بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه توسط آنزیم‌های تجاری

نسیم مهدوی میقان [۱]، پیمان آریایی [۲*]، مهدی شریفی سلطانی [۳]، سارا جعفریان [۴]

۱- دانشجوی دکتری،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی،دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران

۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران

۳- گروه دامپزشکی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد چالوس، چالوس، ایران

۴- استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی،نور ، ایران

[*] مسئول مکاتبه:Email:p.aryaye@yahoo.com

چکیده

هدف از این مطالعه، تولید پروتئین هیدرولیز شده از دانه هندوانه با استفاده از آنزیم‌های میکروبی و بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی و عملکردی در آن می‌باشد. بدین منظور پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه توسط آنزیم‌های تجاری آلکالاز و پروتامکس (pH بهینه فعالیت آلکالاز ۸/۵، پروتامکس ۷)، در بازه‌های زمانی ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه تولید شد. مقادیر درجه هیدرلیز، پروفایل اسید آمینه، خواص عملکردی (pH ۷) شامل حلالیت، خاصیت کف‌زایی و امولسیون کنندگی و همچنین خواص آنتی‌اکسیدانی شامل خنثی‌سازی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی فریک اندازه‌گیری شد. میزان اسیدهای آمینه آبگریز آزاد در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز برابر با ۳۳/۹۳درصد و برای آنزیم پروتامکس برابر با ۳۱/۷۰درصد بوده است و بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری و غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و پروتامکس، به ترتیب لوسین ۷/۸۴ و ۷/۰۵درصد و گلوتامیک اسید ۱۹/۹۹، ۱۸/۰۹درصد بوده است. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از میزان پروتئین و درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس برخوردار بود ($p<۰/۰۵$). همچنین افزایش زمان هیدرولیز تاثیر مثبتی بر پارامترهای مذکور داشت ($p<۰/۰۵$). بنابراین به نظر می‌رسد، پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه به علت دارا بودن فعالیت آنتی اکسیدانی و خواص عملکردی مناسب می‌تواند بعنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در رژیم غذایی و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده شود.

کلمات کلیدی: ، آلکالاز، پپتید زیست فعال، پروتامکس، حلالیت، دانه هندوانه، رادیکال آزاد DPPH

۱-مقدمه

رادیکال‌های آزاد، مولکول‌های ناپایدار و بسیار واکنش پذیری مشتمل بر انواع اکسیژن فعال و نیتروژن فعال هستند. از رادیکال‌های آزاد می‌توان به آنیون سوپر اکسید، هیدروکسیل و رادیکال‌های نیتریک اکساید و گونه‌های غیر رادیکالی مثل پراکسید هیدروژن و نیتروز اسید اشاره داشت که در جریان اکسایش مواد غذایی تولید می‌شوند، اکسایش چربی‌ها یکی از فاکتورهای دخیل در افت کیفیت و فساد مواد غذایی است (۲۷). در مقابل این عوامل، آنتی‌اکسیدان‌ها ترکیباتی هستند که به مهار بسیاری از واکنش‌های اکسیداسیون که توسط رادیکال‌های آزاد ایجاد می‌شوند، کمک نموده و بدین وسیله آسیب وارده به سلول‌ها و بافت‌ها را مهار کرده یا به تأخیر می‌اندازد. انواع مختلفی از ترکیبات ضد اکسایش به منظور کنترل رادیکال‌های آزاد ایجاد شده در جریان اکسایش مورد استفاده قرار می‌گیرند که پپتیدهای زیست فعال جزء این گروه به‌شمار می‌روند. اخیرا به دلیل تقاضای روزافزون برای ضد اکساینده‌های طبیعی و ایمن، پپتیدهای زیست فعال کانون توجهات واقع شده و به شکل گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند (۱، ۲۸). پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز مواد غذایی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، خواص عملکردی می‌باشند. پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی پایین خواص عملکردی و زیست فعال بالاتری دارند. به منظور تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان و ضد میکروبی آنزیم بایستی قادر به هیدرولیز پیوندهای پپتیدی خاص در زنجیره پروتئینی باشد. متغیرهای مستقل هیدرولیز تاثیر مستقیمی بر فعالیت آنزیم داشته و به دنبال آن بر خواص ضد اکسایش پپتیدهای نهایی موثرند. امروزه از این پروتئین‌ها، بعنوان مکمل و یا جایگزین پروتئینی، در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده می‌گردد (۷، ۹، ۲۷، ۲۸).

آنزیم‌های تجاری در حال حاضر رایج‌ترین روش برای اصلاح کردن پروتئین‌ها هستند. انواع مختلفی از آنزیم‌های تجاری وجود دارند که به صورت موفقیت‌آمیزی برای هیدرولیز پروتئین‌های مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته است. علی‌رغم کاربردهای صنعتی فراوان آنزیم‌ها، یکی از معضلات اصلی در راه استفاده از این ترکیبات هزینه بالای فرآیندهای آنزیمی است و بنابراین آنزیم‌های پروتئولیتیک ارزان‌تر (آلکالاز، فلاورزایم، پروتامکس، پاپائین و ...) ترجیح داده می‌شوند (۲۳، ۲۸). مهمترین آنزیم‌های که طی تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است شامل آنزیم‌های آلکلاز و پروتامکس (دارای فعالیت اندوپروتئازی) می‌باشد (۲۱، ۲۸).

دانه هندوانه منبعی بسیار غنی از چربی و پروتئین می‌باشد، به لحاظ غنی بودن از پروتئین، دانه هندوانه می‌تواند بعنوان یک منبع پروتئینی در فرمولاسیون انواع مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد. دانه‌های هندوانه بعنوان ماده خام برای تولید محصولات پروتئینی با کیفیت بالا در فرمولاسیون مکمل‌های غذایی قابل استفاده می باشند (۱۲). پروتئین‌های دانه هندوانه حاوی انواع مختلفی از اسیدهای آمینه ضروری هستند که عمدتاً شامل آرژنین، گلوتامات، اسید آسپارتیک و لوسین است که می تواند نیاز FAO[1] به پروتئین‌های غذایی را برآورده کند (۱۸). دانه‌های هندوانه بعنوان ماده خام برای تولید محصولات پروتئینی با کیفیت بالا، در فرمولاسیون مکمل‌های غذایی به عنوان اجزا فراسودمند قابل استفاده می‌باشند. در مجموع برای تعدادی از پروتئین‌های دانه‌های خانواده کدوئیان فعالیت‌های دارویی از قبیل اثرات ضد دیابت، ضد قارچ، ضد باکتری، ضد التهابی، و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش شده است (۶، ۱۲، ۱۸). با توجه به مطالب بیان شده و اهمیت پروتئین هیدرولیز شده هدف از مطالعه حاضر تولید پپتیدهای

[1] Food and Agriculture Organization

تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه هندوانه توسط آنزیم‌های آلکالاز و پروتامکس و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی این پپتیدها می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

مغز دانه هندوانه گروه کلاله از " کارخانه مغز تخمه اخوان "تهیه گردید و به آزمایشگاه منتقل گردید. آنزیم آلکالاز و پروتامکس (مشخصات در جدول ۱) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی-گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجهٔ آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

جدول ۱: آنزیم های مورد استفاده در آزمایش

نام تجاری	منبع	دامنه pH	دامنه دما	میزان فعالیت (واحد آنسون)
آلکالاز	*Bacillus licheniformis*	٦ –١٠	٥٥ –٧٠	٢/٤
پروتامکس	*B.subtilis*	٥/٥ – ٧/٥	٣٥ – ٦٠	١/٥

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

۲-۲-۱-آماده سازی ایزوله پروتئین از دانه هندوانه

تخم هندوانه توسط آسیاب کاملا خرد شده و بصورت پودر در آمد. سپس با افزودن هگزان به نسبت ۱۰ به ۱ (حجمی–وزنی) عمل استخراج روغن انجام شد. عمل روغن گیری تا کاهش روغن باقیمانده به زیر ۱ درصد ادامه یافت. در ادامه حلال باقی‌مانده کنجاله به وسیله آون خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت از آن جدا شد. نمونه فاقد روغن سپس به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی– حجمی) در آب مقطر پراکنده شد. به منظور باز شدن ساختمان پروتئین‌ها pH محلول یاد شده با استفاده از pH متر ابتدا با کمک سود ۰/۱ نرمال به ۱۰ رسانده شد. در pH یاد شده (pH=۱۰) و دمای آزمایشگاه محلول به مدت یک ساعت هم زده شد. محلول برای مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفوژ (Z36 HK, Labnet, Germany) با دور ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار داده شد. سپس با حذف فاز رسوب و رساندن pH فاز محلول با استفاده از اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال به ۵ مجددا عمل سانتریفیوژ با دور g ×۵۰۰۰ و زمان ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تکرار شد. در این مرحله رسوب حاصل جمع آوری و با استفاده از آون تحت خلا در دمای ۴۵ درجه سانتی گراد در زمان ۴ تا ۵ ساعت خشک گردید. ایزوله پروتئین خشک شده در ظرف دربدار جمع آوری و در محیط خشک و خنک نگهداری گردید (۲۲).

۲-۲-۲- هیدرولیز ایزوله پروتئینی حاصل از دانه هندوانه

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، پروتامکس ۷)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۶۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت

۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ (مدل Z36HK، هامبورگ، آلمان) با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد، سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (مدل Operon FDB-550، ساخت کشورکره) بصورت پودر در آمد (۳۱).

۲-۳- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و زمان ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق معادله ۱ محاسبه گردید (۲۱):

معادله ۱:

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰درصد / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-٤- ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC[1]) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) انجام شد (۱۶).

۲-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۵-۱- بررسی مهار رادیکال آزاد (DPPH)

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از تیمارهای مختلف پروتئین هیدرولیز شده به‌طور جداگانه با ۱ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH اضافه و مخلوط حاصل به‌خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ دقیقه در اتاق تاریک قرار داده و سپس جذب نوری نمونه‌ها در طول‌موج ۵۱۷ nm در مقابل شاهد (آب مقطر) خوانده شد (۴).

معادله ۲:

درصد مهار رادیکال آزاد DPPH = (جذب شاهد / جذب شاهد-جذب نمونه) ×۱۰۰

۲-۵-۲- اندازه‌گیری قدرت احیاکنندگی آهن (FRAP)

این آزمون مطابق روش Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) انجام شد. در این روش آنتی‌اکسیدان‌ها نقش احیاءکنندگی دارند و باعث احیا آهن فریک به آهن فرو می‌شوند. بسته به قدرت احیاءکنندگی عصاره، رنگ زرد محلول آزمایش به رنگ سبز یا آبی تغییر می‌یابد (۴).

[1] Phenyl isothiocyanate

۲-٦- خواص عملکردی

۲-٦-۱- حلالیت

یک گرم نمونه را در ۱۰۰ میلی لیتر محلول آب مخلوط کرده و با استفاده از سود و اسید ۰/۱ نرمال pH آن را به ۱۰-۲ تنظیم کرده و سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق مخلوط کرده و سپس به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۵۰۰ سانتریفیوژ انجام شده و محتوای نیتروژن در سوپرناتانت نمونه با استفاده از روش کلدال تعیین شد و درصد پروتئین قابل حل با استفاده از معادله (۳) محاسبه شد (۸).

معادله ۳:

۱۰۰× (گرم وزن نمونه اولیه / گرم وزن آب ماده جامد محلول در سوپرناتت) = اندیس حلالیت در آب

۲-٦-۲- ظرفیت و پایداری امولسیون کنندگی

به ۳ گرم نمونه، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر روغن کلزا اضافه شد و به مدت ۳۰ ثانیه با هموژنایزر (APU500b، دیلکوفناور، ایران) هموژنیزه شد سپس به مقدار مساوی در ۴ لوله آزمایش تقسیم گردید و با سانتریفوژ با دور ۲۰۰۰g به مدت زمان ۵ دقیقه سانتریفوژ (بهداد، ایران) شد EC طبق معادله (۴) زیر گزارش شد (۲۹).

معادله ۴:

$$EC\ (\%) = \text{حجم قسمت امولیسفیه شده} / \text{حجم کل}$$

۱۰ میلی‌لیتر روغن گیاهی کلزا با ۳۰ میلی لیتر محلول پروتئینی ۱درصد مخلوط شد و pH آنها در پنج pH متفاوت ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ تنظیم شد سپس با هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰rpm به مدت یک دقیقه هموژنیزه شد سپس با میکروسمپلر ۵۰ میکرولیتر از قسمت مایع ته لوله برداشته که این عمل در زمان‌های t= 0' و t =10' انجام گرفت. سپس نمونه‌های به دست آمده در زمان‌های صفر و ده دقیقه با ۵ میلی لیتر سدیم دودسیل سولفات ۱٪ مخلوط شد و جذب محلول رقیق شده با اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر خوانده شد (۲۹).

معادله ۵:

$$ESI = A_0 \times \Delta t/\Delta A$$

$$\Delta A = A_0 - A_{10}, \quad \Delta t = 10 \text{ min}$$

۲-٦-۳- اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری کف کنندگی

برای اندازگیری ظرفیت کف کنندگی ۲۰ میلی لیتر محلول‌های پروتئینی با pH ۵-۸ تهیه شد و در استوانه مدرج ۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس به مدت یک دقیقه با هموژنایزر با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه هم زده شد. حجم مخلوط نهایی قرائت شد. درصد افزایش حجم در زمان صفر نسبت به حجم اولیه به عنوان ظرفیت کف کنندگی در نظر گرفته شد (معادله ۶) (۲۶).

معادله ۶:

ظرفیت کف = حجم نمونه قبل تشکیل کف / حجم نمونه در زمان‌های مختلف بعد از تشکیل کف- حجم نمونه قبل تشکیل کف کنندگی (٪)

برای محاسبه میزان پایداری کف، حجم کف در زمان‌های ۰/۵، ۵، ۱۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تشکیل کف قرائت شد. سپس با استفاده از رابطه بالا، درصد حجم کف باقی‌مانده در هر یک از زمان‌های مذکور به عنوان شاخص پایداری کف گزارش شد (۲۶). (معادله ۷)

$$\text{پایداری کف} = \frac{V0 \times 100}{\Delta V}$$

V0: مقدار حجم کف در زمان صفر، ΔV: تغییرات حجم کف در بازه زمانی

۲-۷- تجزیه و تحلیل آماری

کلیه آزمایش‌ها در طرح آزمایشی کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام شد و نتیجه به‌صورت میانگین با انحراف معیار گزارش گردید(در ارتباط با آزمون‌های اولیه پروتئین هیدرولیز شده تنها متغییر مورد بررسی، زمان هیدرولیز بود، زمان‌های مختلف هیدرولیز به‌طور جداگانه با ۳ تکرار انجام شد). آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان اختلاف معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم‌افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی مقادیر پروتئین

میزان پروتئین اولیه دانه هندوانه برابر با ۰/۶۴±۱۸/۶۶ درصد و میزان پروتئین ایزوله دانه هندوانه برابر با ۰/۷۵±۵۰/۹۴ درصد بوده است. همچنین مقادیر پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای مختلف مابین ۶۰/۶۳- ۹۰/۷۸ درصد بوده است. مقادیر بالاتر پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با ایزوله هندوانه، به علت تجزیه پروتئین در حین فرآیند هیدرولیز می باشد و همچنین انجام سانتریفوژ در حین فرآیند هیدرولیز، سبب جداسازی قسمت‌های غیر پروتئین نمونه شده است (۱۳). Gadalkar & Rathod (۲۰۱۹) مقادیر پروتئین اولیه دانه هندوانه را ۱۸/۷۲درصد و مقادیر پروتئین اولیه دانه هندوانه چربی زدایی شده را ۵۴/۴۸درصد اعلام نمودند که نتایج آنها با نتایج مطالعه حاضر هم خوانی داشت (۱۲).

جدول ۱: مقادیر پروتئین، پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم / زمان هیدرولیز (دقیقه)	آلکالاز	پروتامکس
۱۵	۷۱/۴۳±۰/۹۰^{Ac}	۶۰/۶۳±۰/۴۰^{Bc}
۳۰	۸۰/۵۶±۰/۴۶^{Ab}	۷۱/۲۴±۰/۹۸^{Bb}
۶۰	۹۰/۷۸±۰/۴۶^{Aa}	۸۴/۳۹±۰/۵۷^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۲- بررسی مقادیردرجه هیدرولیز

نتایج مربوط به درجه هیدرولیز (جدول ۲) نشان می‌دهد که نوع آنزیم و زمان فرآیند تاثیر مستقیمی بر روند افزایشی درجه هیدرولیز دارد. به طوریکه مقادیر درجه هیدرولیز توسط هر دو آنزیم به‌طور پیوسته افزایش یافت (P<۰/۰۵)، درجه هیدرولیز به طور قابل توجهی تحت تأثیر زمان فرآیند می باشد و طول زنجیره پپتیدی با درجه هیدرولیز نسبت عکس دارد بنابر این افزایش درجه هیدرولیز باعث کوتاه‌تر شدن طول زنجیره پپتیدی و کاهش توزیع وزن مولکولی می شود و در نتیجه باعث شکسته شدن نوارهای پپتیدی و افزایش اسیدهای آمینه آزاد می شود (۳، ۲۵). در بین دو آنزیم، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز درجه هیدرولیز بالاتری را در تمامی زمان های هیدرولیز نشان داد (P<۰/۰۵)، علت این امر، عملکرد دو آنزیم را در قابلیت آلکالاز در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد بیان کرد (۲۱، ۲۸).

جدول ۲: مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

آنزیم / زمان هیدرولیز (دقیقه)	آلکالاز	پروتامکس
۱۵	۱۵/۳۳±۰/۲۹^{Ac}	۱۱/۷۹±۰/۳۸^{Bc}
۳۰	۲۱/۵۱±۰/۵۰^{Ab}	۱۷/۷۱±۰/۵۸^{Bb}
٦۰	۳۱/۱٦±۰/۸٦^{Aa}	۲۳/٤٦±۰/۵۹^{Ba}

۱) همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

۲) اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

۳) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۳- ترکیب اسید آمینه

اسیدهای آمینه بلوک‌های سازنده پپتیدها و پروتئین‌ها هستند. که به دلیل وجود گروه کربوکسیل (COOH–) خواص اسیدها و گروه آمینه (NH2–) ویژگی‌های اساسی را ارائه می‌دهد. پروتئین‌ها از اسیدهای آمینه مختلف تشکیل شده‌اند، بنابر این کیفیت تغذیه‌ای یک پروتئین بر اساس محتوا، نسبت و قابلیت دسترسی اسیدهای آمینه ضروری آن تعیین می‌شود (۱۷). نتایج مربوط به پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه نشان داد، که این پروتئین سرشار از اسیدهای آمینه است که می‌تواند به عنوان یک منبع تغذیه مفید ارائه شود و در مجموع از ۲۲ اسید آمینه، ۱۷ اسید آمینه در آن موجود بود و تنها اسید آمینه فنیل آلانین از غلظت کمتری در مقایسه با آنچه که توسط الگوی FAO گزارش شده بود وجود داشت (۱۰). نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد، که میزان اسیدهای آمینه آبگریز آزاد (HAA) تحت تأثیر نوع پروتئاز قرار دارد. به طوریکه مقادیر HAA در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز برابر با ۳۳/۹۳درصد و برای آنزیم پروتامکس برابر با ۳۱/۷۰درصد بوده است. در مجموع اسیدهای آمینه ای که دارای خواص آبگریز هستند، نقش مهمی در روند بازدارندگی رادیکال‌های آزاد دارند. این امر به دلیل توانایی اسیدهای آمینه آبگریز در افزایش دسترسی به رادیکال‌های آزاد و در نتیجه کاهش دسترسی رادیکال های آزاد در سلول های هدف رخ می‌دهد (۱۱). در مجموع بالاترین مقادیر اسید آمینه ضروری و غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و پروتامکس، به ترتیب لوسین ۷/۸۴ و ۷/۰۵درصد و گلوتامیک اسید ۱۹/۹۹، ۱۸/۰۹درصد بوده است. Ibrahim و همکاران (۲۰۱۹)، مقادیر اسید

آمینه ضروری دانه هندوانه را لوسین ۷/۱۰درصد و بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری را گلوتامیک اسید ۲۲/۷۰درصد اعلام نمودند (۱۷). Sagar و همکاران، (۲۰۲۰) مقادیر اسید آمینه ضروری دانه هندوانه را لوسین ۷/۵۲درصد و بالاترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری را گلوتامیک اسید ۲۰/۸۴درصد اعلام نمودند، نتایج مطالعات مذکور با نتایج مطالعه ما هم خوانی داشت (۲۴).

جدول ۳: ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	**پروتامکس**	FAO/ WHO, 1990
هیستدین[1]	٤/٨٨	٤/٠٥	
ایزو لوسین[1]	٥/٧٠	٥/١٠	٢/٨٠
لوسین[1]	٧/٨٤	٧/٠٥	٦/٦٠
لایزین[1]	٦/١٥	٥/٨٧	٥/٨٠
متیونین[1]	١/٥٩	١/٠٥	
فنیل آلانین[1]	٥/٦٠	٤/٩٠	٦/٣٠
تروئنین[1]	٤/٧٠	٤/٢٠	٣/٤
والین[1]	٦/٢٠	٥/٤٠	٣/٥
آسپارتیک اسید	١٠/٢٥	١٣/٠٥	
آرژنین	٨/٥٥	٩/١١	
پرولین	٤/٩٠	٥/٧٨	
سرین	٥/٩٠	٦/٣٥	
آلانین	٠/١	٠/٨	
سیستئین	١٩/٩٩	١٨/٠٩	
گلوتامیک اسید	١/١٠	١/٨٥	١/١
تیروزین	٥/٩٩	٥/٧٨	
گلایسین	٤/٨٨	٤/٠٥	
HAA[2]	٣٣/٩٣	٣١/٧٠	
میزان اسید آمینه کل	٩٩/٤٤	٩٨/٤٣	

[1] اسیدآمینه ضروری

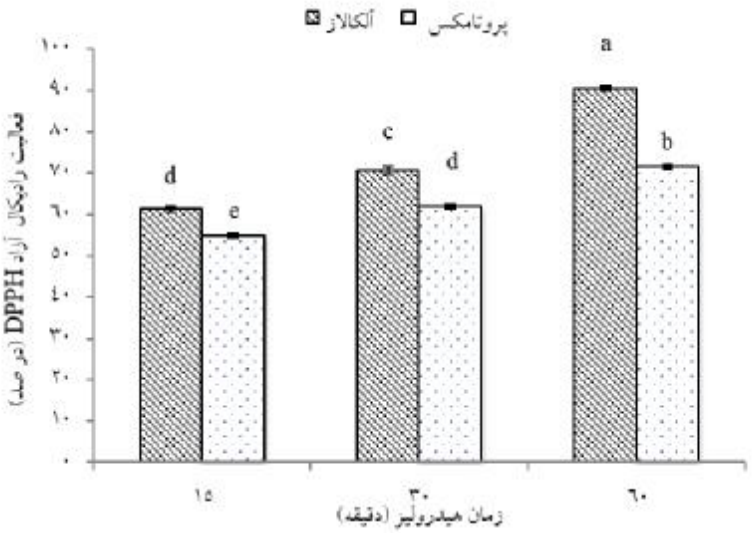
[2] مجموع اسیدهای آمینه آبگریز (آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروسین، فنیل آلانین، تریپتوفان، پرولین، متیونین و سیستئین)

۳-٤- خاصیت آنتی اکسیدانی

۳-٤-۱- فعالیت رادیکال آزاد DPPH

با توجه به نتایج (شکل ۱) تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده توانایی بالایی برای حذف رادیکال آزاد DPPH دارا بودند و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در اکثر زمان های هیدرولیز به طور معنی داری بالاتر از آنزیم پروتامکس بود (P<۰/۰۵). این نتیجه ممکن است به این دلیل باشد، پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز دارای اسید آمینه آبگریز بیشتری نسبت به پروتامکس می‌باشد که به بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن کمک می کند (۲۸، ۳۲).

با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت (P<۰/۰۵). به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود بنابراین فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز و به دنبال افزایش درجه هیدرولیز و آزادسازی پپتیدها و اسیدهای آمینه آبگریز و فعال بیشتر افزایش می یابد، با توجه به اینکه پپتیدها و اسیدهای آمینه آبگریز واکنش سریع تری به رادیکال های DPPH نشان داده بودند، این ترکیبات در مقایسه با اسیدهای آمینه آبدوست، ظرفیت بیشتری برای مهار رادیکال آزاد دارند (۲۵).

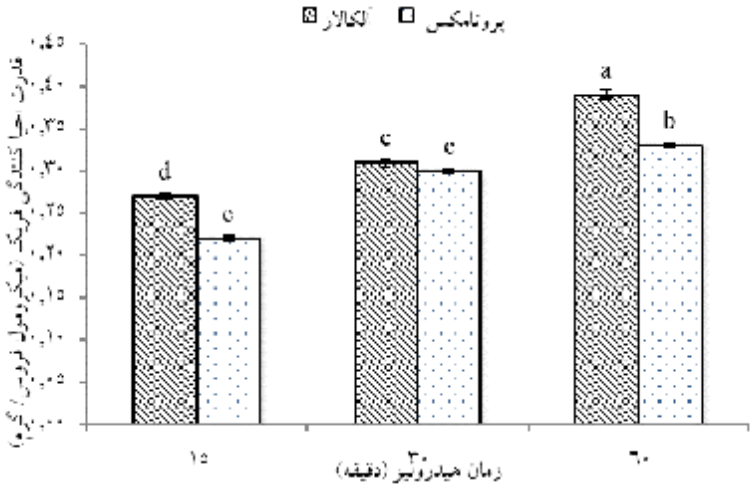


شکل ۱: مقادیر فعالیت رادیکال آزاد DPPH

۳-٤-۲- قدرت احیاءکنندگی فریک

قدرت احیا کنندگی فریک پروتئین‌های هیدرولیز شده به طور معنی داری به در ارتباط با پارامترهای فرآیند (نوع آنزیم و زمان هیدرولیز) بوده است (P<۰/۰۵). بیشترین قدرت احیا کنندگی فریک، مربوط پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان ۶۰ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارا بود (۰/۳۹ میکرومول فروس/ گرم) (P<۰/۰۵). در حالی‌که کمترین مقادیر مربوط به مربوط به پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پروتامکس و زمان ۱۵ دقیقه بود (۰/۲۲ میکرومول فروس/ گرم) (P<۰/۰۵). افزایش قدرت کاهندگی، می‌تواند نشان از افزایش اهداء هیدروژن یا الکترون باشد، همچنین تغییر در اندازه، ساختار، تعداد آمینواسید و پپتیدها در اثر گذشت زمان و افزایش درجه آبکافت، بر کاهندگی یون آهن تاثیر گذار است و ممکن است خاصیت کاهندگی یون فلزی از طریق اهدای هیدروژن یا دادن الکترون را تحت تأثیر قرار دهد. برای مثال، اسید آمینه های آبگریز از جمله

هیستیدین، پرولین، متیونین، سیستئین، تیروزین و فنیل آلانین فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها را بهبود می بخشند (۲۲، ۳۳). نتایج مشابهی توسط گزارش Varedesara و همکاران (۲۰۲۰) در مورد هیدرولیز هسته انگور، با استفاده از آنزیم آلکالاز و زمان هیدورلیز ۶۰ دقیقه گزارش شد (۳۱).

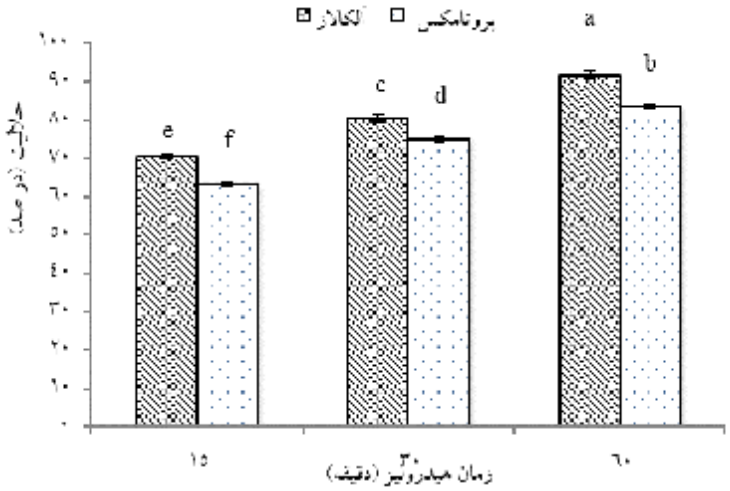


شکل ۲: مقادیر قدرت احیا کنندگی آهن

۳-۵-خواص عملکردی

۳-۵-۱- حلالیت

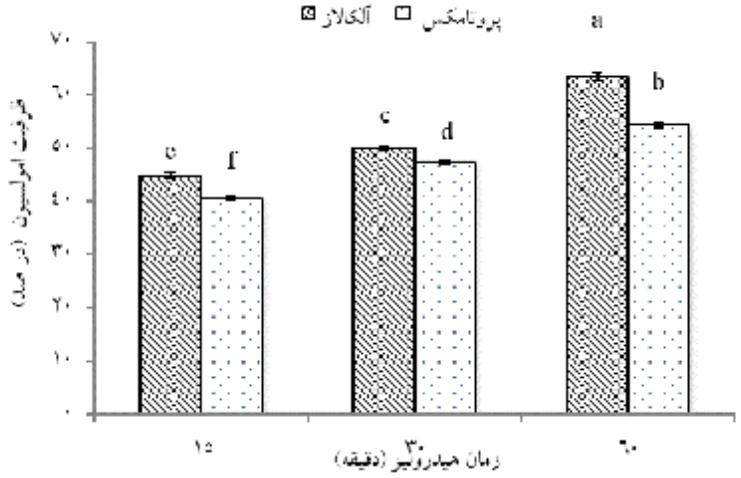
با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از حلالیت (شکل ۳) بالایی بر خوردار بودند و حلالیت پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالازدر تمامی زمان‌های هیدرولیز بالاتر بود. میزان حلالیت در بین زمان‌های مختلف اختلاف معنی داری باهم داشتند. با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر حلالیت افزایش یافت به‌طوری‌که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین حلالیت را دارا بود (۹۱/۷۸درصد). پپتیدها پس از هیدرولیز پروتئین قادر به ایجاد پیوندهای هیدروژنی قوی‌تری با آب بودند و معمولا در محلول‌های آبی محلول می‌باشند. دلیل اصلی افزایش حلالیت، احتمالا تشکیل پپتیدهای کوچک می باشد (۱۹). تفاوت در حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده به اندازه پپتید، تعادل آب گریزی آب دوستی و همچنین بار پپتیدهای تولید شده در طول هیدرولیز بستگی دارد. حلالیت بالای پروتئین هیدرولیز شده‌ی، یک ویژگی مفید برای بسیاری از مواد غذایی محسوب می شود (۳۰). Ghelich و همکاران، (۲۰۲۲) نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، حلالیت پروتئین از هیدرولیز آنزیمی پروتئین جوانه گندم افزایش یافت (۱۴).



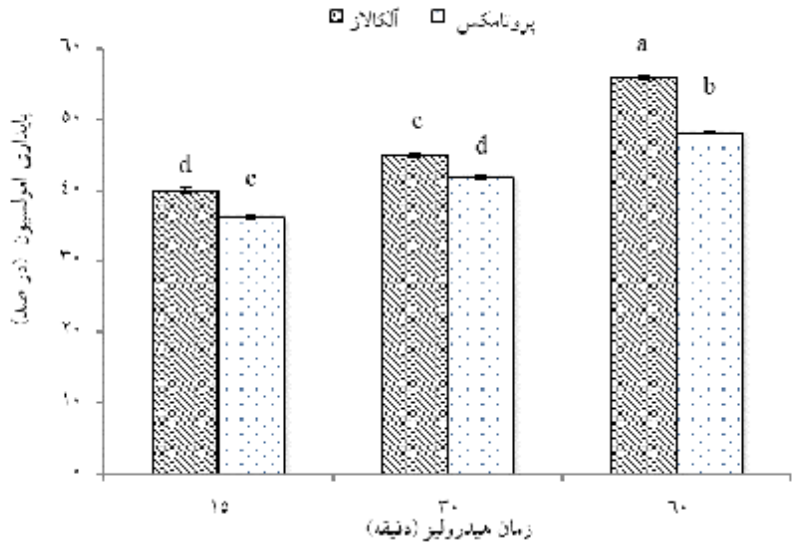
شکل ۳: مقادیر حلالیت تیمارهای مختلف

۳-۵-۲- خواص امولسیون کنندگی

نتایج مربوط به ظرفیت امولسیون کنندگی پایداری امولسوین باهم (به ترتیب شکل ۴ و ۵)، هم خوانی داشت، با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از ظرفیت امولسیون و پایداری امولسیون بالایی بر خوردار بودند. پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای سطح فعال هستند و بدلیل داشتن گروه‌های آبدوست و آبگریز و قابلیت انحلال در آب، باعث افزایش ظرفیت و پایداری امولسیون روغن در آب می شوند (۲). ظرفیت امولسیون و پایداری پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالازدر تمامی زمانهای هیدرولیز بالاتر بود و با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر آنها افزایش یافت به طوریکه پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین ظرفیت و پایداری امولسیون را دارا بود. به عنوان یک شاخص مؤثر در فرآیند هیدرولیز، امولسیون کنندگی پروتئین ها تحت تأثیر درجه هیدرولیز قرار می گیرد (۵). قلیچ و همکاران (۲۰۲۲) در پژوهشی که شاخص فعالیت امولسیفایری پروتئین آبکافتی حاصل از پروتئین جوانه گندم با استفاده از فلاورزایم و آلکالاز مورد ارزیابی قرار دادند، نشان دادند که، تغییر نوع آنزیم مصرفی منجر به تولید پروتئین های آبکافتی متفاوت از نظر ویژگی‌های امولسیونی می شود و نتایج بهتر توسط آنزیم آلکالاز مشاهده شد (۱۴).



شکل ٤: مقادیر ظرفیت امولسیون تیمارهای مختلف

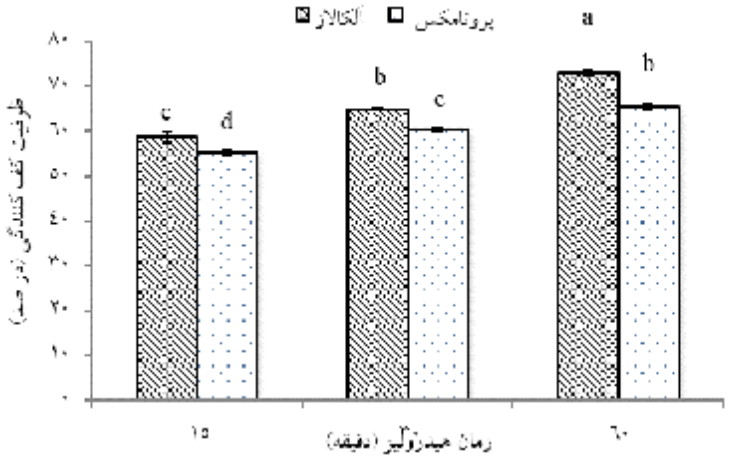


شکل ٥: مقادیر پایداری امولسیون تیمارهای مختلف

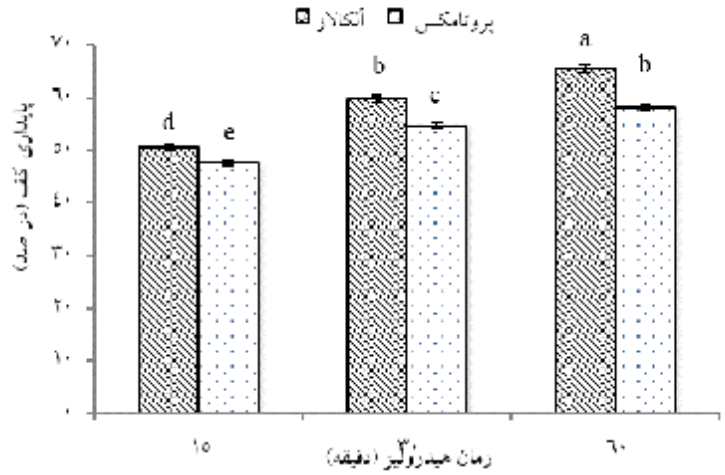
۳-۵-۳- خواص کف کنندگی

کف مخلوط کلوئیدی با فاز پیوسته مایع و فاز پراکنده گاز است و از نظر ترمودینامیکی ناپایدار می باشد. نتایج مربوط به کف کنندگی و پایداری کف (به ترتیب شکل ۶ و ۷)، با هم، هم خوانی داشت. با توجه به نتایج تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده از کف کنندگی بالایی بر خوردار بودند و کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالازدر تمامی زمانهای هیدرولیز بالاتر بود، با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر ظرفیت کف کنندگی افزایش یافت. به طوری‌که پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه بالاترین ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف را دارا بود. تحقیقات مختلفی، اثر فرآیند هیدرولیز آنزیمی بر ظرفیت و پایداری کف کنندگی هیدرولیز شده‌های پروتئینی را بررسی کرده اند. عواملی مانند حلالیت پروتئین‌ها، درجه هیدرولیز، نوع پپتیدهای حاصل، قابلیت تشکیل فیلم، از موارد مؤثر بر این شاخص‌ها هستند (۵). بدین شکل که

اثر افزایش درجه هیدرولیز تحت تأثیر زمان فرآیند و نوع آنزیم بر کاهش طول زنجیره پپتیدها و عملکرد آنها در ایجاد و پایدارسازی کف مؤثر است. یکی از مواردی که در پایداری کف موثر است، پروفیل آمینواسید پروتئین است. وجود آمینواسید لایزین در پروتئین‌ها موجب افزایش شمار پیوندهای هیدروژنی و متعاقب تراکم بار پروتئین می شود. به این طریق این آمینواسید کف را پایدار می کنند (۱۴، ۱۵). بنابراین در پروتئین آبکافتی که غلظت این اسید آمینه بالاست، پایداری کف مطلوبی انتظار می رود. که در مطالعه حاضر غلظت لایزین پروتئین هیدرولیز شده آلکالاز بالاتر از پروتامکس بود.



شکل ٦: مقادیر کف کنندگی تیمارهای مختلف



شکل ۷: مقادیر پایداری کف تیمارهای مختلف

٤- نتیجه گیری نهایی

در این پژوهش خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی پپتیدهای تخلیص شده از هیدرولیز آنزیمی دانه هندوانه بررسی شد. نتایج مربوط به ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که از میان آنزیم آلکالاز و پروتامکس، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز بالاتر، فعالیت آنتی اکسیدانی و خواص عملکردی مطلوب‌تری تولید کند و همچنین افزایش زمان هیدرولیز (تا ۶۰ دقیقه) تأثیر مثبتی بر روی ویژگی‌های مذکور داشت همچنین پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز،

اسیدهای آمینه HAA بالاتری داشت. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۶۰ دقیقه هیدرولیز می‌تواند بعنوان جایگزین پروتئین‌های حیوانی در رژیم غذایی مردم در کشورهای در حال توسعه و همچنین بعنوان ترکیبات عملگرا در فرمولاسیون مواد غذایی مطرح باشند.

۵- منابع:

۱. شرافت، ن.، معتمدزادگان، ع. و صفری، ر. ۱۳۹۲. اثر زمان هیدرولیز ضایعات پس از پخت ماهی تهوور بر راندمان بازیافت و اندازه مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز. نوآوری در علوم و فناوری غذایی. ۳ (۵): ۵۴-۴۷.

۲. شکرپور، ر.، معتمدزادگان، ع.، حسینی پرور، ه.، اویسی پور، م. ۱۳۹۵. بررسی خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه چانه سفید. نشزیه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. ۵ (۱): ۲۷-۳۸.

3. Ahmadi, F., Kadivar, M., Shahedi. M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. *Food Chem.* 105 (1): 57-64.
4. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 114: 1198-1205.
5. Chen, L., Chen, J., Ren, J., Zhao, M. 2011. Modifications of soy protein isolates using combined extrusion pre-treatment and controlled enzymatic hydrolysis for improved emulsifying properties. *Food Hydrocoll*, 25(5): 887– 97.
6. Dash, P., Ghosh, G. 2017. Fractionation, amino acid profiles, antimicrobial and free, radical scavenging activities of Citrullus lanatus seed protein. *Natural Product Research*. 31 (24), 2945-2947.
7. Dorvaj, Z., Javadian, S.R., Oveissipour, M, Nemati, M. 2013. Use Of Protein Hydrolysates From Caspian Sea Sprat (*Clupeonella Cultiventris*) As A Nitrogen Source For Bacteria Growth Media (*Vibrio Anguillarum, Bacillus Licheniformis, Bacillus Subtilis*). *Journal of Aquatic animals & Fisheries*. 4(15): 11-18.
8. Edwards, J. S. 2019. The Physicochemical Properties of Soy Protein Hydrolysate and its Formulation and Stability with Encapsulated Probiotic. Graduate Theses and Dissertations Retrieved. *University of Arkansas, Fayetteville*. https://scholarworks.uark.edu/etd/3524
9. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., Shamasundar, B. A. 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*. 38 (3): 1207-1214.
10. FAO/WHO, 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724.
11. Firmansyah, M., Abduh, M. Y. 2019. Production of protein hydrolysate containing antioxidant activity from Hermetia illucens. *Heliyon*. 5 (6): e02005.
12. Gadalkar, S. M., Rathod, V. K. 2019. Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 1–8.
13. Ghanbarinia, S. H., Ariaii, P., Safari, R., Najafian, L. 2022. The effect of hydrolyzed sesame meal protein on the quality and shelf life of hamburgers during refrigerated storage. *Animal science journal*. 93: 1, e13729.
14. Ghelich, S., Ariaii, P. & Ahmadi, M. Evaluation of Functional Properties of Wheat Germ Protein Hydrolysates and Its Effect on Physicochemical Properties of Frozen Yogurt. *Int J Pept Res Ther*. 28: 69.

15. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., Montero, M. P. 2009. Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3): 585-592.
16. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S. 2019. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Food Measurement*. 12: 721–727.
17. Ibrahim, S. E, Sulieman, A. M. E, Ali, N. A, Bothaina, S. A, Amin H. B, Abdelmuhsin, A. A, Veettil, V. N. 2019. Amino acid Profile of the Watermelon, Citrullus vulgaris and Detection of its Antimicrobial Activity. *Bioscience Biotechnology Research Communications*. 12 (4): 961-970.
18. Jixian, Z., Chaoting, W., Duan, Y., Zhang, H., Ma, H. 2022. Structure and functional properties of watermelon seed protein-glucose conjugates prepared by different methods, LWT. 155: 113004, ISSN 0023-6438.
19. Ma, W., Qi, B., Sami, R., Jiang, L., Li, Y., Wang, H. 2018. Conformational and Functional Properties of Soybean Proteins Produced by Extrusion-Hydrolysis Approach. *Int J Anal Chem*, 23: 918-932.
20. Mirzapour, Z., Ariaii, P., Safari, R. 2022. Evaluation the Effect Hydrolyzed Canola Meal Protein with Composite Coating on Physicochemical and Sensory Properties of Chicken Nugget. *Int J Pept Res Ther*. 28**:** 97.
21. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (Alosa caspia) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*. 18 (7): 950-956.
22. Nia, A. P., Mortazavi, S. A., Mahoonk, A. S., Rad, A. H. A., Armin, M. 2018. Evaluation of the functional properties of hydrolysed protein of watermelon seeds (*Citrullus lanatus*) by pepsin enzyme. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*.10 (3): 41-53.
23. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis)* prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of Food Science and Agriculture*. 93: 1718–1726.
24. Sagar, M., Gadalkar, Virendra, K., Rathod. 2020. Extraction of watermelon seed proteins with enhanced functional properties using ultrasound. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 50:2, 133-140.
25. Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S. Z., Najafian, L. 2020. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. *Heliyon*. 6(2): e03365.
26. Shahidi, F., Onodenalore, A. 1995. Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 51-54.
27. Shahosseini, S.R., Javadian, S.R., Safari, R. 2021. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of *Liza abu* viscera protein hydrolysate. J*ournal of Innovation in Food Science and Technology*, 30 (2): 123-146.
28. Shahosseini, S.R., Javadian, S.R., Safari, R. 2022. Effects of Molecular Weights -Assisted Enzymatic Hydrolysis on Antioxidant and Anticancer Activities of Liza abu Muscle Protein Hydrolysates. *International Journal for Peptide Research & Therap*eutics. 28: 72.
29. Slizyte, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., Rustad, T. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*gadus morhua*) Backbones. *Process Biochemistry*, 44: 668-677.
30. Tanuja, S., Viji, P., Zynudheen, A.A., Joshy, C.G. 2012. Composition, functional properties and antioxidative activity of hydrolysates prepared from the frame meat of striped catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Egypt. J. Biol*, 14 (1): 28–36.

31. Varedesara, M.S., Ariaii, P., Hesari, J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of *Lactobacillus casei* in it. *Food Sci Nutr*, 9:2180–2190.
32. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., Ma, H. 2019. Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates. *Food Chemistry*. 299, 30: 125165.
33. Yeganeh, S., Esmaeili Kharyeki, M., Ahmadi, H. 2021. Effect of hydrolysis time on the antioxidant activity of Common carp (*Cyprinus carpio*) head protein hydrolysate. isfj. 29 (6) :29-42.

Evaluation of antioxidant and functional properties of hydrolyzed watermelon seed protein by commercial enzymes

Nasim Mahdavi Mighan [1], Peiman Ariaii[2]*, Mahdi Sharifi Soltani [3], Sara Jafarian [4]

[1]PhD student, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
[2] Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
[3] Department of veterinary, Agriculture faculty, Islamic Azad University, Chalous Branch, Chalous, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran

*Corresponding author: Email: p.aryaye@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was produced hydrolyzed protein from watermelon seeds using microbial enzymes and to investigate its antioxidant and functional properties. For this purpose, hydrolyzed watermelon seed protein was produced by commercial enzymes alcalase and protamax (optimal alcalase pH of 8.5, protamax 7), at intervals of 10, 20 and 30 minutes. Degrees of hydrolysis, amino acid profile, functional properties (pH 7) including solubility, foaming and emulsifying properties, as well as antioxidant properties including DPPH free radical scavenging activity and ferric reducing power were measured. The amount of hydrophobic free amino acids in protein hydrolyzed by alcalase enzyme was 33.93% and for protamax was 31.70% and the highest levels of essential and non-essential amino acids for alcalase and protamax were leucine, 7% and 7.05% and glutamic acid were 19.99%, 18.09% respectively. The results showed that the protein hydrolyzed by alcalase had higher protein content and degree of hydrolysis, antioxidant activity and functional properties than the protein hydrolyzed by protamax ($p < 0.05$) and also the increase of hydrolysis time had a positive effect on the mentioned parameters ($p < 0.05$). Therefore, it seems that hydrolyzed watermelon seed protein due to its antioxidant activity and proper functional properties can be used as a substitute for animal protein in the diet as well as functional compounds in food formulations.

Keywords: Alcalase, Bioactive peptide, DPPH free radical, Protamex, Solubility, Watermelon Seed