

Research Article
Vol. 22, No. 4, Sep.-Oct. 2026, p. 363-388

Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Olive Seeds Protein by Response Surface Methodology and Evaluation of Its Stability

M. Ranjbar¹, A. Sadeghi Mahoonak^{1*}, M. Ghorbani¹

1- Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources (GUASNR), Gorgan, Iran

(*- Corresponding Author Email: sadeghiaz@yahoo.com)

Received: 07.06.2026

Revised: 20.07.2026

Accepted: 02.08.2026

Available Online: 24.08.2026

How to cite this article:

Ranjbar, M., Sadeghi Mahoonak, A., & Ghorbani, M. (2026). Optimization of enzymatic hydrolysis of olive seeds protein by response surface methodology and evaluation of its stability. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 22(4), 363-388. (In Persian). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.99163.1589>

Introduction

Olive Seeds is a major by-product of the olive oil industry, produced in millions of tons annually. It contains significant amounts of protein (approximately 13.5%) along with fiber, lipids, and phenolic compounds. However, native proteins have low solubility and complex structures that limit their functionality. Enzymatic hydrolysis is an eco-friendly method to release bioactive peptides with antioxidant, ACE-inhibitory, and cholesterol-lowering activities. The choice of enzyme is crucial; alcalase (a broad-specificity serine protease) and trypsin (a specific protease cleaving at lysine and arginine residues) produce different peptide profiles. Process variables such as hydrolysis time and enzyme-to-substrate (E/S) ratio significantly affect the degree of hydrolysis and antioxidant activity. Response Surface Methodology (RSM) is a powerful statistical tool for optimizing such multi-variable processes. Moreover, the stability of hydrolysates during storage, thermal processing, freeze-thaw cycles, and pH changes is essential for industrial applications. This study aimed to optimize the hydrolysis conditions (time and E/S ratio) for olive seeds protein using alcalase and trypsin via RSM, evaluate the antioxidant activities, and assess the stability of the optimal hydrolysates under different pH, heat, refrigeration, freeze-thaw, and ambient storage conditions.

Materials and Methods

Olive seeds were obtained from local market at Gorgan then dried, ground, defatted with hexane (AOAC method), and protein was isolated by alkaline extraction (pH 11) followed by isoelectric precipitation (pH 4). Protein isolate (5% w/v) was hydrolyzed in Tris-HCl buffer (pH 8 for alcalase, pH 7 for trypsin) at 50°C (alcalase) or 37°C (trypsin) with E/S ratios of 1–3% and 30–210 min according to a Central Composite Design (CCD) approach. The reaction was stopped by heating at 85°C for 30 min, then centrifuged and freeze-dried. Antioxidant activities were measured by different methods namely: DPPH radical scavenging, reducing power, and total antioxidant capacity (phosphomolybdenum method). Stability tests included: pH stability (pH 3–8, 30 min), thermal stability (95°C for 15–75 min), refrigeration storage stability (4°C for 15 days), freeze-thaw cycles stability (15 days), and ambient storage (25°C for 7 days). Data were analyzed by Design Expert, ANOVA followed by Duncan's multirange test (SPSS), and graphs prepared by Excel software.

Results and Discussion

RSM analysis showed that both time and E/S ratio had significant quadratic effects on DPPH, FRAP, and TAC for both enzymes. For alcalase, response surfaces exhibited a dome-shaped central peak with optimal conditions around 150 min and E/S 2%. For trypsin, a rising quadratic plateau was observed, with optimal conditions around 139 min and E/S 2%. These patterns confirm that excessive hydrolysis reduces antioxidant activity due to over-degradation of active peptides into free amino acids. Alcalase hydrolysates consistently showed higher antioxidant



Authors retain the copyright. This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2026.99163.1589>

activities than trypsin hydrolysates, attributed to alcalase's preference for hydrolyzing at hydrophobic/aromatic amino acids (Phe, Tyr, Trp, Leu, Val) which are strong electron donors. Stability studies revealed, pH: Maximum TAC at pH 7–8, minimum at pH 3–4 (near isoelectric point). Alcalase hydrolysate was more stable. Heat (95°C): Gradual time-dependent decrease in both FRAP and TAC; alcalase hydrolysate retained higher activity after 75 min. Refrigeration (4°C, 15 days): Progressive decline in TAC and FRAP; alcalase hydrolysate showed slower decay. Freeze-thaw (15 days): Significant reduction after each cycle, mainly due to ice crystal damage and cryoconcentration; alcalase hydrolysate more resistant. Ambient (25°C, 7 days): Faster decline than refrigeration; alcalase hydrolysate.

Conclusion

The optimal hydrolysis conditions for olive seeds protein were determined using RSM. Alcalase-produced hydrolysate exhibited superior antioxidant activity and stability compared to trypsin-hydrolysate due to the release of hydrophobic/aromatic-rich peptides. Stability decreased in all tested conditions (heat, freeze-thaw, storage), but alcalase hydrolysate consistently showed higher retention. These findings support the valorization of olive seeds protein as a source of stable antioxidant peptides for food and pharmaceutical applications.

Keywords: Antioxidant, Bioactive peptide, Olive seeds, Optimization, Protease

مقاله پژوهشی

جلد ۲۲، شماره ۴، مهر- آبان ۱۴۰۵، ص. ۳۸۸-۳۶۳

بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته زیتون با روش سطح پاسخ و ارزیابی پایداری آن

منا رنجبر^۱ - علیرضا صادقی ماهونک^{۱*} - محمد قربانی^۱

تاریخ دریافت: ۱۴۰۵/۰۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۵/۰۵/۱۱

چکیده

هسته زیتون به‌عنوان یک محصول جانبی صنعت روغن‌گیری، منبعی غنی از پروتئین با پتانسیل تولید پپتیدهای زیست‌فعال است. در این پژوهش، هیدرولیز آنزیمی پروتئین استخراج‌شده از هسته زیتون (رقم زر زیتون) با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و تریپسین، با هدف بهینه‌سازی شرایط فرایند (زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) با روش سطح پاسخ (Central Composite Design) انجام شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌ها با سه آزمون مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاکنندگی آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC)، روش فسفومولیدات) ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که هر دو متغیر تأثیر معنی‌داری بر پاسخ‌ها داشته و الگوی پاسخ به‌صورت درجه دوم با وجود یک ناحیه بهینه مرکزی بود. هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمامی شرایط، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به تریپسین نشان داد. طبق نتایج مقادیر بهینه برای آنزیم آلکالاز زمان ۱۵۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و برای آنزیم تریپسین زمان ۱۳۹ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ می‌باشد. همچنین پایداری هیدرولیزات بهینه در برابر pH (۳ تا ۸)، حرارت (۹۵ درجه سانتی‌گراد تا ۷۵ دقیقه)، نگهداری در یخچال (۴ درجه، ۱۵ روز)، چرخه‌های انجماد-ذوب (۱۵ روز) و دمای محیط (۲۵ درجه، ۷ روز) بررسی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمامی شرایط به‌طور وابسته به زمان کاهش یافت، اما هیدرولیز آلکالاز پایداری بهتری نشان داد. یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد که هیدرولیز کنترل‌شده با آلکالاز در شرایط بهینه، روشی کارآمد برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان پایدار از هسته زیتون با قابلیت کاربرد در صنایع غذایی و دارویی است.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، بهینه‌سازی، پروتئاز، پپتید زیست‌فعال، هسته زیتون

مقدمه

پایین مورد استفاده قرار می‌گرفتند. با این حال، مطالعات اخیر نشان داده‌اند که هسته زیتون، برخلاف تصور رایج، منبعی غنی از ترکیبات ارزشمند تغذیه‌ای و زیست‌فعال است. هسته زیتون از دو بخش اصلی تشکیل شده است: یک پوسته چوبی بیرونی و یک مغز داخلی. هسته زیتون حاوی مقادیر قابل توجهی پروتئین (حدود ۱۳/۵٪)، فیبر غذایی (۴۲٪)، لیپیدها (۲۰٪)، خاکستر (۳٪) و طیف وسیعی از ترکیبات فنولی با خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی اثبات‌شده است (Hernández-Corroto, Marina, & García, 2020).

مجموعه این ترکیبات زیست‌فعال و مغذی، هسته زیتون را از یک ضایعات کشاورزی به یک ماده اولیه بالقوه و پایدار برای استخراج

صنعت فرآوری زیتون (شامل تولید روغن زیتون و کنسرو زیتون) سالانه حجم عظیمی از محصولات جانبی جامد تولید می‌کند که در صورت عدم مدیریت صحیح، به‌دلیل بار آلاینده‌ی بالا، تهدیدی جدی برای محیط‌زیست محسوب می‌شوند. تخمین زده می‌شود که این صنعت در سطح جهانی سالانه بیش از ۴۰ میلیون تن زیست‌توده زائد تولید می‌کند که بخش عمده‌ای از آن را هسته زیتون تشکیل می‌دهد (Dahdouh, Khay, Le Brech, El Maakoul, & Bakhouya, 2023). در رویکرد سنتی، این ضایعات عمدتاً به‌عنوان سوخت، خوراک دام و یا در برخی محصولات صنعتی به‌عنوان مواد اولیه با ارزش افزوده

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
(*)- نویسنده مسئول: (Email: sadeghiaz@yahoo.com)

ترکیبات زیست‌فعال و تولید مواد مغذی فراسودمند تبدیل کرده است (Dahdouh et al., 2023). در همین راستا، مفهوم اقتصاد چرخشی و بازیافت کامل پسماند، بازاستفاده از این محصول جانبی را به یک ضرورت اقتصادی و زیست‌محیطی تبدیل کرده است. در میان ترکیبات ارزشمند موجود در هسته زیتون، پروتئین‌های آن به دلیل پتانسیل بالایشان برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال، اخیراً توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (Bartolomei et al., 2022). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که پروتئین هسته زیتون از چندین فراکسیون پروتئینی تشکیل شده است که عمدتاً شامل گلوپلین، گلوبولین، آلبومین و مقادیر کمتری پرولامین هستند و گلوپلین معمولاً فراکسیون غالب را تشکیل می‌دهد. همچنین گزارش شده است که پروتئین هسته زیتون حاوی مقادیر قابل توجهی از اسیدهای آمینه گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، آرژنین، لوسین، والین و فنیل‌آلانین است. حضور اسیدهای آمینه آب‌گریز و آروماتیک، به‌ویژه فنیل‌آلانین، تیروزین و در صورت حضور، تریپتوفان، می‌تواند زمینه مناسبی برای تولید پپتیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پس از هیدرولیز آنزیمی فراهم کند (Maestri et al., 2019).

با این وجود، پروتئین‌ها در شکل اولیه و دست‌نخورده خود دارای حالیت پایین، وزن مولکولی بالا و ساختار پیچیده‌ای هستند که دسترسی زیستی و فعالیت عملکردی آن‌ها را محدود می‌کند (Mohammad, da Silva Ferreira, Jacintho Barbosa, & Barbosa Junior, 2023). برای غلبه بر این محدودیت‌ها، هیدرولیز آنزیمی کنترل‌شده به‌عنوان یک روش کارآمد و دوستدار محیط‌زیست برای بهبود خواص عملکردی، تغذیه‌ای و زیست‌فعالی پروتئین‌های گیاهی شناخته شده است (Wen, Zhang, Zhang, Duan, & Ma, 2020). این فرآیند با شکستن پیوندهای پپتیدی و تولید پپتیدهایی با زنجیره کوتاه‌تر، منجر به آزادسازی پپتیدهای نهفته در ساختار پروتئین می‌شود که اغلب فعالیت‌های زیستی قدرتمندی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش کلسترول و فشارخون را از خود نشان می‌دهند (Udenigwe & Aluko, 2012). تحقیقات پیشین به وضوح نشان داده‌اند که هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های ایزوله شده از هسته و دانه زیتون با استفاده از آنزیم‌های مختلف، به تولید هیدرولیزات‌هایی با فعالیت‌های زیستی امیدوارکننده منجر می‌شود. برای مثال، بارتولومئی و همکاران (Bartolomei et al., 2022) نشان دادند که هیدرولیزات‌های پروتئینی حاصل از دلنه‌های زیتون با استفاده از آنزیم‌های مختلف، علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، برخی پپتیدهای زیست‌فعال دارای اثرات ضددیابتی نیز هستند. یکی از مکانیسم‌های مهم این پپتیدها، مهار آنزیم دی‌پپتیدیل پپتیداز-۴^۱ است. این آنزیم

مسئول تجزیه هورمون‌های اینکرتینی، به‌ویژه پپتید شبه‌گلوکاگون-۱^۲، در بدن است. مهار DPP-IV موجب افزایش پایداری و نیمه‌عمر GLP-1 شده و در نتیجه، ترشح انسولین وابسته به گلوکز را تقویت، ترشح گلوکاگون را کاهش و به حفظ تعادل قند خون کمک می‌کند. از این رو، پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی به‌عنوان ترکیباتی با پتانسیل توسعه غذاهای فراسودمند و مکمل‌های ضددیابت مورد توجه قرار گرفته‌اند (Bartolomei et al., 2022). مطالعه‌ای با هدف تولید پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین هسته زیتون از طریق هیدرولیز آنزیمی انجام شد. پژوهشگران با بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز و استفاده از آنزیم‌های مختلف، پپتیدهایی با توانایی اتصال به اسیدهای صفراوی، مهار کلسترول استراز و مهار آنزیم HMG-CoA ردکتاز تولید کردند. همچنین با استفاده از LC-MS/MS بیش از ۴۵ توالی پپتیدی زیست‌فعال شناسایی شد. نتایج نشان داد هسته زیتون منبع ارزشمندی برای تولید پپتیدهای عملکردی محسوب می‌شود (Prados, Dominguez-Vega, Marina, & Garcia, 2023).

انتخاب نوع آنزیم، مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده در ویژگی‌های محصول نهایی هیدرولیز است. آنزیم‌های پروتئاز مختلف با توجه به ویژگی و محل برش خاص خود، پروفایل پپتیدی کاملاً متفاوتی تولید می‌کنند. در این میان، آلکالاز، یک اندوپپتیداز قلیایی از خانواده سرین پروتئازها، به‌طور گسترده به‌عنوان یکی از کارآمدترین آنزیم‌ها برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از منابع مختلف پروتئینی گیاهی و حیوانی شناخته می‌شود (Mardani, Badakné, Farmani, & Aluko, 2023). مطالعات متعدد نشان داده‌اند که هیدرولیزات‌های تولید شده با آلکالاز اغلب بالاترین درجه هیدرولیز و قوی‌ترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در مقایسه با سایر آنزیم‌های تجاری دارا هستند (Sripokar, Panya, & Sriwattana, 2022). از سوی دیگر، تریپسین یک پروتئاز گوارشی با ویژگی بالا است که پیوندهای پپتیدی را در سمت کربوکسیل اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین هیدرولیز می‌کند. این آنزیم نیز به‌طور مؤثری برای تولید هیدرولیزات‌های پروتئینی با خواص آنتی‌اکسیدانی از منابع مختلف به کار رفته است (Mardani et al., 2024). آلکالاز و تریپسین از نظر اختصاصیت برش پیوندهای پپتیدی با یکدیگر تفاوت دارند؛ به‌طوری‌که آلکالاز با اختصاصیت نسبتاً گسترده، پیوندهای پپتیدی متنوعی را هیدرولیز می‌کند، در حالی‌که تریپسین به‌طور اختصاصی پیوندهای مجاور اسیدهای آمینه لیزین و آرژنین را می‌شکند. این تفاوت در الگوی هیدرولیز، منجر به تولید پپتیدهایی با توالی، طول زنجیره و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی متفاوت می‌شود که در نتیجه،

می‌توانند فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی از خود نشان دهند. همچنین، شرایط بهینه هیدرولیز از جمله غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز، به‌طور چشمگیری بر درجه هیدرولیز و در نتیجه بر میزان و نوع فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول نهایی تأثیر می‌گذارند (Fathi, Hosseini, Ramezani, & Rashidi, 2022).

پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها از طریق مکانیسم‌های مختلفی در مهار فرآیندهای اکسیداتیو نقش ایفا می‌کنند. مهم‌ترین مکانیسم، خنثی‌سازی مستقیم گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد از طریق اهدای الکترون یا اتم هیدروژن است که موجب توقف واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌شود. علاوه بر این، بسیاری از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان قادرند یون‌های فلزی واسطه نظیر Fe^{+2} و Cu^{+2} را کلاته کنند و از تشکیل رادیکال‌های بسیار واکنش‌پذیر از طریق واکنش فنتون جلوگیری نمایند. برخی پپتیدها نیز با احیای ترکیبات اکسیدشده یا افزایش فعالیت سامانه‌های دفاع آنتی‌اکسیدانی درون‌سلولی، از آسیب اکسیداتیو جلوگیری می‌کنند. کارایی این پپتیدها به ویژگی‌های ساختاری آن‌ها از جمله توالی اسیدهای آمینه، وزن مولکولی، میزان آب‌گریزی و حضور اسیدهای آمینه آروماتیک (مانند تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین)، اسیدهای آمینه گوگرددار (مانند سیستئین و متیونین) و همچنین هیستیدین وابسته است. این باقی‌مانده‌های اسیدآمینه به‌دلیل توانایی انتقال الکترون، اهدای هیدروژن و تشکیل کمپلکس با یون‌های فلزی، نقش مهمی در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها ایفا می‌کنند. از این‌رو، نوع آنزیم مورد استفاده در هیدرولیز و اختصاصیت برش آن، با تعیین ترکیب و توالی پپتیدهای حاصل، تأثیر مستقیمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی خواهد داشت (Wen et al., 2018).

با توجه به پیچیدگی فرآیند هیدرولیز آنزیمی و تأثیر متقابل متغیرهای مختلف بر یکدیگر، استفاده از روش‌های آماری پیشرفته برای بهینه‌سازی این فرآیندها ضروری است. روش سطح پاسخ (Response Surface Methodology, RSM) یکی از قدرتمندترین و کارآمدترین روش‌های آماری-ریاضی برای بهینه‌سازی فرآیندهایی است که تحت تأثیر چندین متغیر مستقل قرار دارند. این روش با طراحی آزمایش‌های هدفمند و مدل‌سازی ریاضی، امکان یافتن شرایط بهینه را با حداقل تعداد آزمایش فراهم می‌کند و هم‌زمان اثرات متقابل متغیرها را نیز بررسی می‌نماید (Yang, Huang, Dong, & Wang, 2023). یکی از چالش‌های اساسی در مسیر تجاری‌سازی و کاربرد پپتیدهای زیست‌فعال در صنایع غذایی و دارویی، حفظ پایداری ساختاری و عملکردی آن‌ها در طول فرآوری، انبارداری و مصرف است. پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی، برخلاف پروتئین‌های دست‌نخورده، به‌دلیل

وزن مولکولی پایین‌تر و در معرض قرار گرفتن گروه‌های عاملی، مستعد واکنش‌های شیمیایی و فیزیکی متعددی هستند که می‌تواند منجر به از دست رفتن فعالیت زیستی آن‌ها شود (Liu, Guo, & Ma, 2023). عواملی نظیر تغییرات pH محیط، اعمال حرارت در طی فرآیندهای پاستوریزاسیون یا استریلیزاسیون، چرخه‌های انجماد-ذوب، و مدت زمان نگهداری در دماهای مختلف (محیط یا یخچال) از مهم‌ترین تنش‌های محیطی هستند که می‌توانند ساختار پپتیدها و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهند (Ashaolu Le, & Suttikhana, 2023). از این‌رو، بخشی از این پژوهش، پایداری پروتئین‌های هیدرولیز شده هسته زیتون (تولید شده تحت شرایط بهینه با آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین) در برابر طیف وسیعی از pH، تیمارهای حرارتی مختلف، چرخه‌های انجماد-ذوب و در طول دوره نگهداری در دماهای محیط و یخچال مورد ارزیابی دقیق قرار گرفت. pH محیط یکی از تعیین‌کننده‌ترین عوامل در پایداری و حالیت پروتئین‌ها و پپتیدها است. تغییرات pH می‌تواند با تغییر بار خالص مولکول‌ها و ایجاد نیروهای جاذبه یا دافعه الکترواستاتیک، منجر به تجمع، رسوب و یا حتی هیدرولیز بیشتر پپتیدها شود. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی معمولاً دارای پایداری خوبی در محدوده وسیعی از pH هستند (Wang, Luo, & Sun, 2021). در مقایسه با پروتئین‌های طبیعی، بسیاری از پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌دلیل وزن مولکولی پایین‌تر، نداشتن ساختارهای سوم و چهارم پیچیده و انعطاف‌پذیری بیشتر، در برابر تغییرات pH مقاومت بالاتری از خود نشان می‌دهند. از آنجا که این پپتیدها فاقد برهم‌کنش‌های ضعیف مسئول حفظ ساختار فضایی پروتئین‌ها (مانند پیوندهای هیدروژنی، برهم‌کنش‌های آب‌گریز و یونی) هستند، تغییرات pH معمولاً موجب دناتوره شدن آن‌ها نمی‌شود. با این حال، پایداری آن‌ها به توالی اسیدهای آمینه، وزن مولکولی و شرایط محیطی وابسته است و در pHهای بسیار اسیدی یا بسیارقلیایی ممکن است برخی تغییرات شیمیایی، از جمله هیدرولیز یا تغییر در بار الکتریکی، بر فعالیت زیستی آن‌ها اثر بگذارد (Rivero-Pino, 2023). انجماد یک روش رایج برای نگهداری طولانی‌مدت مواد غذایی و ترکیبات زیست‌فعال است. با این حال، چرخه‌های انجماد و ذوب می‌تواند تنش‌های فیزیکی شدیدی به سیستم‌های پروتئینی وارد کنند. تشکیل کریستال‌های یخ در حین انجماد می‌تواند منجر به تخریب ساختار، واسرشتگی و در نهایت تجمع پروتئین‌ها و پپتیدها شود. همچنین، در طی فرآیند ذوب، غلظت موضعی املاح افزایش یافته و احتمال واکنش‌های شیمیایی نامطلوب بالا می‌رود (Adjonu, Doran, Torley, & Agboola, 2023). پایداری در طول زمان یکی از مهم‌ترین معیارها برای تجاری‌سازی هر محصول غذایی یا دارویی است. پروتئین‌های هیدرولیز شده در طول نگهداری ممکن

است دچار تغییرات شیمیایی و فیزیکی متعددی شوند. واکنش‌های اکسیداسیون (به‌ویژه اکسیداسیون اسیدهای آمینه گوگرددار مانند متیونین و سیستئین)، واکنش میلارد (در حضور قندهای احیاکننده)، تجمع (آگرگاسیون) پپتیدها از طریق پیوندهای هیدروفوبیک یا دی‌سولفیدی، و جذب رطوبت از محیط از جمله مهم‌ترین تغییراتی هستند که می‌توانند در طول نگهداری رخ دهند. دمای نگهداری نیز نقش کلیدی در سرعت این تغییرات ایفا می‌کند (Roy, Ullah, Alam, & Islam, 2021).

اگرچه در سال‌های اخیر مطالعاتی درباره تولید پپتیدهای زیست‌فعال از پروتئین هسته زیتون منتشر شده است، این مطالعات عمدتاً بر ارزیابی فعالیت‌های زیستی هیدرولیزات‌های حاصل از تعداد محدودی آنزیم، به‌ویژه آلکالاز، و شناسایی پپتیدهای حاصل متمرکز بوده‌اند. با این حال، اطلاعات محدودی درباره مقایسه عملکرد آنزیم‌هایی با اختصاصیت متفاوت، مانند آلکالاز و تریپسین، در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین هسته زیتون وجود دارد. همچنین، پایداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های حاصل در شرایط مختلف فرآوری و نگهداری، از جمله تغییرات pH، تیمارهای حرارتی، چرخه‌های انجماد-ذوب و نگهداری، به‌طور جامع بررسی نشده است. از این رو، پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی تولید هیدرولیزات‌های پروتئینی هسته زیتون با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و تریپسین، مقایسه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های حاصل و ارزیابی پایداری آن‌ها در شرایط مختلف فرآوری و نگهداری انجام شد تا بخشی از خلأهای موجود در زمینه توسعه ترکیبات زیست‌فعال حاصل از این محصول جانبی ارزشمند را برطرف کند.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی نمونه و چربی‌گیری

هسته زیتون (رقم زر) از بازار گرگان تهیه و پس از خشک شدن نسبی، به پودر یکنواخت تبدیل گردید. چربی نمونه با استفاده از هگزان و طی ۲۴ ساعت با نسبت ۱:۱۰ در دمای اتاق ۵ بار متوالی بر اساس روش (AOAC 1990) استخراج شد. پودر چربی‌گیری شده پس از تبخیر حلال، مجدداً آسیاب و با الک مش ۵۰ غربال گردید و تا زمان استخراج پروتئین در ۱۸- درجه سانتی‌گراد ذخیره شد (Farzanfar, Mahoonak, Ghorbani, Ghaboos, & Kaveh, 2025).

فرآیند استخراج پروتئین

پودر چربی‌گیری شده با آب مقطر به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) مخلوط شد و pH سوسپانسیون با استفاده از محلول هیدروکسید سدیم ۱ نرمال به ۱۱ تنظیم گردید تا حلالیت پروتئین به حداکثر برسد پس از یک ساعت هم‌زدن مداوم در دمای اتاق، سوسپانسیون در $600 \times g$ و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (Z36HK, HERMLE, Germany) شد. فاز رویی جمع‌آوری و pH آن با استفاده از اسید کلریدریک ۱ نرمال به ۴ (نقطه ایزوالکتریک) رسانده شد تا پروتئین رسوب کند. سپس رسوب پروتئینی تحت همان شرایط سانتریفیوژ بازیابی شد، با آب مقطر سرد دوبار با نسبت ۱:۵ شسته شد تا نمک‌ها و سایر ترکیبات محلول حذف شوند و در نهایت به وسیله خشک‌کن انجمادی (FDB-5503, Operon, South Korea) خشک شد (Farzanfar et al., 2025). لازم به ذکر می‌باشد بازده استخراج پروتئین از پودر هسته زیتون ۱۵ درصد و میزان خلوص آن ۲۰ درصد بود.

هیدرولیز آنزیمی

ایزوله پروتئینی با غلظت ۵٪ (وزنی/حجمی) در بافر تریس HCl- با pH مناسب آنزیم (۸ برای آلکالاز (EC 3.4.21.62) L)، تولیدشده از *Bacillus licheniformis* با فعالیت ۲/۹۷۲ U/mL و ۷ برای تریپسین (EC 3.4.21.4) استخراج‌شده از پانکراس، با فعالیت $10,000 \leq$ (BAEE units mg^{-1} protein) حل گردید. آنزیم (Sigma-Aldrich) (St. Louis, MO, USA) در سه سطح (نسبت به وزن پروتئین) مطابق جدول ۱ افزوده شد. فرآیند در شیکر انکوباتور با سرعت ۲۰۰ دور بر دقیقه و در دماهای ۵۰ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد (به ترتیب برای آلکالاز و تریپسین) به مدت ۳۰ تا ۲۱۰ دقیقه صورت پذیرفت. جهت توقف واکنش، مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد حرارت دید در نهایت، پس از سانتریفیوژ ۵۰۰۰ g به مدت ۳۰ دقیقه، سوپرناتانت توسط خشک‌کن انجمادی خشک شد و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد بسته‌بندی شد (Farzanfar et al., 2025).

طراحی آزمایش و بهینه‌سازی

به‌منظور شناسایی شرایط بهینه هیدرولیز، از طرح مرکب مرکزی (CCD) در قالب روش سطح پاسخ (RSM) استفاده گردید. متغیرهای مستقل شامل غلظت آنزیم (۱-۳٪) و زمان واکنش (۲۱۰-۳۰ دقیقه) و پاسخ‌های مورد سنجش عبارت بودند از: فعالیت مهار DPPH، قدرت احیاکنندگی، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل.

جدول ۱- طرح آزمایش مرکب مرکزی و پاسخ متغیرهای وابسته به متغیر مستقل در هیدرولیز پروتئین هسته زیتون توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین

Table 1- Central composite design layout and dependent variable responses as a function of independent variables in hydrolysis of olive seeds protein by alcalase and trypsin

تیماها	زمان هیدرولیز	نسبت آنزیم به سوبسترا
Treatment	Hydrolysis time (min)	Enzyme-to-substrate (%)
1	56.36	1.29
2	183.64	1.29
3	183.64	2.70
4	120	2
5	120	1
6	120	2
7	30	2
8	56.36	2.70
9	120	3
10	120	2
11	210	2
12	120	2
13	120	2

روی با آب مقطر و محلول کلرید فریک (۱٪) مخلوط شد و جذب نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری گردید. افزایش جذب در ۷۰۰ نانومتر به‌عنوان شاخص افزایش قدرت احیاکنندگی نمونه در نظر گرفته شد.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر اساس روش فسفومولیدنوم مطابق با فرزان فر و همکاران (Farzanfar et al., 2025) تعیین شد. بدین منظور، مقدار معینی از نمونه با معرف فسفومولیدنوم مخلوط و به‌مدت ۹۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها تا دمای اتاق، جذب آن‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر اساس میزان احیای مولیدن (VI) به مولیدن (V) بیان گردید.

آزمون‌های پایداری

پایداری پروتئین‌های هیدرولیز شده در شرایط محیطی مختلف بر اساس روش لی و همکاران (Li et al., 2015) ارزیابی شد: پایداری حرارتی: حرارت‌دهی محلول نمونه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ تا ۷۵ دقیقه. پایداری به pH: تنظیم pH نمونه‌ها در محدوده ۳ تا ۸ به‌مدت ۳۰ دقیقه و سپس خنثی‌سازی. پایداری نگهداری: نگهداری نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ روز در سه شرایط: فریزر (۱۸-)، یخچال (۴) و محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد). سپس پایداری هر تیمار توسط فعالیت آنتی‌اکسیدانی (قدرت احیاکنندگی و ظرفیت کل) سنجیده شد.

روش آماری

به‌منظور بهینه‌سازی فرآیند از نظر خواص آنتی‌اکسیدانی از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای

درجه هیدرولیز (DH)

درجه هیدرولیز با اندازه‌گیری پروتئین محلول در ۲۰٪ TCA نسبت به کل پروتئین به روش فرزان فر و همکاران (Farzanfar et al., 2025) تعیین شد. غلظت پروتئین با روش بردفورد (He, 2011) اندازه‌گیری گردید. برای اندازه‌گیری پروتئین محلول، پروتئین هیدرولیزشده و محلول ۲۰٪ TCA با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها در $10000 \times g$ به‌مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. غلظت پروتئین موجود در فاز رویی با روش بردفورد اندازه‌گیری و درجه هیدرولیز بر اساس نسبت پروتئین محلول در TCA به کل پروتئین نمونه محاسبه شد.

مهار رادیکال DPPH

بر اساس روش فرزان فر و همکاران (Farzanfar et al., 2025)، حجم‌های مساوی از محلول نمونه (۴۰ mg/mL) و محلول DPPH (0.1 mM)، تهیه‌شده در متانول با نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط شدند. پس از اختلاط، نمونه‌ها به‌مدت ۶۰ دقیقه در تاریکی و دمای اتاق انکوبه شدند و سپس جذب آن‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (Jenway, England, ۷۶۱۵) اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال DPPH بر اساس اختلاف جذب نمونه و شاهد محاسبه گردید.

قدرت احیاکنندگی

بر اساس روش نوشی و همکاران (Nooshi Manjili, & Sadeghi Mahoonak, 2022)، مقدار معینی از نمونه با بافر فسفات (۰/۲ M، pH 6.6) و محلول ۱٪ فری‌سیانید پتاسیم مخلوط و به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس محلول ۱۰٪ TCA افزوده و نمونه‌ها سانتریفیوژ شدند. مقدار مشخصی از فاز

ترکیب اسیدهای آمینه برقرار است، مشاهده می‌شود (Islam et al., 2022; Xu et al., 2023; Hwang et al., 2024a). این موضوع تأکید می‌کند که در هیدرولیز با آلکالاز، تنظیم هم‌زمان شدت و مدت واکنش برای دستیابی به پپتیدهای زیست‌فعال ضروری است و افزایش یک متغیر به‌تنهایی نمی‌تواند حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تضمین کند. این یافته با نتایج لاکولدیلوک و سرینکارین (Sarrinkarin, 2017 Laokuldilok, & Martinez et al., 2023) بر روی پروتئین سبوس برنج و مارتینز و همکاران (Martinez et al., 2023) بر روی پروتئین ریه گاو که هر دو با آلکالاز هیدرولیز شده بودند، همخوانی کامل دارد.

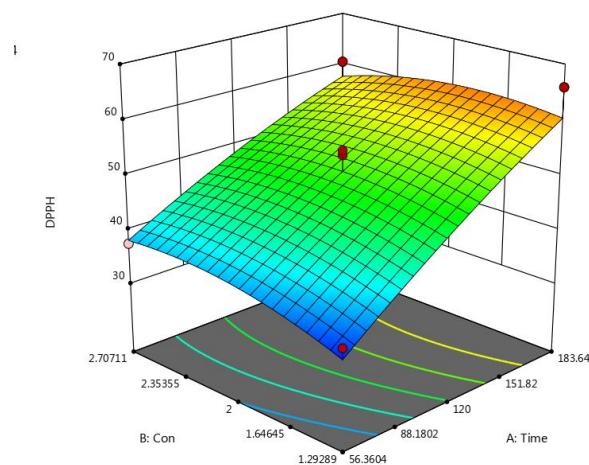
شکل ۲ نمودار سه بعدی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوبسترا (پروتئین هسته زیتون) بدست آمده از بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار Design Expert را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از تحلیل سطح پاسخ (RSM) نشان داد که زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون دارند. همان‌گونه که در نمودار سطح پاسخ و کانتور مشاهده می‌شود، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش زمان هیدرولیز از مقادیر پایین به سمت مقادیر متوسط افزایش یافته و در ادامه، در زمان‌های طولانی‌تر، روند افزایشی کاهش یافته و به سمت یک مقدار بیشینه میل می‌کند. این رفتار نشان‌دهنده وجود یک محدوده بهینه برای زمان هیدرولیز در فرآیند هیدرولیز آنزیمی است. اثر نسبت آنزیم به سوبسترا نیز روند افزایشی مشخصی را تا محدوده‌ای معین نشان داد، به‌طوری‌که افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد. با این حال، در مقادیر بالاتر این نسبت، افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی محدود شده و شیب تغییرات کاهش می‌یابد. در نتیجه، افزایش بیش از حد شدت هیدرولیز می‌تواند منجر به تولید پپتیدهای بسیار کوتاه یا اسیدهای آمینه آزاد شود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتری نسبت به پپتیدهای کوتاه و ساختاریافته دارند. نمودار کانتور نسبتاً متقارن و شکل محدب سطح پاسخ نشان‌دهنده وجود اثر متقابل معنی‌دار بین زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا است، به‌گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ناحیه‌ای حاصل شده است که هر دو متغیر در مقادیر متوسط تا بالا قرار دارند. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش مقدار آنزیم لزوماً منجر به بهبود فعالیت زیستی نمی‌شود و وجود یک نسبت بهینه ضروری است. همچنین انحناهای سطح پاسخ بیانگر وجود اثر متقابل معنی‌دار بین زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا است، به‌گونه‌ای که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تنها در شرایطی حاصل می‌شود که هر دو متغیر به‌طور هم‌زمان در محدوده بهینه قرار داشته باشند (Bartolomei et al., 2022).

متغیر مستقل غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز در پنج سطح استفاده شد. پاسخ‌های مورد بررسی فعالیت مهار رادیکال DPPH، قدرت آنتی‌اکسیدانی کل و ظرفیت احیاء‌کنندگی آهن بود. به‌منظور آنالیز داده‌ها و بررسی اطلاعات حاصل از آزمایش از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. جهت تعیین اختلاف بین میانگین داده‌ها پس از آنالیز واریانس (ANOVA)، از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح ۹۵ درصد استفاده گردید. تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده گردید. تمامی آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

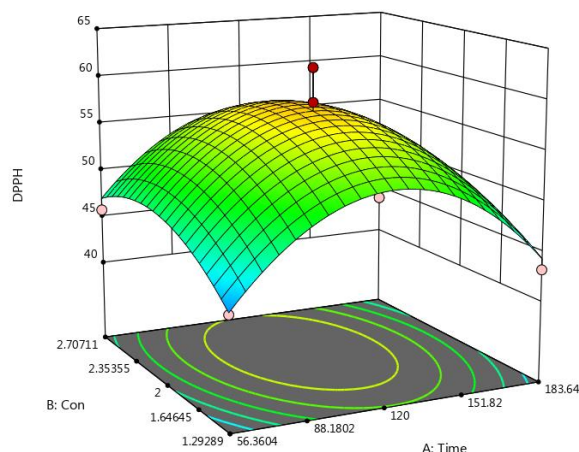
نتایج و بحث

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

شکل ۱ نمودار سه بعدی نتایج حاصل از تحلیل سطح پاسخ (RSM) نشان داد که زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا تأثیر معنی‌داری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون حاصل از هیدرولیز با آنزیم آلکالاز دارند. مطابق نمودار سه‌بعدی، افزایش زمان هیدرولیز از مقادیر پایین به سمت مقادیر بالاتر، منجر به افزایش قابل توجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد؛ با این حال، این روند افزایشی در زمان‌های طولانی‌تر به سمت حالت پایدار میل می‌کند. چنین رفتاری نشان می‌دهد که اگرچه افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش درجه هیدرولیز و آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود، اما در شرایط شدیدتر و تجزیه پپتیدهای فعال به اسیدهای آمینه آزاد افزایش می‌یابد که می‌تواند منجر به توقف یا کاهش اثر آنتی‌اکسیدانی شود (Fathi et al., 2022). از سوی دیگر، افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا تا محدوده‌ای مشخص باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردید که این موضوع را می‌توان به افزایش درجه هیدرولیز، افزایش تعداد پیوندهای پپتیدی شکسته‌شده و آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال با وزن مولکولی پایین‌تر نسبت داد. نتایج درجه هیدرولیز نیز نشان داد که با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، میزان هیدرولیز تا رسیدن به شرایط بهینه افزایش یافت که این امر با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی همسو بود. با این حال، در نسبت‌های بالاتر آنزیم به سوبسترا، اگرچه درجه هیدرولیز همچنان افزایش یافت، اما فعالیت آنتی‌اکسیدانی روند افزایشی خود را از دست داد و به حالت تقریباً ثابت یا کاهشی رسید. این رفتار نشان می‌دهد که هیدرولیز بیش از حد می‌تواند منجر به تولید پپتیدهای بسیار کوتاه یا اسیدهای آمینه آزاد شود که توانایی کمتری در انتقال الکترون و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد نسبت به پپتیدهای با طول متوسط دارند؛ بنابراین، بیشینه فعالیت آنتی‌اکسیدانی الزاماً در بیشترین درجه هیدرولیز حاصل نمی‌شود، بلکه در یک درجه هیدرولیز بهینه که تعادل مناسبی بین اندازه پپتیدها و



شکل ۱- نمودار سه بعدی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم آلکالاز به سوپسترا
Fig. 1. Three-dimensional response surface plot of DPPH radical scavenging activity as a function of hydrolysis time and alcalase-to-substrate ratio



شکل ۲- نمودار سه بعدی درصد مهار رادیکال آزاد DPPH وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوپسترا
Fig. 2. Three-dimensional response surface plot of DPPH radical scavenging activity as a function of hydrolysis time and trypsin-to-substrate ratio

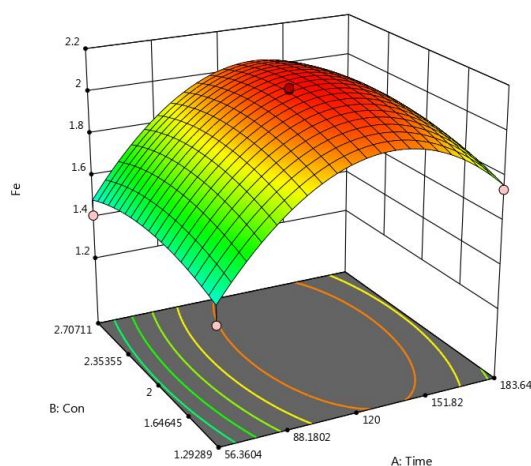
میزان احیا یون آهن

شکل ۳ نمودار سه بعدی میزان احیا یون آهن وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم آلکالاز به سوپسترا بدست آمده از بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار Design Expert را نشان می‌دهد. سطح سه‌بعدی رسم‌شده نشان داد که فعالیت احیاکنندگی آهن تابع درجه دوم از زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوپسترا است. با افزایش هم‌زمان زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا از مقادیر کم به مقادیر میانی، مقدار قدرت احیا

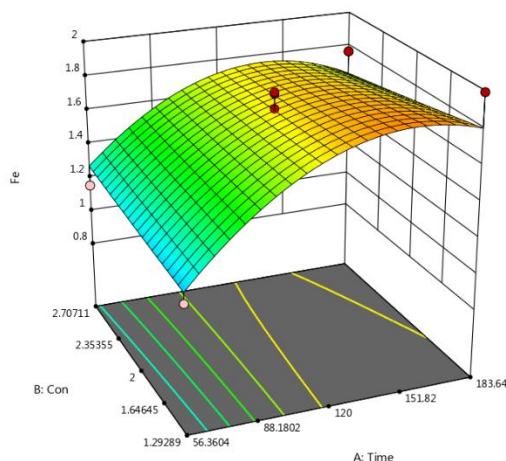
به‌طور معنی‌داری افزایش یافت و سطح پاسخ به‌صورت یک گنبد با قله مشخص در ناحیه میانی ظاهر شد، در حالی که در زمان‌ها و غلظت‌های بالاتر، پاسخ کاهش پیدا کرد. در زمان‌های طولانی‌تر و غلظت‌های بالاتر، به‌علت شکسته شدن بیشتر زنجیره‌ها و تبدیل پپتیدهای فعال به قطعات بسیار کوتاه یا اسیدهای آمینه منفرد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد و یک نقطه بهینه مشخص برای هر دو عامل شکل می‌گیرد (Bartolomei et al., 2022).

پاسخ خمیده و نسبتاً مسطح شد که می‌تواند ناظر بر رسیدن سیستم به درجه هیدرولیز بهینه برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان باشد (Fathi *et al.*, 2022). از دیدگاه مکانیسمی، افزایش اولیه قدرت احیاکنندگی یون آهن با افزایش زمان و نسبت آنزیم را می‌توان به تولید تدریجی پپتیدهای کوتاه‌تر و غنی از اسیدهای آمینه آروماتیک و هیدروفوب نسبت داد که توان بالایی در اهدا الکترون و احیای یون Fe^{3+} به Fe^{2+} دارند (Mardani *et al.*, 2023). در مراحل پیشرفته‌تر هیدرولیز، اگرچه در نمودار حاضر کاهش واضحی در انتهای بازه دیده نمی‌شود، اما کاهش شیب سطح نشان می‌دهد که احتمالاً بخش عمده پیوندهای حساس شکسته شده و تجمع بیش از حد پپتیدهای بسیار کوتاه یا اسیدآمینه‌های آزاد می‌تواند از افزایش بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلوگیری کند. وجود سطح پاسخ کوادراتیک با ناحیه بهینه مشخص نشان می‌دهد که استفاده از روش سطح پاسخ، ابزار مناسبی برای پیش‌بینی و کنترل شرایط فرآیندی تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از هسته زیتون است، همان‌گونه که برای سایر منابع پروتئینی گیاهی گزارش شده است (Nooshi & Sadeghi Mahoonak, 2024).

شکل ۴ نمودار سه بعدی میزان احیا یون آهن وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوپسترا بدست آمده از بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار Design Expert را نشان می‌دهد. نتایج حاصل از طراحی آزمایش نشان داد که فعالیت احیاکنندگی آهن هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون در اثر افزایش زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوپسترا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. سطح سه‌بعدی ترسیم‌شده برای پاسخ، روندی کوادراتیک را نشان داد که در آن با افزایش زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوپسترا، مقدار قدرت احیاکنندگی آهن ابتدا با شیب نسبتاً زیاد افزایش یافته و سپس در ناحیه‌ای با زمان‌های بالاتر و سطوح متوسط تا بالای آنزیم به یک حالت پایدار نزدیک می‌شود. این الگو بیانگر آن است که در محدوده طراحی‌شده، با وجود افزایش عوامل فرآیندی، سیستم به نقطه یا ناحیه بهینه نزدیک شده و افزایش بیشتر زمان یا آنزیم، بهبود چشمگیری در پاسخ ایجاد نمی‌کند. در بخش‌هایی از سطح که زمان و غلظت آنزیم در سطوح پایین قرار داشتند، شیب سطح پاسخ تندتر بود که نشان‌دهنده حساسیت زیاد قدرت احیاکنندگی به تغییرات این دو عامل در ابتدای فرآیند است. در مقابل، در زمان‌های طولانی‌تر و مقادیر بالاتر نسبت آنزیم به سوپسترا، سطح



شکل ۳- نمودار سه بعدی میزان احیا یون آهن وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم آلكالاز به سوپسترا
Fig. 3. Three-dimensional response surface plot of ferric reducing power as a function of hydrolysis time and alcalase -to-substrate ratio



شکل ۴- نمودار سه بعدی میزان احیا یون آهن وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوبسترا
Fig. 4. Three-dimensional response surface plot of ferric reducing power as a function of hydrolysis time and trypsin-to-substrate ratio

هیدرولیز بهینه و اشباع تولید پپتیدهای فعال را تأیید می‌کند. از دیدگاه مکانیزمی، افزایش TAC به رهاسازی پپتیدهای کوتاه غنی از گروه‌های کاهنده (SH- از سیستمین، فنلی از تیروزین/تریپتوفان) نسبت داده می‌شود (Fathi et al., 2022).

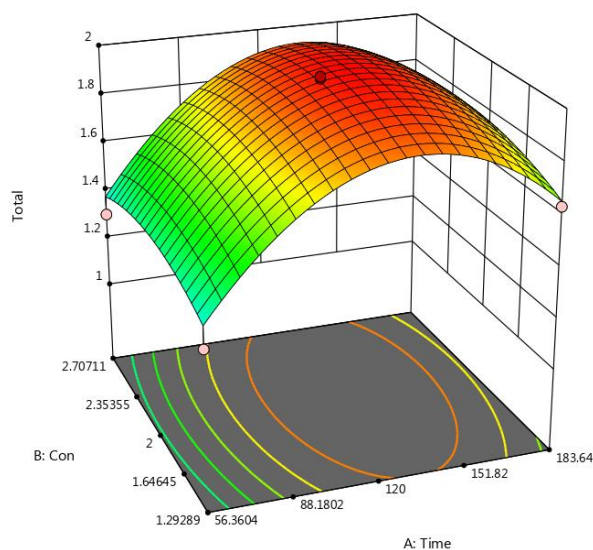
پاسخ‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه بهینه تولید شده

نتایج نشان داد که هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های الکالاز و تریپسین، به‌طور معنی‌داری موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی شد که این افزایش به‌شدت تحت تأثیر شرایط فرآیندی از جمله زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا قرار داشت. تحلیل سطح پاسخ (RSM) نشان داد اثر متغیرهای فرآیندی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی خطی نبوده و در تمامی آزمون‌ها، وجود یک محدوده بهینه برای زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوبسترا مشاهده شد. پاسخ‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه بهینه تولید شده در جدول ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد تفاوت معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مدل بهینه و شرایط آزمایشگاهی وجود ندارد (جدول ۳). هیدرولیزات حاصل از الکالاز در تمامی شرایط، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به تریپسین نشان داد. طبق نتایج مقادیر بهینه برای آنزیم الکالاز زمان ۱۵۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و برای آنزیم تریپسین زمان ۱۳۹ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ می‌باشد. انتخاب این شرایط بر مبنای حداکثرسازی پاسخ‌های مورد بررسی شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت احیاکنندگی آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH و در عین حال حفظ مقادیر مطلوب سایر پاسخ‌ها انجام شد. به عبارت دیگر، شرایط بهینه در نقطه‌ای انتخاب شد که به طور هم‌زمان بیشترین مقدار مطلوبیت برای تمامی پاسخ‌ها حاصل گردید.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

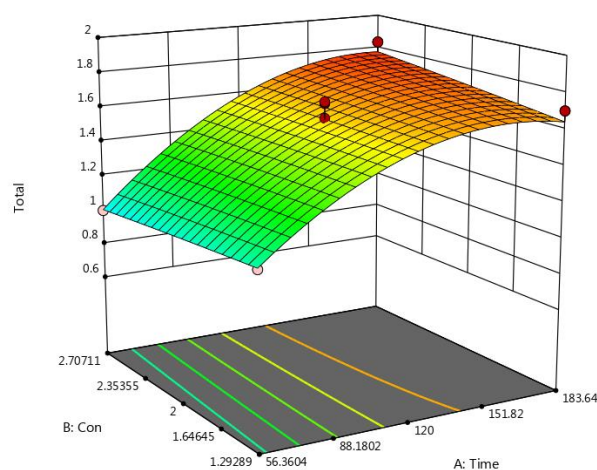
شکل ۵ نمودار سه بعدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم الکالاز به سوبسترا بدست آمده از بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار Design Expert را نشان می‌دهد. سطح سه‌بعدی به‌دست‌آمده الگویی کوادراتیک گنبدی‌شکل با قله مرکزی را نشان داد. در این سطح، با افزایش زمان هیدرولیز (A: 30-186 دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (B: 1.6-2.9%) TAC از مقادیر پایین (۱.۰-۱.۳، رنگ‌های سرد) به قله‌ای برجسته (۱.۸-۲.۰، رنگ قرمز) در مرکز) در ناحیه میانی (۹۰-۱۲۰ دقیقه، B ~ 2.3%) رسید و سپس در حاشیه‌ها (زمان/غلظت بالا) به شدت افت کرد و به ~ ۱.۲ بازگشت. این مطالعه با پژوهش بارتولومئی و همکاران (Bartolomei et al., 2022) و استیو و همکاران (Esteve et al., 2015) مطابقت دارد.

شکل ۶ نمودار سه بعدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوبسترا بدست آمده از بررسی داده‌ها توسط نرم‌افزار Design Expert را نشان می‌دهد. سطح سه‌بعدی به‌دست‌آمده از روش سطح پاسخ برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (TAC، آزمون احیای مولیبدات) هیدرولیزات پروتئین هسته زیتون با تریپسین، روندی کوادراتیک صعودی را نشان داد. در این سطح، افزایش هم‌زمان زمان هیدرولیز (از حدود ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S، از حدود ۱.۳ تا ۲.۷٪) موجب بهبود پاسخ از مقادیر پایین (۰.۸، رنگ‌های سرد) به مقادیر بالا (۱.۷-۱.۸، رنگ‌های گرم) شد و در ناحیه زمان‌های طولانی‌تر و سطوح متوسط تا بالای آنزیم به شبه‌پایداری رسید. شیب تند اولیه سطح، حساسیت بالای TAC به تغییرات عوامل در مراحل آغازین هیدرولیز را نشان می‌دهد، در حالی که خمیدگی و مسطح شدن در انتها، رسیدن به درجه



شکل ۵- نمودار سه بعدی فعالیت آنتی اکسیدانی کل وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم آلكالاز به سوبسترا

Fig. 5. Three-dimensional response surface plot of total antioxidant capacity (TAC) as a function of hydrolysis time and alcalase-to-substrate ratio



شکل ۶- نمودار سه بعدی فعالیت آنتی اکسیدانی کل وابسته به متغیرهای زمان و نسبت آنزیم تریپسین به سوبسترا

Fig. 6. Three-dimensional response surface plot of total antioxidant capacity (TAC) as a function of hydrolysis time and trypsin-to-substrate ratio

جدول ۲- پاسخ‌های فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه بهینه تولید شده در شرایط آزمایشگاه

Table 2- Antioxidant activity responses of the optimal hydrolysate produced under laboratory conditions

آزمون‌ها Tests	درجه هیدرولیز Degree of hydrolysis	فعالیت آنتی اکسیدانی کل Total antioxidant capacity (Abs. 695nm)	میزان احیا یون آهن Ferric reducing power (Abs. 700nm)	DPPH درصد مهار رادیکال آزاد DPPH radical scavenging activity (%)
نمونه Sample				
هیدرولیز شده توسط آلکالاز (در آزمایشگاه) Alcalase hydrolysate (Experimental)	20.4±2.2	1.91±0.1a	2.01±0.1a	56.21±5.9a
هیدرولیز شده توسط آلکالاز (پیش بینی شده) Alcalase hydrolysate (Predicted)		1.96±0.2a	2.07±0.3a	56.96±6.2a
هیدرولیز شده توسط تریپسین (در آزمایشگاه) Trypsin hydrolysate (Experimental)	18.3±1.8	1.69±0.1a	1.75±0.2a	55.84±4.1a
هیدرولیز شده توسط تریپسین (پیش بینی شده) Trypsin hydrolysate (Predicted)		1.67±0.1a	1.79±0.4a	56.04±5.6a

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین نتایج آزمایشگاهی و مقادیر پیش‌بینی‌شده توسط نرم‌افزار ($P < 0.05$) و حروف یکسان نشان‌دهنده عدم اختلاف معنی‌دار هستند.

*Within each row, different superscript letters indicate a significant difference between the experimental and software-predicted values ($P < 0.05$), while the same letters indicate no significant difference.

جدول ۳- نتایج تحلیل واریانس (ANOVA) و شاخص‌های برازش مدل درجه دوم برای پاسخ‌های حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته زیتون با آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین

Table 3- Analysis of variance (ANOVA) and goodness-of-fit statistics of the quadratic models for response variables of olive pit protein hydrolysates produced using Alcalase and Trypsin

پاسخ Response	مدل منتخب Model	C.V%	Adjusted R ²	R ²	Lack of Fit	P- value	F- value
مهاررادیکال آزاد DPPH (آلکالاز) DPPH Radical Scavenging Activity (Alcalase)	Quadratic	8.8	0.831	0.9	Not significant	0.002	12.91
قدرت احیاکنندگی آهن (آلکالاز) Ferric Reducing Power (Alcalase)	Quadratic	3.86	0.948	0.97	Not significant	0.0001	45.32
فعالیت آنتی اکسیدانی کل (آلکالاز) Total Antioxidant Activity (Alcalase)	Quadratic	4.1	0.94	0.98	Not significant	0.0001	45.3
مهاررادیکال آزاد DPPH (تریپسین) DPPH Radical Scavenging Activity (Trypsin)	Quadratic	4.09	0.88	0.93	Not significant	0.0006	19.29
قدرت احیاکنندگی آهن (تریپسین) Ferric Reducing Power (Trypsin)	Quadratic	12.21	0.66	0.8	Not significant	0.021	5.66
فعالیت آنتی اکسیدانی کل (تریپسین) Total Antioxidant Activity (Trypsin)	Quadratic	9.0	0.84	0.9	Not significant	0.0017	13.76

بنیادین از تأثیر pH بر برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی بین باقی‌مانده‌های اسید آمینه باردار همسو است. در مقادیر پایین pH (۳ تا ۵)، غلظت بالای یون‌های H^+ موجب پروتونه شدن گروه‌های یونی موجود در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه شده و در نتیجه بار خالص پروتئین و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی و پل‌های نمکی تغییر می‌کند. این تغییرات سبب افزایش فشرده‌گی ساختار یا کاهش بازشدگی پروتئین شده و دسترسی باقی‌مانده‌های فعال آنتی اکسیدانی به

پایداری هیدرولیزات در شرایط مختلف فرآیند (حرارت، انجماد و pH)

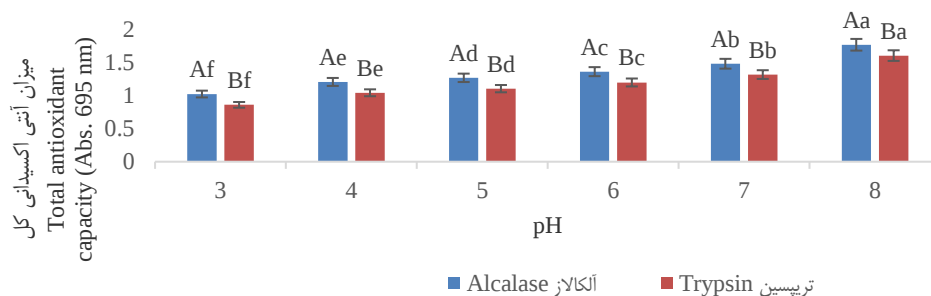
پایداری در محدوده pH = (3-8)

آنتی اکسیدانی کل

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده رفتار وابسته به pH را نشان داد و با افزایش pH از ۳ به ۸ به‌طور تدریجی افزایش یافت. این مشاهده با درک

زنجیره‌های اکسیداسیون را خاتمه دهند. علاوه بر این، قطعات پپتیدی کوچک‌تر تولید شده توسط آلکالاز تمایل به حلالیت و تحرک بیشتری دارند و برهمکنش آنها با گونه‌های فعال اکسیژن را تسهیل می‌کنند (Pérez-Gálvez et al., 2024). در مقابل، تریپسین که به‌طور اختصاصی در سمت کربوکسیل باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین برش می‌زند، پروفایل پپتیدی متفاوتی تولید می‌کند که ممکن است غنی از اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک نباشد. در نتیجه، تفاوت در ترکیب پپتیدی و طول زنجیره بین هیدرولیزات‌های حاصل از آلکالاز و تریپسین به‌طور مستقیم بر پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آنها تأثیر می‌گذارد (Pérez-Gálvez et al., 2024; Ahmadi, Kadivar, & Shahedi, 2007). افزایش مشاهده شده در ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با افزایش pH (از ۳ به ۸) از نظر مکانیکی با بهبود حلالیت و انعطاف‌پذیری ساختاری هیدرولیزات‌های پروتئینی در شرایط قلیایی مرتبط است. در pH پایین، پروتئین شدن باقی‌مانده‌های اسید آمینه اسیدی (مانند گلوتامیک و آسپارتیک اسید) و بار خالص مثبت پپتیدها ممکن است تجمع بین مولکولی را از طریق جاذبه الکترواستاتیکی افزایش دهد و در نتیجه تعداد مکان‌های فعال برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را کاهش دهد. برعکس، در شرایط قلیایی (pH=۸-۷)، دیپروتونه شدن گروه‌های تیول (SH-) و گروه‌های هیدروکسیل فنولی، همراه با افزایش بار خالص منفی، دافعه الکترواستاتیکی بین زنجیره‌های پپتیدی را افزایش داده، از تجمع جلوگیری کرده و دسترسی به زنجیره‌های جانبی فعال آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشد (Liu et al., 2023). همکاران (Pérez-Gálvez et al., 2024) اثر نوع آنزیم و pH را بر ویژگی‌های ساختاری و عملکردی هیدرولیزات‌های پروتئین زیتون بررسی کردند. نتایج نشان داد هیدرولیز آنزیمی باعث تغییر توزیع وزن مولکولی پپتیدها و افزایش انعطاف‌پذیری ساختار پروتئین می‌شود و pH نیز نقش مهمی در عملکرد هیدرولیزات‌ها دارد. این تغییرات موجب بهبود خواص عملکردی و قابلیت استفاده از پروتئین‌های زیتون در فرمولاسیون مواد غذایی شد.

رادیکال‌های آزاد را محدود می‌کند. با افزایش pH به سمت شرایط خنثی و کمی قلیایی (۶ تا ۸)، دی‌پروتونه شدن گروه‌های اسیدی، افزایش دافعه الکترواستاتیکی بین گروه‌های هم‌بار و تغییر آرایش فضایی پروتئین، موجب بازتر شدن ساختار و افزایش در معرض قرار گرفتن باقی‌مانده‌های آروماتیک و آبگریز مانند تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلنین می‌شود که نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و انتقال الکترون دارند (Pérez-Gálvez et al., 2024). علاوه بر این، در دسترس بودن بیشتر گروه‌های اهداکننده پروتون (مانند OH و NH₂) در pH بالاتر، انتقال الکترون و اهدای هیدروژن را برای خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد تسهیل می‌کند. بنابراین، افزایش وابسته به pH در فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده شده به اثرات ترکیبی بازشدگی ساختاری، افزایش قرار گرفتن باقی‌مانده‌های فعال و بهبود ظرفیت اهدای الکترون در شرایط قلیایی نسبت داده می‌شود (Esteve et al., 2015). مقایسه بین دو آنزیم پروتئولیتیک آلکالاز و تریپسین مورد استفاده برای هیدرولیز پروتئین، تفاوت‌های آشکاری را در کارایی آنها در آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی نشان داد. بر اساس منابع علمی، اگرچه تمام هیدرولیزات آنزیمی به‌طور کلی دارای خواص آنتی‌اکسیدانی هستند، اما آلکالاز به‌طور مداوم هیدرولیزاتی با بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی در میان پروتئین‌های مختلف تولید می‌کند. این برتری به ویژگی بستر گسترده‌تر آلکالاز نسبت داده می‌شود، به‌ویژه تمایل آن به شکستن پیوندهای پپتیدی در مجاورت باقی‌مانده‌های اسید آمینه آبگریز مانند فنیل‌آلنین، تیروزین، تریپتوفان، لوسین و والین. این اسیدهای آمینه خاص، هنگامی که به‌صورت آزاد یا به‌عنوان بخشی از پپتیدهای زنجیره کوتاه آزاد می‌شوند، به‌دلیل فعالیت قوی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و کلات‌کنندگی فلزات به خوبی شناخته شده‌اند (Mardani et al., 2023). حلقه‌های آروماتیک و زنجیره‌های جانبی آبگریز این باقی‌مانده‌ها می‌توانند به‌طور مؤثر الکترون اهدا کرده و الکترون‌های جفت‌نشده رادیکال‌های آزاد را پایدار کنند و در نتیجه



شکل ۷- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در محدوده pH ۳ تا ۸

*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح (P < 0.05) است.

Fig. 7. Total antioxidant capacity of hydrolyzed olive seeds protein in the pH range of 3 to 8

*Different letters indicate differences at the level (P>0.05).

احیاکنندگی آهن

همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده رفتار وابسته به pH را نشان داد و با افزایش pH از ۳ به ۸ به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. این یافته با درک مکانیسم آزمون بر پایه احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به یون‌های فرو (Fe^{2+}) توسط آنتی‌اکسیدان‌ها استوار می‌باشد، قابل توجیه است. در مقادیر پایین pH (۳ تا ۵)، غلظت بالای یون‌های H^+ می‌تواند باعث پروتونه شدن گروه‌های عاملی اهداکننده الکترون در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه (مانند گروه‌های هیدروکسیل تیروزین و گروه‌های تیول سیستئین) گردد و در نتیجه ظرفیت انتقال الکترون آن‌ها را کاهش دهد. همچنین، تحت شرایط اسیدی، ساختار پروتئین تمایل به حالت فشرده‌تر و تا خورده‌تری دارد که دسترسی به باقی‌مانده‌های اسید آمینه فعال آنتی‌اکسیدانی را محدود می‌سازد. با افزایش pH به سمت شرایط خنثی و قلیایی (۶ تا ۸)، دی‌پروتونه شدن گروه‌های هیدروکسیل فنولی و گروه‌های تیول رخ می‌دهد که این گروه‌ها به‌عنوان اهداکنندگان قوی الکترون عمل می‌کنند. علاوه بر این، در pH بالاتر، با تغییر آرایش فضایی پروتئین‌های هیدرولیز شده، باقی‌مانده‌های اسید آمینه آروماتیک و آبگریز بیشتری در معرض محیط قرار می‌گیرند. این باقی‌مانده‌ها، به‌ویژه تیروزین، تریپتوفان و سیستئین، به‌دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیک غنی از الکترون، قابلیت بالایی در احیای یون‌های فریک و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد دارند (Mardani et al., 2023). بنابراین، افزایش مشاهده شده در قدرت احیاکنندگی آهن با افزایش pH، نتیجه‌ای از اثرات ترکیبی بهبود دسترسی به گروه‌های اهداکننده الکترون، بازشدگی ساختاری و افزایش ظرفیت انتقال الکترون در شرایط قلیایی می‌باشد. بر اساس نتایج به‌دست آمده و گزارش‌های علمی موجود، هیدرولیزات حاصل از آنزیم آلکالاز عموماً قدرت احیاکنندگی آهن بالاتری نسبت به هیدرولیزات حاصل از تریپسین نشان می‌دهند. این تفاوت را می‌توان به ویژگی‌های زیرلایه‌ای متفاوت این دو آنزیم نسبت داد. آلکالاز، به‌عنوان یک آنزیم پروتئولیتیک با اختصاصیت بستر گسترده، تمایل بالایی به شکستن پیوندهای پپتیدی در مجاورت اسیدهای آمینه آبگریز مانند فنیل‌آلانین، تیروزین، تریپتوفان، لوسین و والین دارد. این اسیدهای آمینه، به‌دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیک و زنجیره‌های جانبی آبگریز، نقش کلیدی در فرآیند احیای یون‌های فریک و انتقال الکترون ایفا می‌کنند. در مقابل، تریپسین به‌طور اختصاصی در سمت کربوکسیل باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین برش ایجاد می‌کند که این اسیدهای آمینه قلیایی، برخلاف اسیدهای آمینه آروماتیک، توانایی چندان در احیای یون‌های فلزی و اهدای الکترون ندارند (Habinshuti et al., 2023). همچنین، تحقیقات دیگر نشان داده‌اند که پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر قدرت احیاکنندگی آهن

بالاتری از خود نشان می‌دهند، در حالی که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین عمدتاً ظرفیت کلات‌کنندگی فلزات بالاتری دارند. هیدرولیز با آلکالاز پپتیدهای کوتاه‌تری تولید می‌کند که انتهای کربوکسیل و آمینوی آزاد بیشتری دارند و گروه‌های عاملی اهداکننده الکترون (مانند $-COOH$ و $-NH_2$) را افزایش می‌دهد. از سوی دیگر، افزایش pH به سمت مقادیر قلیایی، ضمن دی‌پروتونه کردن این گروه‌های عاملی، باعث بازشدگی ساختاری پپتیدها شده و باقی‌مانده‌های اسید آمینه آروماتیک و آبگریز را در معرض محیط قرار می‌دهد. هنگامی که هیدرولیز توسط آلکالاز انجام می‌شود، پپتیدهای حاصل به‌طور طبیعی غنی از اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک هستند. بنابراین، در pH قلیایی، این پپتیدها نه تنها از نظر ترکیب آمینواسیدی مستعد احیای یون‌های فریک هستند، بلکه ساختار باز شده آن‌ها دسترسی بی‌واسطه این گروه‌های فعال را به سوبسترای واکنش (یون‌های Fe^{3+}) فراهم می‌کند. در مقابل، در نمونه‌های هیدرولیز شده با تریپسین که ترکیب آمینواسیدی متفاوتی دارند (غنی از اسیدهای آمینه قلیایی لیزین و آرژنین)، افزایش pH تأثیر کمتری بر قدرت احیاکنندگی دارد زیرا این اسیدهای آمینه فاقد حلقه‌های آروماتیک غنی از الکترون هستند که برای احیای یون‌های فریک ضروری می‌باشند (Hwang et al., 2024b). نتایج مشابهی توسط آشالو و همکاران (Ashaolu et al., 2023) گزارش شد که نشان دادند شرایط pH می‌تواند از طریق تغییر در یونیزاسیون گروه‌های عاملی، حالیت و دسترسی گروه‌های فعال پپتیدها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. همچنین ریورو پینو (Rivero-Pino, 2023) بیان کرد که پاسخ پپتیدهای زیست‌فعال به تغییرات pH به منبع پروتئین، ویژگی‌های ساختاری پپتیدها و شرایط فرآوری وابسته است؛ از این‌رو، اگرچه بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در pH‌های خنثی یا کمی قلیایی در برخی هیدرولیزات‌ها مشاهده شده است، این رفتار را نمی‌توان به تمامی پپتیدهای حاصل از منابع غذایی یا آنزیم‌های پروتئولیتیک تعمیم داد.

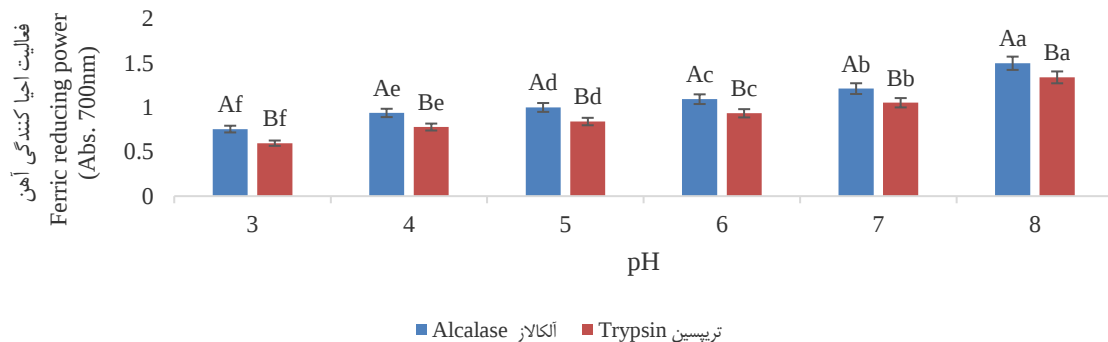
پایداری پروتئین هیدرولیز شده در دمای ۹۵ درجه

سانتی‌گراد

آنتی‌اکسیدانی کل

در این مطالعه، پایداری حرارتی هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون حاصل از دو آنزیم آلکالاز و تریپسین در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در بازه‌های زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۹). نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان حرارت‌دهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل هر دو هیدرولیزات به‌طور تدریجی کاهش یافت. این یافته با گزارش‌های پیشین مبنی بر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده در اثر حرارت‌دهی

پروتئین عدس به‌طور معنی‌داری کاهش یافت و همزمان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز کاهش چشمگیری نشان داد. در دمای ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه، به ترتیب ۲۷/۲ و ۲۹/۲ درصد کاهش در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه مشاهده شد (Alizadeh Firozeh *et al.*, 2021). در مطالعه حاضر، دمای بالاتر (۹۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های طولانی‌تر (تا ۷۵ دقیقه) احتمالاً سبب تخریب گسترده‌تری در گروه‌های عاملی مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی گردیده است.



شکل ۸- قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در محدوده pH ۳ تا ۸
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

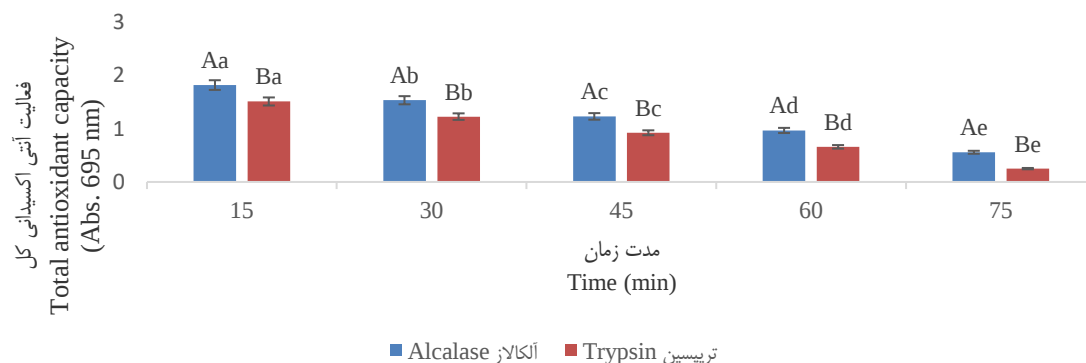
Fig. 8. Ferric reducing power of hydrolyzed olive seeds protein in the pH range of 3 to 8
*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

شکستن پیوندهای پپتیدی در مجاورت اسیدهای آمینه آبگریز (مانند فنیل آلانین، تیروزین، تریپتوفان، لوسین و والین) دارد. این اسیدهای آمینه به‌دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیک و زنجیره‌های جانبی آبگریز، نقش کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند. در مقابل، تریپسین به‌طور اختصاصی در سمت کربوکسیل باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین برش ایجاد می‌کند که این اسیدهای آمینه قلیایی، توانایی کمتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند. از این رو، هیدرولیزات آلکالاز به دلیل ترکیب آمینواسیدی غنی از اسیدهای آمینه آروماتیک و آبگریز، حتی پس از حرارت‌دهی طولانی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوب‌تری را حفظ می‌کند. کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش زمان حرارت‌دهی، الگویی وابسته به زمان را نشان داد. این یافته با گزارش علیزاده فیروزه و همکاران (Alizadeh Firozeh *et al.*, 2021) که نشان دادند با افزایش زمان حرارت‌دهی از ۱۵ به ۶۰ دقیقه، کاهش معنی‌دارتری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی رخ می‌دهد، همخوانی کامل دارد. در مطالعه حاضر، دمای بالاتر (۹۵ درجه سانتی‌گراد) احتمالاً سینتیک تخریب را تسریع کرده است. در این دما، علاوه بر تخریب گروه‌های عاملی، امکان دناوره شدن و تجمع پپتیدها نیز افزایش می‌یابد که خود می‌تواند دسترسی به مکان‌های فعال آنتی‌اکسیدانی را محدود سازد.

طولانی‌مدت همسو می‌باشد (Rivero-Pino, 2023). کاهش وابسته به زمان فعالیت آنتی‌اکسیدانی تحت تأثیر حرارت را می‌توان به چندین عامل نسبت داد. نخست، حرارت‌دهی طولانی‌مدت باعث کاهش محتوای گروه‌های آمینی آزاد در هیدرولیزات‌های پروتئینی می‌شود. علیزاده فیروزه و همکاران (Alizadeh Firozeh, Mirzaei, & Fadaei Noghani, 2021) گزارش کردند که با افزایش زمان حرارت‌دهی تا ۶۰ دقیقه، میزان گروه‌های آمینی آزاد در هیدرولیزات

دوم، حرارت‌دهی طولانی‌مدت می‌تواند باعث کاهش اسیدهای آمینه حاوی گوگرد (به‌ویژه سیستئین) در ترکیب هیدرولیزات شود. تحقیقات نشان داده است که پردازش حرارتی پروتئین‌ها می‌تواند میزان سیستئین را در هیدرولیزات‌های آنزیمی کاهش دهد و این کاهش با کاهش قدرت احیاکنندگی آهن و فعالیت خنثی‌سازی رادیکال سوپراکسید همبستگی مثبت دارد. سیستئین به‌دلیل داشتن گروه تیول آزاد ($-SH$)، نقشی کلیدی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد و اهدای الکترون ایفا می‌کند و تخریب آن در اثر حرارت، مستقیماً به کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی منجر می‌شود (Mardani *et al.*, 2023).

در مطالعه حاضر، کاهش مداوم فعالیت آنتی‌اکسیدانی از ۱۵ تا ۷۵ دقیقه حاکی از آن است که تخریب حرارتی از همان ابتدا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی غلبه داشته است. نتایج نشان داد که هیدرولیزات حاصل از آنزیم آلکالاز در تمام زمان‌های حرارت‌دهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدرولیزات حاصل از تریپسین داشت. این یافته با گزارش لین و همکاران (Lin, Liu, Liu, Kortensniemi, & Liu, 2022) همسو است که نشان دادند هیدرولیزات آب پنیر حاصل از آلکالاز در مقایسه با تریپسین، پپسین و فلورزایم، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در سه روش مختلف سنجش دارا بود. برتری آلکالاز به ویژگی بستر گسترده آن نسبت داده می‌شود؛ آلکالاز تمایلی بالایی به



شکل ۹- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان ۱۵ تا ۷۵ دقیقه
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

Fig. 9. Total antioxidant capacity of olive seeds protein hydrolysate at 95°C for 15 to 75 minutes

*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

به هیدرولیزات حاصل از تریپسین داشت. این اسیدهای آمینه، به‌ویژه تیروزین و تریپتوفان، به‌دلیل داشتن حلقه‌های آروماتیک غنی از الکترون، نقش کلیدی در احیای یون‌های فریک و اهدای الکترون ایفا می‌کنند (Mardani et al., 2023). هیدرولیزات حاصل از آلکالاز به‌دلیل غنای بالای این اسیدهای آمینه، حتی در شرایط حرارتی شدید، جمعیت بیشتری از گروه‌های اهداکننده الکترون را حفظ می‌کند (Habinshtuti et al., 2023). در مقابل، تریپسین که به‌طور اختصاصی در سمت کربوکسیل باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین برش ایجاد می‌کند، پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی متفاوت (غنی از اسیدهای آمینه قلیایی) تولید می‌کند که توانایی کمتری در احیای یون‌های فلزی و اهدای الکترون دارند. کاهش قدرت احیاکنندگی آهن با افزایش زمان حرارت‌دهی از ۱۵ تا ۷۵ دقیقه، الگویی وابسته به زمان را نشان دادند. این یافته با گزارش علیزاده فیروزه و همکاران (Alizadeh Firozeh et al., 2021) بر روی هیدرولیزات پروتئین عدس همخوانی دارد که نشان دادند با افزایش زمان حرارت‌دهی، کاهش معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی (از جمله قدرت احیاکنندگی) رخ می‌دهد (Alizadeh et al., 2021). در مطالعه حاضر، دمای بالاتر (۹۵ درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های طولانی‌تر (تا ۷۵ دقیقه) احتمالاً سینتیک تخریب گروه‌های اهداکننده الکترون و تجمع پپتیدها را تسریع کرده است. آزمون قدرت احیاکنندگی آهن مستقیماً به گروه‌های اهداکننده الکترون (به‌ویژه گروه‌های فنولی و تیولی) وابسته است که در برابر حرارت بسیار حساس بوده و به سرعت اکسید می‌شوند (Rivero-Pino, 2023). در مقابل، آزمون فسفومولیدن بر پایه احیای یون‌های مولبدین استوار است و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با مکانیسم‌های مختلف (مانند خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد) نیز در آن مشارکت دارند که ممکن

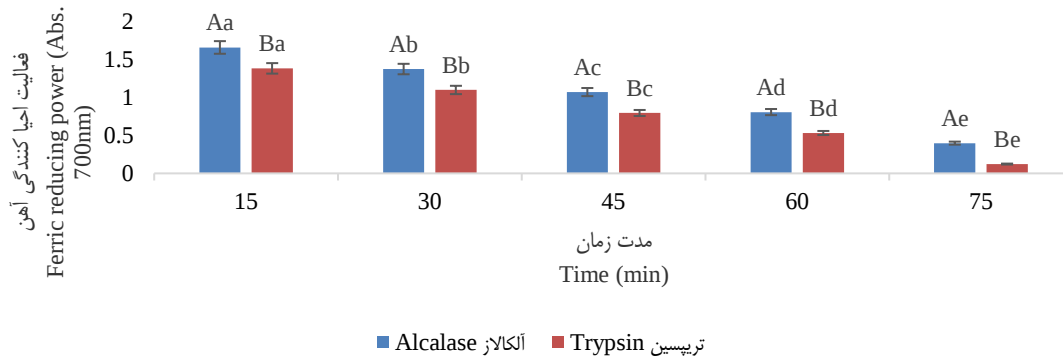
احیاکنندگی آهن

در این مطالعه، پایداری حرارتی بر مبنای قدرت احیاکنندگی آهن هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون حاصل از دو آنزیم آلکالاز و تریپسین در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد و در بازه‌های زمانی ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰ و ۷۵ دقیقه مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱۰). نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان حرارت‌دهی، قدرت احیاکنندگی آهن هر دو هیدرولیزات به‌طور تدریجی و وابسته به زمان کاهش یافت. این یافته با گزارش‌های پیشین مبنی بر کاهش قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده در اثر حرارت‌دهی طولانی‌مدت همسو می‌باشد (Alizadeh Firozeh et al., 2021). حرارت‌دهی طولانی‌مدت در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد می‌تواند از چند طریق باعث کاهش قدرت احیاکنندگی آهن شود. نخست، حرارت بالا می‌تواند باعث اکسیداسیون گروه‌های تیول (SH^-) در باقی‌مانده‌های سیستئین و همچنین اکسیداسیون حلقه‌های آروماتیک در اسیدهای آمینه تیروزین و تریپتوفان گردد. این گروه‌های عاملی به‌عنوان اهداکنندگان اصلی الکترون در واکنش احیاکنندگی آهن شناخته می‌شوند و تخریب آن‌ها مستقیماً به کاهش ظرفیت احیاکنندگی منجر می‌شود (Mardani et al., 2023; Liu et al., 2023). دوم، حرارت‌دهی طولانی‌مدت می‌تواند باعث ایجاد تجمعات پروتئینی از طریق برهمکنش‌های هیدروفوبیک و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی جدید شود. این تجمعات، دسترسی به مکان‌های فعال آنتی‌اکسیدانی را محدود کرده و کارایی انتقال الکترون را کاهش می‌دهد (Habinshtuti et al., 2023; Rivero-Pino, 2023).

نتایج این مطالعه نشان داد که هیدرولیزات حاصل از آنزیم آلکالاز در تمام زمان‌های حرارت‌دهی، قدرت احیاکنندگی آهن بالاتری نسبت

احیاکنندگی آهن هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد دچار کاهش وابسته به زمان می‌شود، اما هیدرولیزات حاصل از آلكالاز در مقایسه با تریپسین از پایداری حرارتی بهتری برخوردار است.

است در برابر حرارت مقاومت بیشتری نشان دهند (Liu et al., 2023). این مشاهدات تأکید می‌کند که ارزیابی پایداری حرارتی آنتی‌اکسیدان‌ها با استفاده از چندین روش سنجش با مکانیسم‌های مختلف ضروری است و نمی‌توان صرفاً بر اساس یک روش به نتیجه‌گیری کلی دست یافت. در مجموع، نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که اگرچه قدرت



شکل ۱۰- قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان ۱۵ تا ۷۵ دقیقه*
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

Fig. 10. Ferric reducing power of olive seeds protein hydrolysate at 95°C for 15 to 75 minutes

*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

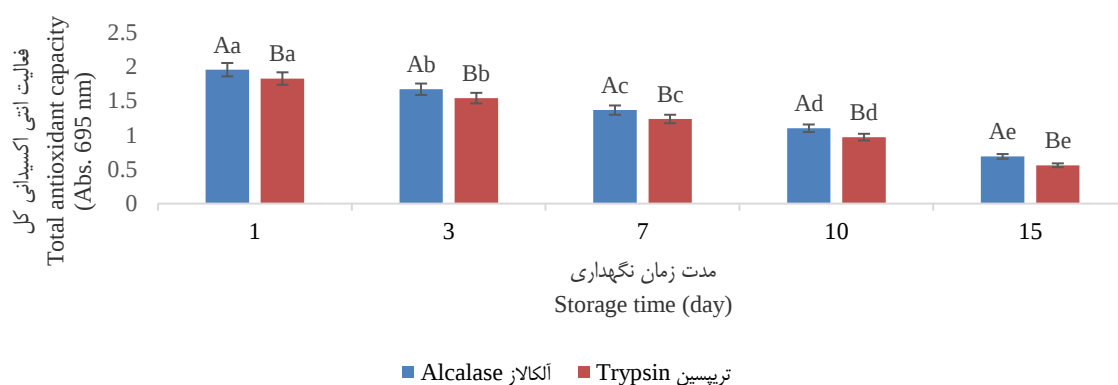
تجمعات پروتئینی طی نگهداری رخ می‌دهد. در طول نگهداری، پپتیدها می‌توانند از طریق برهمکنش‌های هیدروفوبیک و تشکیل پیوندهای دی‌سولفیدی جدید به یکدیگر متصل شده و تجمعات بزرگ‌تری تشکیل دهند (Liu et al., 2023; Mardani et al., 2023). این تجمعات، دسترسی به مکان‌های فعال آنتی‌اکسیدانی را محدود کرده و کارایی خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد را کاهش می‌دهد. در نهایت، تخریب میکروبی اگرچه در دمای یخچال به‌طور قابل توجهی مهار می‌شود، اما در صورت عدم رعایت شرایط کاملاً استریل، رشد میکروارگانیسم‌های سایکروفیل می‌تواند به تخریب آنزیمی پپتیدها و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی منجر گردد. نتایج این مطالعه نشان داد که هیدرولیزات حاصل از آنزیم آلكالاز در تمام روزهای نگهداری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدرولیزات حاصل از تریپسین داشت و همچنین کاهش فعالیت آن در طول زمان با شیب ملایم‌تری همراه بود. این برتری را می‌توان به ویژگی‌های ساختاری پپتیدهای تولید شده توسط هر آنزیم نسبت داد. آنزیم آلكالاز به‌دلیل ویژگی بستر گسترده، تمایل بالایی به شکستن پیوندهای پپتیدی در مجاورت اسیدهای آمینه آبگریز مانند فنیل‌آلانین، تیروزین، تریپتوفان، لوسین و والین دارد (Lin et al., 2022). در نتیجه، هیدرولیزات حاصل از آلكالاز غنی از پپتیدهای کوتاه با انتهای آبگریز است که این پپتیدها به‌طور طبیعی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند و همچنین به‌دلیل ساختار فشرده‌تر، در

پایداری پروتئین هیدرولیز شده در دمای یخچال آنتی‌اکسیدانی کل

در این مطالعه، پایداری فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون حاصل از دو آنزیم آلكالاز و تریپسین طی ۱۵ روز نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) در بازه‌های زمانی ۱، ۳، ۵، ۷، ۱۰ و ۱۵ روز مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل ۱۱). نتایج نشان داد که با افزایش مدت زمان نگهداری در یخچال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو هیدرولیزات به‌طور تدریجی و وابسته به زمان کاهش یافت. این یافته با گزارش‌های پیشین مبنی بر کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی طی نگهداری در دمای یخچال همسو می‌باشد (Rivero-Pino, 2023; Habinshuti et al., 2023). کاهش تدریجی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌های پروتئینی طی نگهداری در دمای یخچال را می‌توان به چندین مکانیسم اصلی نسبت داد. نخست، اکسیداسیون خود به خودی اسیدهای آمینه حساس به اکسیداسیون رخ می‌دهد. اسیدهای آمینه آروماتیک (تیروزین، تریپتوفان، فنیل‌آلانین) و اسیدهای آمینه حاوی گوگرد (سیستئین، متیونین) به‌دلیل داشتن گروه‌های عاملی مستعد اکسیداسیون، در طول نگهداری طولانی‌مدت حتی در دمای یخچال دچار تخریب اکسیداتیو می‌شوند (Habinshuti et al., 2023). این تخریب باعث کاهش تعداد مکان‌های فعال آنتی‌اکسیدانی در ساختار پپتیدها می‌گردد. دوم، تشکیل

عوامل اصلی کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول نگهداری هستند. بر اساس این نتایج، برای نگهداری طولانی‌تر (بیش از ۱۵ روز)، ممکن است نیاز به استفاده از روش‌های نگهداری تکمیلی (مانند بسته‌بندی تحت خلأ، افزودن آنتی‌اکسیدان‌های ثانویه، یا خشک‌کردن) باشد. علاوه بر این، توصیه می‌شود که هیدرولیزات‌های پروتئینی در دمای یخچال و در بسته‌بندی‌های مقاوم در برابر نفوذ اکسیژن نگهداری شوند تا از کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی در طول زمان جلوگیری گردد (Rivero-Pino, 2023; Habinshuti *et al.*, 2023).

برابر اکسیداسیون طی نگهداری مقاومت بیشتری نشان می‌دهند. در مقابل، تریپسین که به‌طور اختصاصی در سمت کربوکسیل باقی‌مانده‌های لیزین و آرژنین برش ایجاد می‌کند، پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی متفاوت (غنی از اسیدهای آمینه قلیایی) تولید می‌کند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی ذاتی کمتری دارند و همچنین در طول نگهداری، به‌دلیل ماهیت آبدوست بیشتر، احتمال تخریب در آن‌ها بیشتر است (Mardani *et al.*, 2023; Rivero-Pino, 2023). که تخریب اکسیداتیو اسیدهای آمینه آروماتیک و تشکیل تجمعات پروتئینی از



شکل ۱۱- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای یخچال طی مدت ۱۵ روز نگهداری

*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

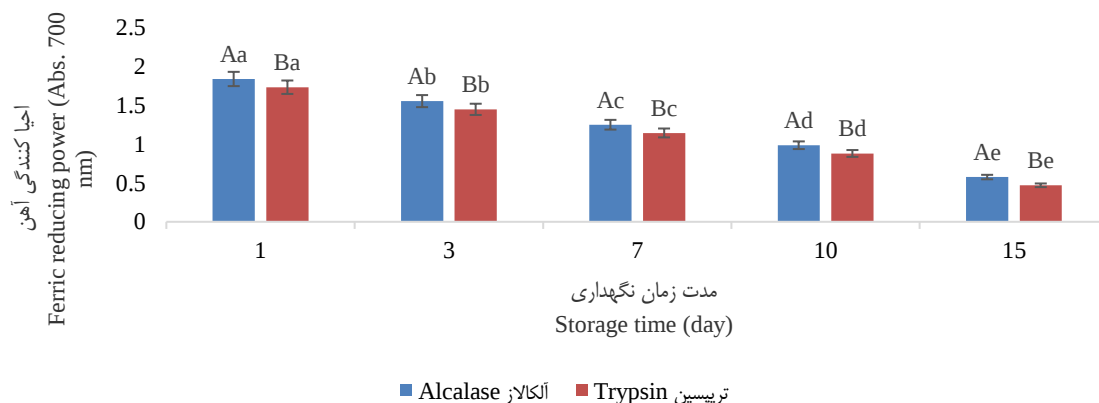
Fig. 11. Total antioxidant capacity of olive seeds protein hydrolysate during 15 days of storage at refrigerated temperature (4°C)

*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

را حفظ می‌کنند. در مقابل، هیدرولیزات تریپسین که عمدتاً حاوی پپتیدهای غنی از لیزین و آرژنین است، توانایی ذاتی کمتری در احیای یون‌های فلزی داشته و در طول نگهداری سریع‌تر دچار افت فعالیت می‌شود (Lin *et al.*, 2022). در پژوهشی، پروتئین ایزوله سویا با پنج آنزیم مختلف شامل آلکالاز، تریپسین، پاپائین، بروملین و پپسین هیدرولیز شد و ویژگی‌های ساختاری و زیست‌فعالیت هیدرولیزات‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد هیدرولیزات حاصل از آلکالاز بیشترین مقدار اسیدهای آمینه آبریز و آروماتیک را دارا بود و بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ظرفیت کلات‌کنندگی فلز و فعالیت ضدیابنی را نشان داد. همچنین هیدرولیز آنزیمی موجب باز شدن ساختار پروتئین و کاهش اندازه ذرات شد که دسترسی به پپتیدهای زیست‌فعال را افزایش داد. پژوهشگران نتیجه گرفتند که نوع آنزیم نقش تعیین‌کننده‌ای در ویژگی‌های ساختاری و عملکردی هیدرولیزات‌های پروتئینی دارد (Xu *et al.*, 2023).

احیاکنندگی آهن

نتایج ارزیابی قدرت احیاکنندگی آهن هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون طی ۱۵ روز نگهداری در دمای یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، ظرفیت احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در هر دو هیدرولیزات حاصل از آلکالاز و تریپسین به‌طور تدریجی کاهش یافت (شکل ۱۲). مکانیسم اصلی این افت، اکسیداسیون تدریجی گروه‌های تیول ($-SH$) باقی‌مانده‌های سیستئین و حلقه‌های آروماتیک تیروزین و تریپتوفان در طول نگهداری است؛ زیرا این گروه‌ها مسئول اصلی اهدای الکترون در واکنش احیاکنندگی آهن می‌باشند. در مقایسه دو آنزیم، هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمام روزهای نگهداری قدرت احیاکنندگی بالاتری نسبت به تریپسین داشت. این برتری به‌دلیل تولید پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه آبریز و آروماتیک توسط آلکالاز است که حتی پس از ذخیره‌سازی طولانی، جمعیت بیشتری از گروه‌های اهداکننده الکترون



شکل ۱۲- قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای یخچال طی مدت ۱۵ روز نگهداری

*حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

Fig. 12. Ferric reducing power of olive seeds protein hydrolysate during 15 days of storage at refrigerated temperature (4°C)

*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

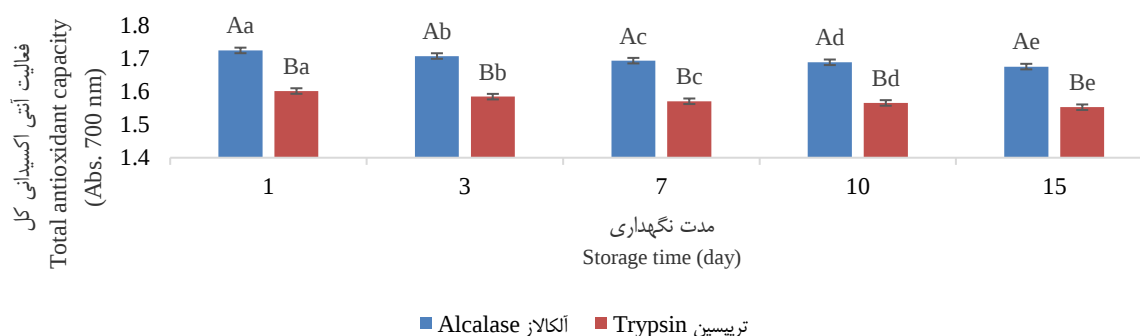
تخریب عمدتاً ناشی از اکسیداسیون خود به خودی و آهسته است، در سیکل‌های انجماد-رفع انجماد، تخریب به صورت جهشی و با هر بار تکرار سیکل رخ می‌دهد. در مقایسه دو آنزیم، هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمام روزهای نگهداری، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به تریپسین داشت و کاهش آن با شیب ملایم‌تری همراه بود. این برتری را می‌توان به تولید پپتیدهای کوتاه‌تر و غنی از اسیدهای آمینه آبگریز توسط آلکالاز نسبت داد که به دلیل ساختار فشرده‌تر و وزن مولکولی پایین‌تر، در برابر استرس ناشی از انجماد و رفع انجماد مقاومت بیشتری نشان می‌دهند (Jogi, Mathew, & Mamatha, 2024). علاوه بر این، پپتیدهای حاصل از آلکالاز به دلیل ماهیت آمفی‌فیلیک (داشتن نواحی آبگریز و آبدوست) می‌توانند با سطح بلورهای یخ برهمکنش کرده و از رشد آن‌ها جلوگیری کنند (Chen, Wu, Cai, & Wang, 2021). به عبارت دیگر، این پروتئین‌های هیدرولیز شده با دارا بودن هم‌زمان نواحی آبدوست و آب‌گریز، می‌توانند بر سطح بلورهای یخ جذب شوند و با اشغال جایگاه‌های رشد بلور، از الحاق مولکول‌های بیشتر آب و نو بلوری شدن یخ جلوگیری کنند. در نتیجه، اندازه بلورهای یخ در طی چرخه‌های انجماد-ذوب محدود شده و تغییرات ساختاری و کاهش فعالیت زیستی پروتئین‌های هیدرولیز شده به حداقل می‌رسد (Davies et al., 2014).

پایداری پروتئین هیدرولیز شده در اثر انجماد و رفع

انجماد

آنتی‌اکسیدانی کل

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون طی ۱۵ روز نگهداری در شرایط انجماد (با سیکل‌های انجماد و رفع انجماد) نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی هر دو هیدرولیزات حاصل از آلکالاز و تریپسین به طور تدریجی کاهش یافت (شکل ۱۳). این پدیده عمدتاً ناشی از آسیب‌های مکانیکی و اکسیداتیو ناشی از تشکیل و رشد بلورهای یخ در طی انجماد است که به ساختار پپتیدها آسیب رسانده و گروه‌های عاملی مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تخریب می‌کند (Yu et al., 2023). در طی انجماد، آب موجود در نمونه به بلورهای یخ تبدیل می‌شود و این بلورها با ایجاد تنش مکانیکی و برش در سطح مشترک یخ-آب، باعث بازشدگی ساختاری و دنا توره شدن پپتیدها می‌گردند. در مرحله ذوب، بلورهای یخ ذوب شده و حفره‌هایی ایجاد می‌کنند که زمینه را برای واکنش‌های اکسیداتیو و تجمع مولکول‌های پپتیدی فراهم می‌سازد (Bao, Ertbjerg, Estévez, Yuan, & Gao, 2021). بر خلاف فرآیندهای حرارتی که عمدتاً تخریب شیمیایی مستقیم گروه‌های عاملی را به دنبال دارند، در انجماد، تخریب عمدتاً ناشی از استرس اکسیداتیو ناشی از غلیظ‌شدگی مواد اکسیدان در فاز مایع باقیمانده و آسیب فیزیکی ناشی از رشد بلورهای یخ است. از سوی دیگر، بر خلاف نگهداری در یخچال که



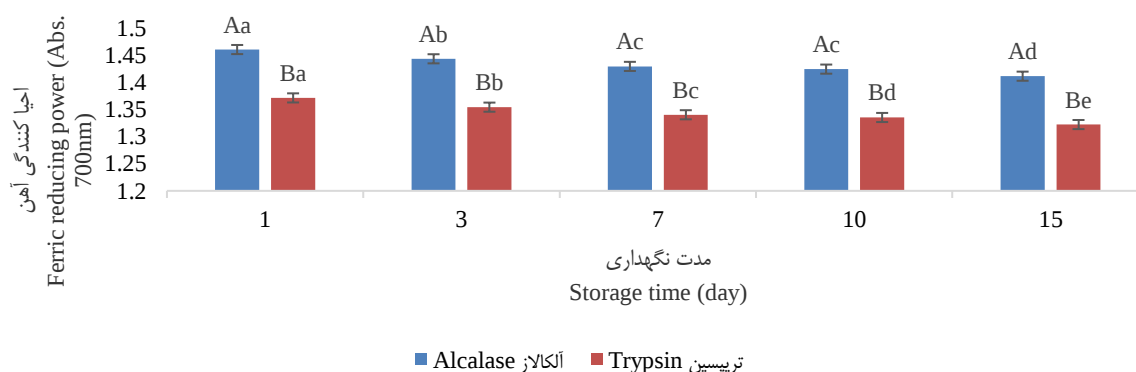
شکل ۱۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در اثر انجماد و رفع انجماد طی مدت ۱۵ روز نگهداری
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P > 0.05$) است.

Fig. 13. Total antioxidant capacity of olive seeds protein hydrolysate during 15 days of storage under freeze-thaw cycles
*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

تنش مکانیکی ناشی از رشد بلورهای یخ منجر به بازشدگی ساختار پپتیدها و در معرض قرار گرفتن گروه‌های حساس می‌گردد که در مرحله ذوب، این گروه‌ها به سرعت اکسید شده و قابلیت اهدای الکترون خود را از دست می‌دهند. نکته حائز اهمیت آنکه قدرت احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن در مقایسه با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، حساسیت بیشتری به سیکل‌های انجماد نشان داد، زیرا گروه‌های تیول و فنول (که نقش اصلی را در قدرت احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن ایفا می‌کنند) نسبت به استرس اکسیداتیو ناشی از افزایش غلظت مواد اکسیدان در فاز مایع آسیب‌پذیرتر هستند. در مقایسه دو آنزیم، هیدرولیزات حاصل از آلکالاز به دلیل تولید پپتیدهای کوتاه‌تر و غنی از اسیدهای آمینه آبگریز (مانند تیروزین و تریپتوفان) که گروه‌های اهداکننده الکترون پایدارتری دارند، کاهش قدرت احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن کمتری نسبت به تریپسین نشان داد (Hwang et al., 2024a).

احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن

ارزیابی قدرت احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون طی ۱۵ روز نگهداری در شرایط انجماد و رفع انجماد نشان داد که با افزایش تعداد سیکل‌های انجماد-آب‌شدگی، ظرفیت احیاء یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در هر دو نمونه حاصل از آلکالاز و تریپسین کاهش یافت. مکانیسم اصلی این کاهش، متفاوت از تخریب حرارتی یا اکسیداسیون خودبه‌خودی در یخچال است (شکل ۱۴). در طی انجماد، تشکیل بلورهای یخ باعث افزایش غلظت موضعی گونه‌های واکنش‌دهنده (مانند اکسیژن محلول و یون‌های فلزی) در فاز مایع باقیمانده می‌شود که اکسیداسیون گروه‌های تیول ($SH-$) و حلقه‌های آروماتیک را تسریع می‌کند (Bao et al., 2021). همچنین،



شکل ۱۴- قدرت احیاء آنتی‌اکسیدانی آهن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در اثر انجماد و رفع انجماد طی مدت ۱۵ روز نگهداری
*حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

Fig. 14. Ferric reducing power of olive seeds protein hydrolysate during 15 days of storage under freeze-thaw cycles
*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

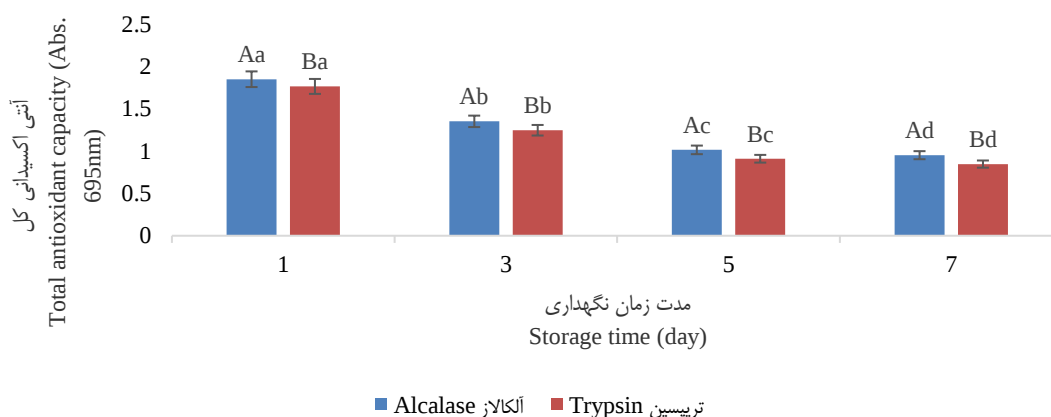
پایداری پروتئین هیدرولیز شده در دمای محیط آنتی اکسیدانی کل

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون طی ۷ روز نگهداری در دمای محیط نشان داد که با افزایش زمان نگهداری، فعالیت آنتی اکسیدانی هر دو هیدرولیزات حاصل از آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین به تدریج کاهش یافت (شکل ۱۵). این روند را می‌توان به افزایش سرعت واکنش‌های اکسیداسیون در دمای محیط نسبت داد؛ به گونه‌ای که افزایش انرژی جنبشی مولکول‌ها، احتمال برخورد گونه‌های فعال اکسیژن با گروه‌های عاملی حساس موجود در پپتیدها، از جمله گروه‌های تیول و باقی‌مانده‌های اسیدهای آمینه آروماتیک، را افزایش داده و در نتیجه ظرفیت انتقال الکترون و فعالیت آنتی اکسیدانی آن‌ها کاهش می‌یابد. (Bao et al., 2021) در مقایسه با نگهداری در دمای یخچال، که سرعت واکنش‌های اکسیداسیون کاهش می‌یابد، نگهداری در دمای محیط معمولاً افت سریع‌تر فعالیت آنتی اکسیدانی را به دنبال دارد؛ زیرا دمای بالاتر موجب تسریع اکسیداسیون پروتئین‌ها و تغییرات ساختاری پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود (Pereira et al., 2022).

مطالعه پیرا و همکاران (Pereira et al., 2022) بر روی هیدرولیزات پروتئینی حاصل از ضایعات میگوی فراوری شده نیز نشان داد که شرایط نگهداری بر پایداری ترکیبات زیست‌فعال و فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات‌ها تأثیر معنی‌داری دارد و کنترل دما نقش

مهمی در حفظ کیفیت آن‌ها ایفا می‌کند (Pereira et al., 2022). همچنین کلیکایای و همکاران (Kleekayai et al., 2022) گزارش کردند که ویژگی‌های ساختاری هیدرولیزات‌های پروتئینی و ظرفیت آنتی اکسیدانی آن‌ها به شرایط فراوری و نگهداری وابسته بوده و در اثر اکسیداسیون تدریجی، فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می‌یابد.

در مقایسه دو آنزیم، هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمام روزهای نگهداری فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به هیدرولیزات حاصل از تریپسین نشان داد. این برتری را می‌توان به تفاوت در اختصاصیت آنزیمی و پروفایل پپتیدی حاصل از هیدرولیز نسبت داد. آلکالاز به دلیل اختصاصیت بستر گسترده، پپتیدهای غنی‌تری از اسیدهای آمینه آبگریز و آروماتیک تولید می‌کند که معمولاً توانایی بیشتری در انتقال الکترون و خنثی‌سازی گونه‌های فعال اکسیژن دارند؛ در نتیجه، فعالیت آنتی اکسیدانی اولیه و پایداری نسبی آن‌ها طی دوره نگهداری بیشتر است (Islam et al., 2022). پرادوس و همکاران (Prados et al., 2020) پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته زیتون را شناسایی و ارتباط آن‌ها را با اثرات کاهنده چربی خون بررسی کردند. آن‌ها با استفاده از طیف‌سنجی جرمی، چندین پپتید با فعالیت زیستی بالا را شناسایی کردند که در مهار متابولیسم کلسترول نقش داشتند. نتایج نشان داد هسته زیتون منبع ارزشمندی برای تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی است. پژوهشگران بیان کردند که انتخاب آنزیم مناسب نقش کلیدی در تولید پپتیدهای هدفمند دارد.



شکل ۱۵- فعالیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای محیط طی مدت ۷ روز نگهداری

*حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح (P < 0.05) است.

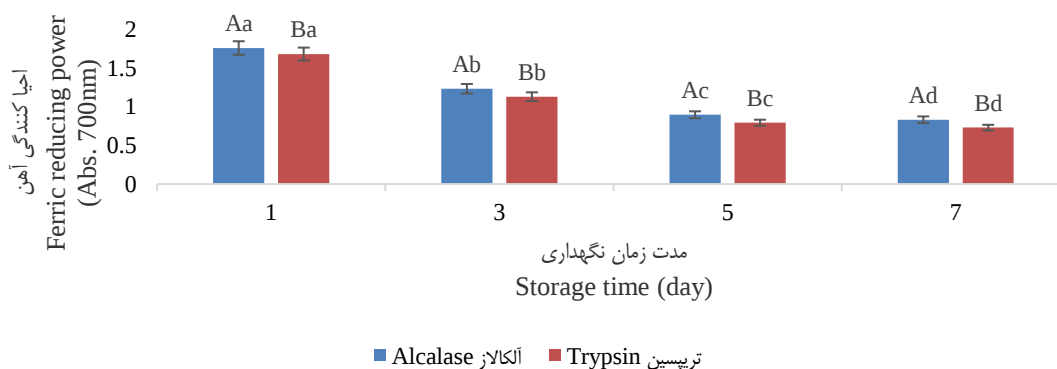
Fig. 15. Total antioxidant capacity of olive seeds protein hydrolysate during 7 days of storage at ambient temperature (25°C)

*Different letters indicate differences at the level (P>0.05).

احیا کنندگی آهن

ارزیابی قدرت احیا کنندگی آهن هیدرولیزات‌های پروتئین هسته زیتون طی ۷ روز نگهداری در دمای محیط نشان داد که ظرفیت احیای یون‌های فریک (Fe^{3+}) به فرو (Fe^{2+}) در هر دو هیدرولیزات حاصل از آلکالاز و تریپسین با افزایش زمان نگهداری کاهش یافت. در دمای محیط (۲۵-۲۷ درجه سانتی‌گراد)، تخریب عمدتاً از نوع اکسیداسیون تدریجی گروه‌های عاملی و تشکیل رادیکال‌های آزاد در اثر تماس با اکسیژن محیط است که سرعت آن در مقایسه با دمای یخچال بیشتر و در مقایسه با حرارت (۹۵ درجه سانتی‌گراد) کمتر می‌باشد (Habinshtuti et al., 2023). محصولاتی که در دمای محیط نگهداری می‌شوند، نیازمند محافظت بیشتری در برابر اکسیداسیون هستند. در مقایسه دو آنزیم، هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمام روزهای نگهداری، قدرت احیا کنندگی بالاتری نسبت به تریپسین داشت که به دلیل تولید پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه آبریز و آروماتیک توسط آلکالاز است (Liu et al., 2023; Mardani et al., 2023). همچنین، تحقیقات نشان داده است که هیدرولیزات حاصل از آلکالاز

به دلیل تنوع بیشتر پپتیدی و ساختار فشرده‌تر، در برابر اکسیداسیون ناشی از دمای محیط مقاومت بهتری از خود نشان می‌دهد. نتایج پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که نگهداری طولانی‌مدت در دمای اتاق می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها را کاهش دهد. در مقایسه آنزیم‌های مختلف پروتئولیتیک، آلکالاز به عنوان آنزیمی کارآمد در تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان شناخته شده است. در مطالعه‌ای بر فراورده‌های فرعی گوشت خوک انجام شد، گزارش گردید آلکالاز کارایی هیدرولیز بالاتری نسبت به تریپسین داشته و هیدرولیزهای حاصل فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد برتری نسبت به مواد اولیه خام نشان دادند (Hwang et al., 2024). استیو و همکاران (Esteve et al., 2015) پروتئین‌های حاصل از ضایعات زیتون را به وسیله هیدرولیز آنزیمی به پپتیدهای زیست‌فعال تبدیل کردند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها را ارزیابی نمودند. نتایج نشان داد که نوع آنزیم مورد استفاده تأثیر معنی‌داری بر ترکیب پپتیدی و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات‌ها دارد. همچنین هیدرولیزات‌های تولیدشده پتانسیل مناسبی برای استفاده به عنوان ترکیبات عملکردی در صنایع غذایی داشتند.



شکل ۱۶- قدرت احیا کنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده هسته زیتون در دمای محیط طی مدت ۷ روز نگهداری

*حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ($P < 0.05$) است.

Fig. 16. Ferric reducing power of olive seeds protein hydrolysate during 7 days of storage at ambient temperature (25°C)

*Different letters indicate differences at the level ($P > 0.05$).

نتیجه‌گیری

ارزیابی پایداری نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات در شرایط مختلف (pH، حرارت، نگهداری در یخچال، انجماد-ذوب و دمای محیط) به طور تدریجی کاهش می‌یابد، اما هیدرولیز آلکالاز همواره پایداری بالاتری داشت. بیشترین پایداری در pH خنثی و کمترین در pH اسیدی شدید مشاهده شد. حرارت طولانی‌مدت (به ویژه بالای ۴۵ دقیقه) بیشترین تخریب را به همراه داشتند. به طور کلی، هسته زیتون منبعی ارزشمند برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان است و هیدرولیز با آلکالاز در شرایط بهینه می‌تواند محصولی با فعالیت

در این مطالعه، هیدرولیز آنزیمی پروتئین هسته زیتون با دو آنزیم آلکالاز و تریپسین با موفقیت بهینه‌سازی شد. نتایج نشان داد که روش سطح پاسخ ابزاری مؤثر برای پیش‌بینی شرایط بهینه و درک اثرات متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا است. هیدرولیزات حاصل از آلکالاز در تمام آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی برتری معنی‌داری نسبت به تریپسین داشت که به ویژگی بستر گسترده آلکالاز و آزادسازی پپتیدهای غنی از اسیدهای آمینه آروماتیک و آبریز نسبت داده می‌شود.

هیدرولیزات‌ها در سامانه‌های غذایی و شرایط in vivo به مطالعات تکمیلی نیاز است.

منابع تأمین مالی

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

میزان مشارکت نویسندگان

رنجبر: تحقیق، بررسی و نگارش پیش نویس اصلی. **صادقی**

ماهونک: نظارت، مدیریت داده‌ها، اعتبارسنجی، ویرایش و بررسی

مقاله. **قربانی:** مشاور و ناظر پژوهش.

آنتی‌اکسیدانی بالا و پایداری مناسب برای کاربردهای صنعتی فراهم آورد. در مطالعات آینده، شناسایی و تعیین توالی پپتیدهای مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی و بررسی رابطه ساختار-فعالیت آن‌ها می‌تواند به درک بهتر مکانیسم‌های عملکردی این ترکیبات کمک کند. همچنین، ارزیابی فراهمی زیستی و کارایی این پپتیدها در مدل‌های سلولی، حیوانی و سامانه‌های واقعی غذایی، گام مهمی در توسعه کاربردهای صنعتی و فراسودمند آن‌ها خواهد بود. همچنین از محدودیت‌های این پژوهش می‌توان به عدم شناسایی و تعیین توالی پپتیدهای زیست‌فعال با روش‌های پیشرفته‌ای مانند LC-MS/MS و محدود شدن ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی به آزمون‌های شیمیایی اشاره کرد. همچنین، نتایج در مقیاس آزمایشگاهی به‌دست آمده است و برای تأیید کارایی

References

1. Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2023). Stability of whey protein bioactive peptide-stabilised nanoemulsions: effect of pH, ions, heating and freeze-thawing. *International Journal of Food Science & Technology*, 58(4), 1234-1245. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16292>
2. Ahmadi, F., Kadivar, M., & Shahedi, M. (2007). Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*, 105(1), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.056>
3. Alizadeh Firozeh, R., Mirzaei, M., & Fadaei Noghani, V. (2021). Antioxidant activity stability of lentil protein hydrolysate against heat and pH treatments. *Iranian Journal of Food Science and Technology Research*, 17(5), 849-861. <https://doi.org/10.22067/ijstr.v18i1.87854>
4. AOAC. (1990). Official Methods of Analysis (15th ed.). Association of Official Analytical Chemists.
5. Ashaolu, T.J., Le, T.D., & Suttikhana, I. (2023). Stability and bioactivity of peptides in food matrices based on processing conditions. *Food Research International*, 168, 112786. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.112786>
6. Bao, Y., Erthjerg, P., Estévez, M., Yuan, L., & Gao, R. (2021). Freezing of meat and aquatic food: Underlying mechanisms and implications on protein oxidation. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(6), 5548-5569. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12841>
7. Bartolomei, M., Bollati, C., Bellumori, M., Cecchi, L., Mulinacci, N., Lammi, C., & Arnoldi, A. (2022). Exploitation of olive (*Olea europaea* L.) seed proteins as upgraded source of bioactive peptides with multifunctional properties: Focus on antioxidant and dipeptidyl-dipeptidase-IV inhibitory activities, and glucagon-like peptide 1 improved modulation. *Antioxidants*, 11(9), 1730. <https://doi.org/10.3390/antiox11091730>
8. Chen, X., Wu, J., Cai, X., & Wang, S. (2021). Production, structure-function relationships, mechanisms, and applications of antifreeze peptides. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 20(1), 542-562. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12655>
9. Dahdouh, A., Khay, I., Le Brech, Y., El Maakoul, A., & Bakhouya, M. (2023). Olive oil industry: A review of waste stream composition, environmental impacts, and energy valorization paths. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(16), 45473-45497. <https://doi.org/10.1007/s11356-023-25867-z>
10. Davies, P.L. (2014). Ice-binding proteins: a remarkable diversity of structures for stopping and starting ice growth. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(11), 548-555. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.09.005>
11. Esteve, C., Marina, M.L., & García, M.C. (2015). Novel strategy for the revalorization of olive (*Olea europaea*) residues based on the extraction of bioactive peptides. *Food Chemistry*, 167, 272-280. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.090>
12. Farzanfar, F., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M., Ghaboos, S.H.H., & Kaveh, S. (2025). Encapsulation of ultrasound-assisted flaxseed meal protein hydrolysate in nanoliposomal systems by new formulation: Physicochemical properties, release behavior under simulated gastrointestinal conditions. *Food Chemistry: X*, 27, 102389. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2025.102389>
13. Fathi, M., Hosseini, F. S., Ramezani, R., & Rashidi, L. (2022). Optimized enzymatic hydrolysis of olive pomace proteins using response surface methodology. *Applied Food Biotechnology*, 9(2), 79-90. <https://doi.org/10.22037/afb.v9i2.36192>
14. Habinshtuti, I., Nsengumuremyi, D., Muhoza, B., Ebenezer, F., Aregbe, A.Y., & Ndisanze, M.A. (2023). Recent and novel processing technologies coupled with enzymatic hydrolysis to enhance the production of antioxidant

- peptides from food proteins: A review. *Food Chemistry*, 423, 136313. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136313>
15. He, F. (2011). Bradford protein assay. *Bio-Protocol*, e45-e45. <https://doi.org/10.21769/bioprotoc.45>
16. Hernández-Corroto, E., Marina, M.L., & García, M.C. (2020). Identification of peptides potentially responsible for in vivo hypolipidemic activity of a hydrolysate from olive seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 68(14), 4237–4246. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c01280>
17. Hwang, J., Lee, S., Kim, H., Park, J., Choi, Y., & Jung, S. (2024a). Comparative exploration of antioxidant properties of Alcalase- and trypsin-hydrolyzed porcine by-products and their classification for industrial use. *Applied Sciences*, 15(1), 47. <https://doi.org/10.3390/app15010047>
18. Hwang, J., Son, W.Y., Jeong, E.J., Kim, K.S., Shin, E.C., Song, D.H., & Kim, H.W. (2024b). Comparative exploration of antioxidant properties of Alcalase-and Trypsin-hydrolyzed porcine by-products and their classification for industrial Use. *Applied Sciences*, 15(1), 47. <https://doi.org/10.3390/app15010047>
19. Islam, M., Huang, Y., Islam, S., Fan, B., Tong, L., & Wang, F. (2022). Influence of the degree of hydrolysis on functional properties and antioxidant activity of enzymatic soybean protein hydrolysates. *Molecules*, 27(18), 6110. <https://doi.org/10.3390/molecules27186110>
20. Jogi, N., Mathew, A., & Mamatha, B.S. (2024). Modification of bioactive properties in food protein hydrolysates by alcalase and trypsin. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 14(S 01), S26-S34. <https://doi.org/10.1055/s-0044-1782643>
21. Kleekayai, T., O'Neill, A., Clarke, S., Holmes, N., O'Sullivan, B., & FitzGerald, R.J. (2022). Contribution of hydrolysis and drying conditions to whey protein hydrolysate characteristics and in vitro antioxidative properties. *Antioxidants*, 11(2), 399. <https://doi.org/10.3390/antiox11020399>
22. Li, Z., Paulson, A.T., & Gill, T.A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19, 733-743. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.058>
23. Lin, Y., Liu, Y., Liu, S., Kortessniemi, M., & Liu, J. (2022). Optimization of enzymatic hydrolysis of Perilla meal protein for hydrolysate with high hydrolysis degree and antioxidant activity. *Molecules*, 27(3), 1079. <https://doi.org/10.3390/molecules27031079>
24. Liu, D., Guo, Y., & Ma, H. (2023). Production, bioactivities and bioavailability of bioactive peptides derived from walnut origin by-products: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(26), 8032-8047. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2054933>
25. Maestri, D., Barrionuevo, D., Bodoira, R., Zafra, A., Jiménez-López, J., & Alché, J.D.D. (2019). Nutritional profile and nutraceutical components of olive (*Olea europaea* L.) seeds. *Journal of Food Science and Technology*, 56(9), 4359-4370. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-03904-5>
26. Mardani, M., Badakné, K., Farmani, J., & Aluko, R.E. (2023). Antioxidant peptides: Overview of production, properties, and applications in food systems. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 22(1), 46-106. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.13061>
27. Martinez, F.G., Ambrosi, V., Rocha, G., Sancho, A.M., & Szerman, N. (2023). Enzymatic hydrolysis as a valorization strategy of bovine lungs: Optimization of process variables and study of antioxidant capacity. *Repositorios Digitales MINCyT, Argentina*. <https://doi.org/10.1002/jsf2.110>
28. Mohammad, S.S., da Silva Ferreira, M.V., Jacintho Barbosa, M.I., & Barbosa Junior, J.L. (2023). Characteristics of enzymatic hydrolysis of protein from different food sources and potential separation techniques. *Current Nutrition & Food Science*, 19(6), 590-601. <https://doi.org/10.2174/1573401318666221003104005>
29. Nooshi Manjili, Z., & Sadeghi Mahoonak, A. (2024). Effects of microwave pretreatment on enzymatic hydrolysis of pumpkin seed protein (*Cucurbita maxima* L.) using trypsin and investigation of the protein antioxidant activity using response surface methodology. *Nutrition and Food Sciences Research*, 11(4). <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e29669>
30. Pereira, N.D.L.Á., Fangio, M.F., Rodriguez, Y.E., Bonadero, M.C., Harán, N.S., & Fernández-Gimenez, A.V. (2022). Characterization of liquid protein hydrolysates shrimp industry waste: Analysis of antioxidant and microbiological activity, and shelf life of final product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), e15526. <https://doi.org/10.1111/jfpp.15526>
31. Pérez-Gálvez, R., Maldonado-Valderrama, J., Jones, N.C., Hoffmann, S.V., Guadix, E., & Garcia-Moreno, P.J. (2024). Influence of the enzymatic treatment and pH on the interfacial and emulsifying properties of sunflower and olive protein hydrolysates. *Food Hydrocolloids*, 154, 110135. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2024.110135>
32. Prados, I.M., Dominguez-Vega, E., Marina, M.L., & Garcia, M.C. (2023). Maximizing hypocholesterolemic peptides from an olive byproduct by enzymatic hydrolysis. *Lwt*, 187, 115371. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2023.115371>

33. Rivero-Pino, F. (2023). Bioactive food-derived peptides for functional nutrition: Effect of fortification, processing and storage on peptide stability and bioactivity within food matrices. *Food Chemistry*, 406, 135046. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.135046>
34. Roy, M., Ullah, S., Alam, M., & Islam, M.A. (2021). Evaluation of quality parameters and antioxidant properties of protein concentrates and hydrolysates of hyacinth bean (*Lablab purpureus*). *Legume Science*, 3(4), e128. <https://doi.org/10.1002/leg3.128>
35. Sarringkarin, W., & Laokuldilok, T. (2017). Optimization of the production conditions of glutinous rice bran protein hydrolysate with antioxidative properties. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences*, 16(1), 1–14. <https://doi.org/10.12982/cmujns.2017.0001>
36. Sripokar, P., Panya, A., & Sriwattana, S. (2022). Optimization of enzymatic hydrolysis by alcalase and flavourzyme to enhance the antioxidant properties of jasmine rice bran protein hydrolysate. *Scientific Reports*, 12, 12582. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-16821-z>
37. Udenigwe, C.C., & Aluko, R.E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science*, 77(1), R11-R24. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2011.02455.x>
38. Wang, K., Luo, Y., & Sun, Y. (2021). Novel antioxidant and ACE inhibitory peptide identified from *Arthrospira platensis* protein and stability against thermal/pH treatments and simulated gastrointestinal digestion. *Food Research International*, 139, 109908. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109908>
39. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308–322. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.09.019>
40. Xu, Y., Yang, Y., Ma, C.M., Bian, X., Liu, X.F., Wang, Y., & Zhang, N. (2023). Characterization of the structure, antioxidant activity and hypoglycemic activity of soy (*Glycine max* L.) protein hydrolysates. *Food Research International*, 173, 113473. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2023.113473>
41. Yang, J., Huang, Y., Dong, X., & Wang, Z. (2023). Optimization of walnut protein hydrolysed as an antioxidant candidate. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 17, 5465–5476. <https://doi.org/10.1007/s11694-023-02067-0>
42. Yu, P., Yan, J., Kong, L., Yu, J., Zhao, X., & Peng, X. (2023). Whey protein hydrolysate improved the structure and function of myofibrillar protein in ground pork during repeated freeze–thaw cycles. *Foods*, 12(16), 3135. <https://doi.org/10.3390/foods12163135>