03

## Keywords:

ultrasound pretreatment,

antioxidant properties,

apple seed protein,

enzymatic hydrolysis,

response surface methodology.

DOI: [10.48311/fsct.2026.118036.82958](https://doi.org/10.48311/fsct.2026.118036.82958)

\*Corresponding Author E-

[sadeghiaz@gau.ac.ir](mailto:sadeghiaz@gau.ac.ir)

With increasing concerns about the harmful effects of synthetic antioxidants on health, the use of natural antioxidants, especially bioactive peptides, has become increasingly important. In this study, the optimization of the enzymatic hydrolysis process of apple seed protein by alkalase enzyme and ultrasound pretreatment was investigated. Enzymatic hydrolysis of apple seed protein with alkalase enzyme was performed at temperatures of 40 to 55°C, enzyme to substrate ratio of 1 to 2%, and for a period of 30 to 180 minutes. The protein solution was treated with a pulsed ultrasound device (200 W, 60 Hz) for 5 minutes before hydrolysis. Antioxidant activity was evaluated by measuring DPPH radical scavenging, reducing power, and total antioxidant capacity. Samples without ultrasound pretreatment showed the highest antioxidant activity. The optimal conditions for antioxidant activity in this case were, respectively, hydrolysis time of 149.60 minutes, temperature of 51.96°C, and enzyme to substrate ratio of 1.80%. The total antioxidant capacity test (at a wavelength of 695 nm) showed that the absorbance of the ultrasonically pretreated apple seed protein hydrolyzed samples was between 0.521 and 0.817, and that of the non-pretreated samples was between 0.513 and 0.982. In the iron reducing power test (at a wavelength of 700 nm), the absorbance of the ultrasonically pretreated samples was between 0.793 and 0.870, and that of the non-pretreated samples was between 0.623 and 1.095. The DPPH radical scavenging activity for the ultrasound-pretreated samples ranged from 45.17 to 63.89% and for the non-pretreated samples ranged from 45.22 to 66.97%. The results of this study indicate that these peptides can be used as natural antioxidants in the formulation of food products to reduce oxidation and increase their shelf life.