(مقاله پژوهشی)

اثر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی

معصومه الوند[۱]، علیرضا صادقی‌ماهونک[۲*]، محمد قربانی[۳]، هدی شهیری طبرستانی[۴]، شیما کاوه[۵]

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

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

۳- دانشیار، گروه علوم وصنایع‌غذایی، دانشکده صنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴- استادیار، گروه علوم و صنایع‌غذایی، دانشکده صنایع‌غذایی، دانشگاه‌علوم کشاورزی و منابع طبیعی‌گرگان، گرگان، ایران.

۴- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان گرگان، ایران.

تاریخ دریافت:۱۳۹۹/۱۱/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۹

چکیده

هیدرولیز آنزیمی منابع پروتئینی از روش‌های معمول در فرآوری غذایی است. پروتئین هیدرولیز شده مخلوطی از پپتیدها و اسید آمینه‌هایی است که دارای خواص سلامتی‌بخش بسیاری از جمله، ضد فشار خون، ضد کلسترول و آنتی‌اکسیدان می باشند. از جمله ضایعات میوه خربزه ترکمنی دانه آن می باشد که منبعی مقرون به‌صرفه برای تولید پپتیدهای زیست فعال است. در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه خربزه ترکمنی با آنزیم‌های پانکراتین و تریپسین در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱٪ و فواصل زمانی ۲۰-۲۰۰ دقیقه انجام گردید. درجه‌ی هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهارراديكال DPPH، قدرت احیاءکنندگی یون آهن، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل) هیدرولیز شده‌های حاصل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که تیمار ۱۸۰ دقیقه در مقایسه با ۲۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشتند و به منظور جلوگیری از اتلاف زمان و ظرفیت دستگاه‌ها، تیمار با زمان پایین مدنظر قرار گرفت. بیشترین فعالیت مهارکنندگی DPPH، قدرت احیاءکنندگی آهن، آنتی-اکسیدانی کل و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل با هیدرولیز با آنزیم پانکراتین و پس از ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز و به‌ترتیب به میزان ۷۲/۴۹٪، ۰/۵۵ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و ۵۹٪ حاصل شد. بنابراین با توجه به نتایج، آنزیم پانکراتین در مقایسه با تریپسین عملکرد بهتری در تولید پروتئین هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی داشت. در نتیجه هیدرولیز شده‌ی حاصل قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان نگهدارنده‌ی طبیعی و تولید محصولات فراسودمند را دارد.

واژه های کلیدی: پانکراتین، تریپسین، دانه خربزه ترکمنی، هیدرولیز آنزیمی، آنتی‌اکسیدان

*مسئول مکاتبات: sadeghiaz@yahoo.com

۱-مقدمه

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS)[1] و رادیکال‌های‌آزاد طی فرآیندهای اکسایشی تولید می‌شوند. وجود این ترکیبات علاوه بر تغییر کیفیت محصول، توانایی تجمع در بدن و ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، آرتروز، دیابت و پیشرفت پیری را نیز دارند. مهار رایکال آزاد نقش اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها است که مسئول جلوگیری از مهاجرت رادیکال آزاد و انتقال اتم هیدروژن هستند (۵۲). به‌دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی و سلامت بلندمدت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند TBHQ[2]، BHA[3] وBHT[4] وجود دارد، تقاضای برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ایمن همچون پپتیدهای زیست فعال به شکل گسترده‌ای افزایش پیدا کرده است (۴۹). افزایش تقاضا برای ترکیبات زیست فعال منجربه افزایش توجه محققین به شناسایی و استخراج پپتیدهای زیست فعال از منابع حیوانی و گیاهی شده است. پپتیدهای زیست فعال بعنوان اجزاء پروتئینی شناخته می‌شوند که در پروتئین اولیه غیرفعال هستند و پس از آزادسازی از طریق هیدرولیز، تخمیر و یا هضم توسط آنزیم‌های گوارشی عملکردهای فیزیولوژیکی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. پپتیدهای زیست فعال دارای ۲۰-۲ آمینواسید و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون هستند (۲۵). عملکرد آن‌ها تحت تاثیر ترکیب و توالی آمینواسیدی آن‌ها قرار می‌گیرد. بنابراین بر اساس ویژگی‌های ساختاری، ترکیب و توالی آمینواسیدی این پپتیدها دارای نقش‌های متفاوتی مانند تقویت کنندگی سیستم ایمنی بدن، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضدفشارخون، ضد کلسترول و ضد ترومبوز هستند (۵۱). عمل هیدرولیز به شکسته شدن پروتئین‌ها به اسیدآمینه آزاد و پپتید با اندازه متفاوت اطلاق می‌گردد. هیدرولیزآنزیمی پروتئین‌ها توسط آنزیم‌هایی با منشا حیوانی مثل پپسین، منشا گیاهی مثل پاپائین، منشا میکروبی، تخمیر میکروبی و یا توسط تیمار شیمیایی توسط اسید/ قلیا صورت می‌گیرد که در بین آن‌ها هیدرولیز آنزیمی متداول‌تر است زیرا ملایم‌تر بوده و نابودی اسیدهای‌آمینه اتفاق نمی‌افتد (۴۲). پانکراتین مخلوطی از آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و کربوکسی‌پپتیداز است. این آنزیم توسط سلول‌های برون ریز لوزالمعده ترشح می‌شود و دارای حداکثر فعالیت در pH قلیایی است. عملکرد بسیار اختصاصی این آنزیم نسبت به پیوندهای پپتیدی منجر به کاربرد گسترده‌ی آن در هیدرولیز پروتئین‌ها و تولید پپتیدهای زیست فعال گشته است (۳۰). تریپسین به‌عنوان آنزیم گوارشی و دارای حداکثر فعالیت در pH= ۸ است، که پیوند پپتیدی را بعد از اسیدآمینه بازی آرژنین و لایزین می‌شکند. از این‌رو به‌دلیل اختصاصی بودن متفاوت آنزیم‌ها، مکان هضم تعیین‌کننده نوع پپتید آزاد شده در طی هضم گوارشی و در نتیج ەمشخص‌کننده خصوصیات فیزیولوژیکی آن است (۲۴).پژوهش مهرگان نیکو و همکاران (۱۳۹۲) در تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس (*Carassius carassius*) نشان داد که بالاترین قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده ۰/۵۱۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به دست آمد (۱۰). کاوه و همکاران (۱۳۹۷) با مقایسه‌ی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله با آلکالاز و پانکراتین بیان کردند که خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی شنبلیله، به درجه-ی هیدرولیز نمونه‌ها بستگی دارد و با افزایش درجه‌ی هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها (قدرت مهار رادیکال DPPH، مهار رادیکال هیدروکسیل، شلاته‌کنندگی یون آهن، احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل) به‌میزان قابل توجهی افزایش‌یافت (۸). پدرام نیا و همکاران (۱۳۹۶) قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده دانه‌هندوانه (*Citrullus Lanatus*) تهیه شده توسط آنزیم آلکالاز و پپسین را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد پروتئین هیدرولیزشده تهیه شده توسط آلکالاز با فعالیت آنزیمی۶۰ آنسون بر کیلوگرم پروتئین و زمان ۱۱۶/۱۲ دقیقه دارای بیشترین قابلیت شلاته‌کنندگی (۷۸/۰۸ ٪) بود (۳). منابع گیاهی و حیوانی مختلفی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفته‌اند از جمله: مشکین فر و همکاران (۲۰۱۶)، شریعت علوی و همکاران (۱۳۹۷)، صادقیان و همکاران (۱۳۹۸)، سرابندی و همکاران (۱۳۹۷) و مظلومی و همکاران (۱۳۹۸) به ترتیب بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های ضایعات کشتاری، دانه گوجه‌فرنگی، کینوآ، کازئین شیر و دانه پرتقال بررسی و تحقیق انجام داده‌اند(۳۱ و ۵ و ۷ و ۴ و ۹). منابع گیاهی به دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر نسبت به منابع حیوانی، بیشتر مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته‌اند (۲۹). صیفی‌جات (کدو، هندوانه ، خربزه، طالبی) از عمده‌ترین محصولات کشاورزی ایران می‌باشد (۶) خربزه ترکمنی با نام علمی (*Cucumis melo var. reticulata*) از خانواده کدوییان (*Cucurbitaceae*) و از جمله محصولات

1- Reactive Oxygen Species
2-Tert Butyl Hydroquinone
3-Butylated Hydroxy Anisole
4-Butylated Hydroxy Touene

دارای خواص دارویی و تغذیه بالایی می‌باشد که غنی از پروتئین، چربی، کربوهیدرات و همچنین عناصر معدنی بخصوص آهن، سدیم و پتاسیم است (۲). این دانه با دارا بودن آنتی-اکسیدان‌های طبیعی می‌تواند به‌عنوان منبعی غنی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زا در صنایع‌غذایی کاربرد گوناگون داشته باشد. دانه‌های محصولاتی مانند خربزه به جز در موارد اندک مصرف آجیلی و خوراک دام مصرف دیگری نداشته و به عنوان ضایعات به‌هدر می‌روند بنابراین اعمال فرایندهای تکمیلی بر روی این ضایعات و تولید فرآورده‌های مختلف با ارزش افزوده بالا راهکاری مفید در کاهش دورریز این مواد و افزایش بازده اقتصادی می‌باشد (۶ و۵۰). بنابراین هدف از این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه خربزه ترکمنی با آنزیم‌های پانکراتین و تریپسین در مدت زمان ۲۰۰-۲۰ دقیقه بود. سپس پس از محاسبه میزان درجه هیدرولیز، مقایسه‌ویژگی‌های‌آنتی-اکسیدانی (فعالیت مهارکنندگی DPPH، قدرت احیاءکنندگی، آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت مهارادیکال هیدروکسیل) هیدرولیز شده‌های حاصل با ویتامین ث انجام شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پانکراتین، تریپسین، تری کلرواستیک اسید، پتاسیم فری سیانید، کوماسی بریلیانت بلو (G250)، DPPH، فریک کلراید، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما و سود، اسیدکلریدریک، اتانول ۹۶٪، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسیدفسفریک، سدیم فسفات و آمونیوم مولیبدات از شرکت مرک و دانه خربزه ترکمنی از گرگان، شهرستان گنبد خریداری شدند.

۲-۲- چربی‌گیری از دانه

۲۰۰گرم دانه خربزه ترکمنی خشک شده آسیاب و سپس با حلال هگزان به نسبت ۱:۱۰(حجمی- وزنی) مخلوط و به‌مدت ۴ ساعت توسط شیکر با سرعت ۴۴۰ دوردردقیقه هم زده‌شد. در ادامه حلال باقی مانده به وسیله آون تحت خلا و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت از آن جدا شد. سپس پودر حاصل از الک با مش ۴۰ عبور داده‌شد (۲۲).

۲-۳- استخراج پروتئین

دانه خربزه به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط و pH آن با سود ۱ نرمال روی ۱۰ تنظیم و به‌مدت ۱ ساعت هم‌زده‌شد. محلول حاصل با سرعت ۵۰۰۰ دوردردقیقه به‌مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس pH سوپرناتانت روی ۴ (pH ایزوالکتریک) تنظیم شد و در ۵۰۰۰ دوربردقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. رسوب حاصل (ایزوله پروتئین) با آب مقطر دو بار شسته و در ۵۰۰۰ دوربردقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ایزوله‌پروتئینی حاصل با خشک‌کن انجمادی، (مدل FD4 ، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی)، خشک و تا آغاز آزمون ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری‌شد (۴۰).

۲-٤- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC 2008، انجام شد. برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با استفاده از کوره‌الکتریکی (ساخت آلمان، نابرترم، FX118-30) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آون ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد (۱۳).

۲-۵- هیدرولیز آنزیمی

جهت تهیه‌ی پروتئین هیدرولیز شده از ایزوله‌ی پروتئینی دانه خربزه ترکمنی از آنزیم‌های تریپسین و پانکراتین در شرایط بهینه‌ی فعالیت هر یک از آنزیم‌ها استفاده شد (جدول۱). ایزوله پروتئینی در غلظت ۵٪ در بافر فسفات (۰/۲ مولار) درون ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتری حل و امکان هیدراته شدن کامل آن با همزدن مداوم به‌مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط فراهم شد. پس از رسیدن دمای انکوباتور به دمای بهینه‌ی هر یک از آنزیم‌ها، ارلن ها درون انکوباتور قرار داده‌شد آنزیم‌ها به نسبت ۱٪ به محلول اضافه شد. فرآیند هیدرولیز در شرایط همزدن مداوم با دور ۲۰۰ دوربردقیقه در فواصل زمانی ۲۰ تا۲۰۰ دقیقه انجام شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به منظور غیرفعال سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده‌شده و سپس، بااستفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ بردقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و سوپرناتانت جدا و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۱۱).

جدول ۱-شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین ایزوله خربزه ترکمنی

آنزیم	pH	دما	بافر ۰/۲ مولار
پانکراتین	۷/٤	٤۰	K_2HPO_4-KH_2PO_4
تریپسین	۸	۳۷	K_2HPO_4-KH_2PO_4

۲-٦- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین‌هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴ مولار) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه‌در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس، مخلوط در۱۰۰۰ دوربردقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ مولار با روش بردفورد (۱۹۷۶) تعیین گردید. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول (۱) تعیین شد (۱۶)

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

۲-۷- فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH[1]

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) حل شد. سپس، ۱/۵میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط و به-مدت ۲۰ ثانیه مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ دوربردقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و سپس، جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومترخوانده‌شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول (۲) محاسبه شد (۴۵).

$$I\ (\%) = [\frac{Ablank - Asample}{Ablank}] \times 100$$

۲-۸- تعیین قدرت احیاءکنندگی

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت۴۰ میلی‌گرم / میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (۰/۲ مولار pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱٪ (حجمی-وزنی) مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس۰/۵میلی‌لیترمحلول تری‌کلرو استیک اسید ٪۱۰ به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دوربردقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ ٪ (حجمی- وزنی) مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده‌شد. حجم یکسانی آب مقطر به‌جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (۱۲).

۲-۹- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر مبنای احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است. در این روش ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به‌مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس‌از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (۳۸).

۲-۹-فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

ابتدا ۱ میلی‌لیتر از ۱ و ۱۰ فنانترولین (۱/۸۶۵ میلی‌مولار) و ۲ میلی‌لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از محلول $FeSo_4.7H_2O$ (۱/۸۶۵ میلی‌مولار) مخلوط شدند سپس ۱میلی‌لیتر H_2O_2 (٪۰/۰۳وزنی- حجمی) به مخلوط اضافه شد. بعداز انکوباسیون‌به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد،

1- 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl Diphenylpicrylhydrazyl

جذب مخلوط در ۵۳۶ نانومتر خوانده شد. مخلوط بدون هیچ آنتی‌اکسیدان به‌عنوان کنترل منفی و مخلوط بدون H_2O_2 به‌عنوان بلانک استفاده شد.(۲۰) قدرت مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (۳):

$$HRSA(\%)=\frac{(As-An)}{(Ab-An)}\times 100$$

A_s جذب نمونه، A_b جذب بلانک، A_n جذب کنترل منفی می‌باشد.

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش مقایسه اثر متقابل زمان‌های مختلف هیدرولیز (۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه) با آنزیم پانکراتین و ترپسین بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با کاربرد طرح فاکتوریل و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرارگرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در $P<$ ۰/۰۵ و رسم نمودارها نیز با نرم افزار Excel 2013 انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز ترکیبات شیمیایی دانه خربزه ترکمنی

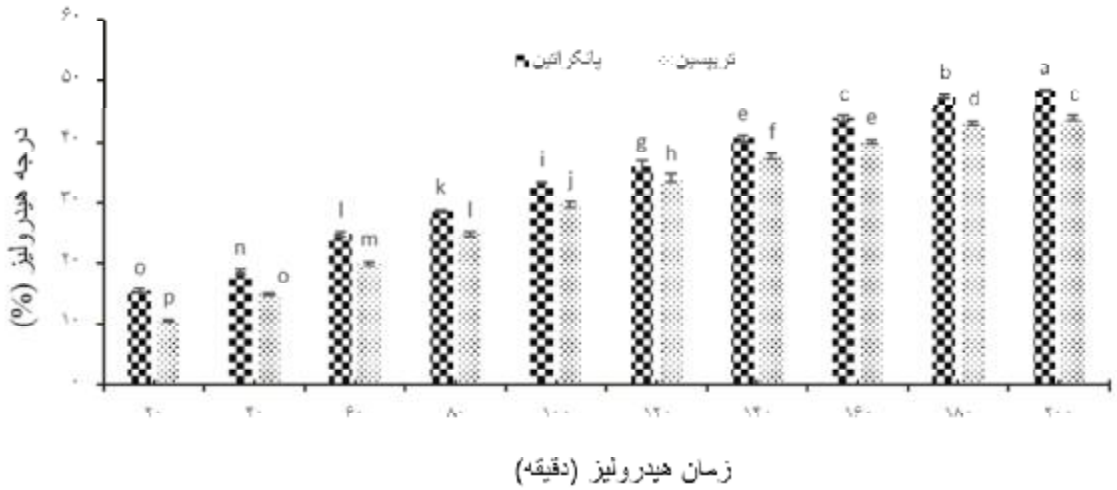
میزان خاکستر، رطوبت، چربی و پروتئین پودر چربی‌گیری شده و چربی‌گیری نشده و ایزوله پروتئین حاصل در جدول ۲ ذکر شده است. با توجه به جدول ۲ عمل چربی‌گیری کنجاله موجب کاهش چربی ایزوله پروتئین (از ۱۷/۵ ٪ در کنجاله چربی‌گیری نشده به ۵/۶۰ ٪ در ایزوله پروتئینی دانه خربزه ترکمنی) شد. علت کاهش میزان چربی ایزوله پروتئینی نسبت به کنجاله، به دلیل فرآیند چربی‌گیری با هگزان، استخراج پروتئین در محلول قلیایی و ترسیب در نقطه ایزوالکتریک می‌باشد. کارایی مناسب هگزان به‌عنوان یک حلال در فرآیند چربی‌گیری کنجاله خربزه ترکمنی منجر به کاهش قابل ملاحظه چربی در ایزوله حاصل شده است. براساس آنالیز نتایج (جدول۲) کمترین میزان رطوبت مربوط به ایزوله پروتئینی حاصل بود که به دلیل استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد جهت خروج باقی‌مانده‌ی هگزان پس از فرآیند چربی‌گیری و همینطور استفاده از خشک‌کن انجمادی جهت خشک‌کردن رسوب پروتئینی حاصل پس از فرآیند استخراج پروتئین می‌باشد. مقدار پروتئین در دانه کامل، ۲۸/۷۲ ٪ بود که این میزان به میزان قابل ملاحظه‌ای بیشتر از مقدار پروتئین گزارش شده توسط انیکه و آچرو (۲۰۰۴) و تقریبا با میزان گزارش شده توسط شهیدی و همکاران (۱۳۸۵) یکسان بود (۳۴ و ۶). میزان پروتئین پودر چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئینی به ترتیب ۴۰/۶۹ ٪ و ۹۸/۱۵ ٪ بود. بیشترین و کمترین میزان خاکستر به‌ترتیب مربوط به پودر چربی‌گیری نشده و ایزوله پروتئینی بود که این امر به دلیل فرآیند استخراج پروتئین می‌باشد که مقدار زیادی از ترکیبات غیرپروتئینی در pH=۱۰ رسوب نموده و جداسازی می‌شوند.

جدول۲- ترکیبات شیمیایی دانه کامل، آرد چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئینی خربزه ترکمنی

	پروتئین (٪)	رطوبت (٪)	چربی (٪)	خاکستر(٪)
دانه کامل	٪ ۲۸/۷۲	٪ ۸/۵	٪ ۱۷/۵	٪ ٦/۲
آرد چربی‌گیری‌شده	٪ ٤۰/٦۹	٪ ٦/۳۳	٪ ۸/۳۲	٪ ۳/۵
ایزوله پروتئینی	٪ ۹۸/۱۵	٪ ٤/۱۸	٪ ۵/٦	٪ ۲/۱۲

۳-۲- درجه هیدرولیز

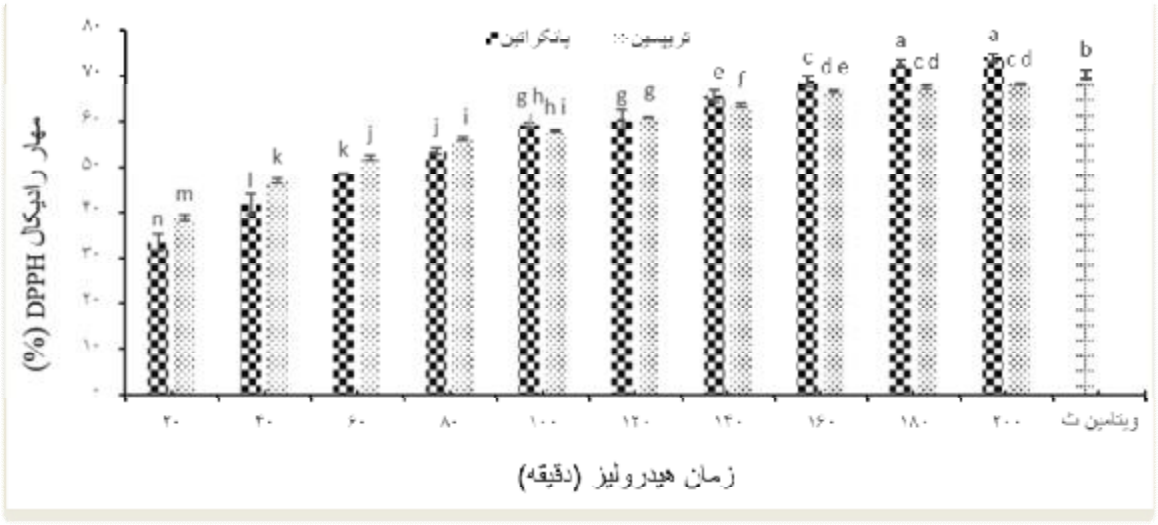
درجه هیدرولیز به‌معنای میزان شکستن ساختار پروتئینی و در نتیجه تولید پپتید و اسیدهای‌آمینه می‌باشد. تخریب ساختار طبیعی پروتئین‌ها در اثر هیدرولیز آنزیمی منجر به بازشدن ساختار و در معرض قرارگیری گروه‌های فعال آمینواسیدی که قابل واکنش با رادیکال‌های آزاد می باشند، خواهدشد (۲۴). شکل ۱، تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم برمیزان درجه هیدرولیز پروتئین دانه خربزه ترکمنی نشان می‌دهد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه درمورد آنزیم پانکراتین اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و از نظر اقتصادی و به‌منظور جلوگیری از اتلاف زمان و ظرفیت دستگاه‌ها، می بایست تیمار با مقدار بیشینه و با زمان پایین‌تر را مدنظر قرار داد. با توجه به شکل ۱ با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه میزان درجه هیدرولیز به طور معناداری افزایش یافت از سوی دیگر در تمامی زمان‌های هیدرولیز میزان درجه هیدرولیز حاصل از پانکراتین به‌طور معنی‌داری بیشتر از تریپسین بود. بیشترین(۴۷/۳۷٪) و کمترین (۱۰/۵۳ ٪)، میزان درجه هیدرولیز به‌ترتیب مربوط به هیدرولیز شده‌ی پانکراتین پس از ۱۸۰ دقیقه و هیدرولیز شده‌های تریپسین پس از ۲۰ دقیقه هیدرولیز بود. به‌طورکلی با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچک‌تر با وزن مولکولی کمتر و زنجیره کوتاه‌تر می‌گردد (۴۶). سوئیسی و همکاران (۲۰۰۷) نیز اثر آنزیم آلکالاز را بر درجه هیدرولیز پروتئین‌های امعاء و احشاء ماهی ساردین مورد بررسی قرار دادند و بیشترین میزان درجه هیدرولیز را در زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده نمودند (۴۱). این نتایج مشابه گزارشات اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹)، جامدار و همکاران (۲۰۱۰)، کریتینسون و راسکو (۲۰۰۰)، موتیلانگی و همکاران (۱۹۹۵) و یو و همکاران (۲۰۰۹) می‌باشد که به‌ترتیب اثر آنزیم‌های مختلف را بر ضایعات ماهی تون (آلکالاز)، بادام زمینی (آلکالاز)، ماهی سالمون (آلکالاز، فلاورزیم و کرولازو)، آب پنیر (تریپسین، کیموتریپسین، آلکالاز و نوترئاز) و ماهی تیان (پاپائین و پروتامکس) بررسی کردند (۳۵ و ۲۵ و ۲۷ و ۳۲ و ۴۸).



شکل۱- تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی
(ستون‌ها با حروف یکسان اختلاف معناداری ندارند ($p<0.005$)

۳-۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

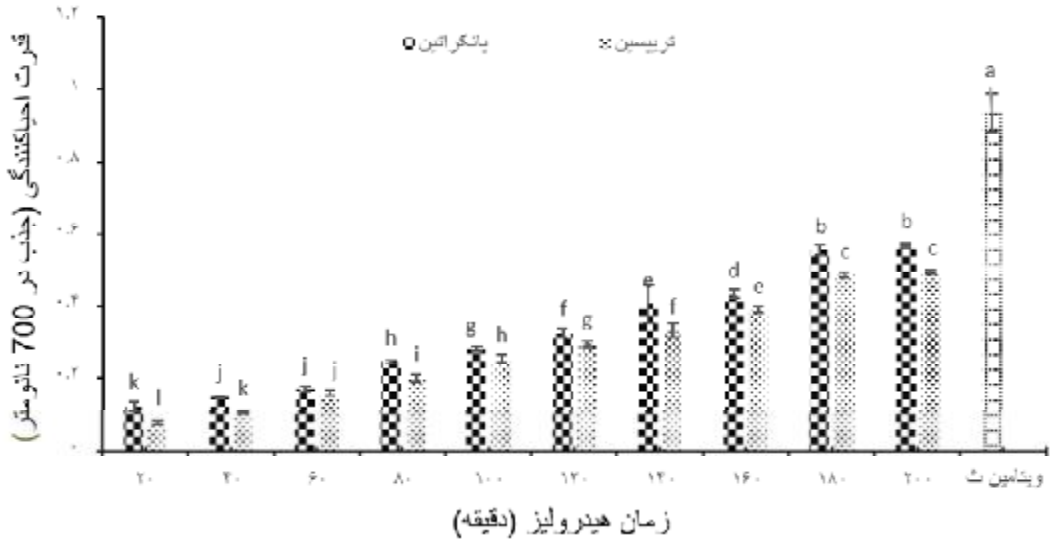
به‌طورکلی‌این‌روش بیانگرتوانایی سوبسترا در انتقال الکترون یا اتم هیدروژن است که می‌توانند با رادیکال آزاد واکنش داده و ترکیبات پایداری تولید کنند. (۲۱). نتایج حاصل از ارزیابی زمان هیدرولیز (شکل۲) نشان می‌دهد که کم ترین قدرت مهارارادیکال DPPH مربوطبه زمان ۲۰ دقیقه به ترتیب براساس نوع آنزیم پانکراتین و تریپسین به میزان ۳۳/۲۸ ٪ و ۳۸/۷۶ ٪ بوده و با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت مهارارادیکال DPPH، پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌میزان قابل توجهی افزایش یافت ($p<۰/۰۵$)، به طوری‌که قابلیت مهارارادیکال آزاد DPPH در نمونه های هیدرولیز شده حاصل از آنزیم‌های پانکراتین و تریپسین در زمان ۱۸۰ دقیقه به‌ترتیب در محدوده۷۲/۴۹ ٪ و ۶۷/۳۰ ٪ بود. این مقدار برای نمونه کنترل (ویتامین ث در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) ۷۰/۳۵ ٪ به‌دست آمد. نتایج حاصل از آنالیز آماری نشان داد بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و بنابراین تیمار ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. از سوی دیگر با انجام هیدرولیز تا زمان ۸۰ دقیقه میزان فعالیت مهارارادیکال آزاد DPPH هیدرولیزشده‌های حاصل از تریپسین بیشتر از هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین بود و سپس با افزایش زمان هیدرولیز هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین دارای فعالیت مهارکنندگی بیشتری بودند. براساس یافته‌ها افزایش مدت زمان و درجه هیدرولیز منجر به ایجاد پپتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد که می‌توانند با انتقال هیدروژن به رادیکال DPPH، ترکیبات پایدار را تولید کنند. گزارش شده‌است که افزایش گروه‌هایی با زنجیره‌های جانبی حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب موجب سهولت دسترسی بیشتر پپتیدها جهت واکنش با رادیکال‌های آزاد DPPH می‌شوند (۵۳). نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۹) و باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌کنجاله‌دانه‌کدووضایعات نوعی ماهی (*Apanopus carb*) گزارش کردند که فعالیت مهارارادیکال DPPH با افزایش درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد که علت این امر افزایش رهاسازی پپتیدهایی با توانایی هیدروژن‌دهی و با قابلیت واکنش‌دهی با رادیکال‌های آزاد می‌باشد (۳۳ و ۱۵). جامدار و همکاران (۲۰۱۰)، طاهری و همکاران (۲۰۱۱) و مائو و همکاران (۲۰۱۱) به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های بادام زمینی، ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibbosa*)، کازئین شیر میش، رابطه‌ی مستقیمی را بین قدرت مهارارادیکال DPPH و درجه هیدرولیزگزارش کردند (۲۵ و ۴۳ و ۲۸).



شکل۲- تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر فعالیت مهارارادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی
(ستون‌ها با حروف یکسان اختلاف معناداری ندارند ($p<0.005$)

۳-٤- قدرت احیاءکنندگی

ویژگی احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده نشان‌دهنده توانایی الکترون‌دهی آن‌هاست که رادیکال آزاد را پایدار نموده و خود ترکیب آنتی‌اکسیدان مجددا می‌تواند احیاء شود (۲۳). توالی اسیدهای‌آمینه در پپتیدهای تولید شده، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی پپتیدها، در عملکرد پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها در احیای یون آهن بسیار موثر می‌باشند (۱۷). مطالعات مختلفی نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال وجود دارد (۴۷). طبق آنالیز آماری بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و تیمار ۱۸۰ دقیقه بعنوان بیشینه قدرت احیاءکنندگی در نظر گرفته‌شد. بر اساس نتایج (شکل ۳)، مشاهده می‌گردد که بیشترین وکمترین میزان قدرت احیاءکنندگی براساس نوع آنزیم پانکراتین و تریپسین به ترتیب ۰/۵۵ و ۰/۰۷ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) بود ($p<0/05$). مقدار قدرت احیاءکنندگی نمونه کنترل (ویتامین ث) (۰/۹۳) بود که در مقایسه با هیدرولیز شده‌ها پس از ۱۸۰ دقیقه مقدار بالاتری را نشان داد. از سوی دیگر مقایسه بین آنزیم‌ها نشان داد (شکل ۳)، که در تمامی زمان‌های هیدرولیز، فعالیت احیاءکنندگی هیدرولیز شده حاصل از آنزیم پانکراتین نسبت‌به تریپسین، بالاتر بود. یافته‌ها حاکی از آن است که افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجربه افزایش قدرت احیاءکنندگی می‌شود، و این امر می‌تواند به‌دلایل مختلفی باشد از جمله اینکه پیشرفت هیدرولیز باعث آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (۵۳). از طرفی دیگر افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین که عموماً از فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برخوردارند، موجب بهبود قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود. به‌طورکلی تفاوت در قدرت احیاءکنندگی نمونه‌ها را می‌توان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدها و پپتیدها مرتبط دانست (۱۹). اعتمادی و همکاران (۱۳۹۴)، یو و همکاران (۲۰۰۹)، وو و همکاران (۲۰۰۳)، به ترتیب افزایش قدرت احیاءکنندگی در پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از سویا، ماهی تیان و ماهی ماکرل را گزارش کردند (۱ و ۴۸ و ۴۵).

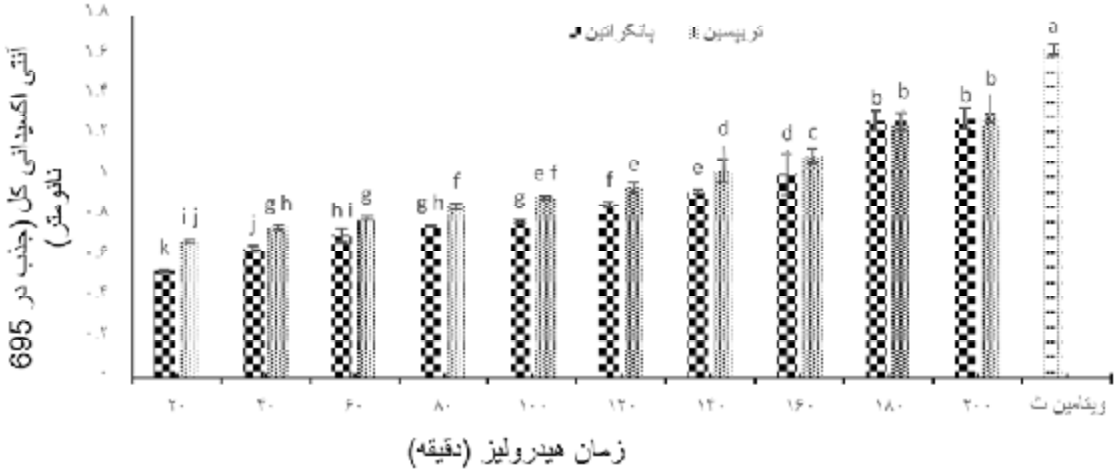


شکل۳- تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی

(ستون‌ها با حروف یکسان اختلاف معناداری ندارند ($p<0.005$)

۳-۵- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

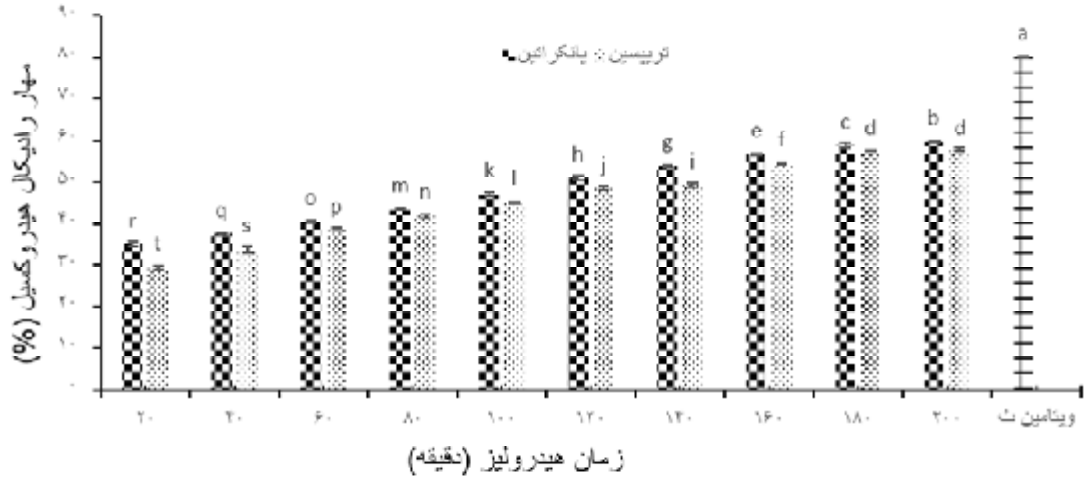
ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل روشی برای ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی است. ترکیبات با فعالیت الکترون‌دهی می‌توانند زنجیره رادیکالی را پایان داده و رادیکال آزاد فعال را به محصولات پایدارتر تبدیل کنند (۳۶). در این پژوهش، با افزایش مدت زمان تا ۱۸۰ دقیقه همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین، منجربه افزایش قابل توجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه ها شد. با توجه به آنالیز آماری (شکل ۴) بین تیمار ۱۸۰ با ۲۰۰ دقیقه در هر دو آنزیم تفاوت معنی‌داری از نظر میزان قابلیت آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد و تیمار ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار تعیین شد. بیشترین (۱/۲۷) و کمترین (۰/۵۳) فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به هیدرولیز شده‌های حاصل از آنزیم پانکراتین (جذب در ۶۵۹ نانومتر) بود (p< ۰۵/). میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برای ویتامین ث، ۱/۶۳ (جذب در ۶۵۹ نانومتر) بود. از سوی دیگر، مقایسه‌بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های هیدرولیزشده نشان داد، قدرت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای ۲۰ تا ۱۶۰ دقیقه با آنزیم تریپسین بیشتر از آنزیم پانکراتین بوده ولی با افزایش بیشتر زمان هیدرولیز از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تفاوت معناداری بایکدیگر نداشتند. این نتایج نشان می‌دهند که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، منجر به افزایش رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی می‌شود، که این پپتیدها می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به ترکیباتی پایدار تبدیل کنند، درنتیجه با افزایش مدت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافته است (۱۴). کاوه و همکاران (۱۳۹۸) با هیدرولیز پروتئین‌های شنبلیله گزارش کردند با افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم پانکراتین و آلکالاز همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها شد (۸).



شکل٤- تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی (ستون‌ها با حروف یکسان اختلاف معناداری ندارند ($p<0.005$)

۳-٦- فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل یک گونه رادیکال آزاد بسیار مخرب است و قوی‌ترین رادیکال آزاد مشتق شده از اکسیژن می باشد که می تواند تقریبا با تمام مولکول‌های بیولوژیک نظیر اسیدهای‌آمینه، پروتئین‌ها و DNA واکنش نشان دهد. از این‌رو حذف رادیکال هیدروکسیل می‌تواند به‌عنوان یکی از مؤثرترین دفاع‌های سلول زنده در برابر بیماری‌های مختلف باشد(۳۹). براساس آنالیز آماری (شکل ۵) مشاهده شد که در بین تیمارها کم‌ترین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل (۲۹/۳۶ ٪) پس از ۲۰ دقیقه هیدرولیز با آنزیم تریپسین حاصل شد. افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه منجربه افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل به‌میزان قابل ملاحظه‌ای گردید ($p<۰/۰۵$). تیمار ۱۸۰ دقیقه با ۲۰۰ دقیقه با یکدیگر اختلاف معناداری نداشته و هیدرولیز شده‌های حاصل‌از پانکراتین پس‌از ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار در نظرگرفته شدند. نتایج حاصل نشان داد، بیشینه فعالیت مهار رادیکال پس‌از ۱۸۰دقیقه با آنزیم های پانکراتین و تریپسین فعالیت مهارکنندگی به‌ترتیب به‌میزان ۵۹ ٪ و ۵۷/۴ ٪ افزایش یافت که نسبت به ویتامین ث (۸۰/۰۶ ٪) به میزان کمتری بود. ضمن اینکه مقایسه بین آنزیم‌ها (شکل ۵) در تمامی زمان‌های هیدرولیز نشان داد، فعالیت مهار رادیکال‌هیدروکسیل هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین به‌میزان قابل توجهی بیشتر از هیدرولیزشده‌های حاصل ازتریپسین بود. بنابراین پروتئین هیدرولیزشده حاصل می‌تواند پتانسیل خوبی برای کاربرد در سیستم‌های زیستی و مواد غذایی با هدف کاهش آثار مخرب رادیکال‌های آزاد داشته باشد (۲۰). این نتیجه مشابه تحقیق واندی و تاسمپو (۲۰۱۴) برروی پروتئین‌های هیدرولیزشده پوست بلوط است. آن‌ها بیان کردند افزایش زمان هیدرولیز و در نتیجه افزایش درجه هیدرولیز باعث تغییر در ترکیب و اندازه آمینواسیدی پپتیدها می‌شود و در نتیجه خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌هاافزایش‌می‌یابد(۴۴). افزایش آمینواسیدها و گروه‌های فعال پس از انجام فرآیند هیدرولیز منجربه افزایش قابل توجه در توانایی آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده می‌گردد (۳۷). ثابت شده است که آمینواسیدهای آروماتیک مانند تریپتوفان با قابلیت پروتون‌دهی به‌رادیکال‌های آزاد دارای فعالیت ضداکسایشی در سیستم‌های غذایی هستند (۱۸). یو و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که فرآیند هیدرولیز آنزیمی به‌طور معنی‌داری‌منجربه‌افزایش‌فعالیت مهار رادیکال هیدروکسل پروتئین‌ماهی *Misgurnus anguillicaudatus* شد و با افزایش درجه هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال هیدروکسیل به ۵۶٪ رسید (۴۸). این نتایج مطابق با یافته‌های صادقیان و همکاران (۱۳۹۸)، یانگ جی و همکاران (۲۰۰۹) و ژی و همکاران (۲۰۰۸) است که به‌ترتیب هیدرولیز پروتئین‌های کینوا، پروتئین‌های جگر ماهی تن و گیاه Alfalfa را مورد بررسی قرار دادند (۷ و ۲۶ و ۴۶).



شکل ۵- تاثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی (ستون‌ها با حروف یکسان اختلاف معناداری ندارند ($p<0.005$)

٤-نتیجه‌گیری

امروزه به‌منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در برابر بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که از اکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال آزاد به وجود آمده در فرآورده غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود که از جمله راهکارهای موجود استفاده از آنتی‌اکسیدان هاست. ازطرفی با توجه به گرایش مصرف‌کنندگان به سمت غذاهای فراسودمند و نگرانی‌هایی که در زمینه آنتی اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، منجربه افزایش توجه پژهشگران به سمت آنتی‌اکسیدان های طبیعی گشته است. پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. دانه خربزه ترکمنی می‌تواند بعنوان منبعی غنی از مواد مغذی و ترکیبات زیست فعال در صنایع‌غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد. در این پژوهش هیدرولیز پروتئین دانه خربزه ترکمنی با پانکراتین و تریپسین با نسبت ۱٪ (نسبت آنزیم به سوبسترا) انجام شد. نتایج نشان داد که، خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی دانه خربزه ترکمنی، به درجه‌ی هیدرولیز نمونه‌ها بستگی دارد و با افزایش درجه‌ی هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها تا ۱۸۰ دقیقه (قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت احیاءکنندگی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل) به‌میزان قابل توجهی افزایش یافت و هیدرولیزشده‌های‌حاصل از پانکراتین، فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به تریپسین از خود نشان دادند. بنابراین می توان نتیجه گرفت که هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانه خربزه ترکمنی تا ۱۸۰ دقیقه با آنزیم پانکراتین راهکاری مناسب جهت تولید پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌باشد.

٥- منابع

١. اعتمادی، م.، صادقی ماهونک، ع. ر.، قربانی، م. و مقصودلو، ی. ١٣٩٤. تولید و بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاءکنندگی پروتئین-های هیدرولیز شده حاصل از پروتئین سویا. *نشریه علوم غذایی و تغذیه*، جلد۱۳، شماره ۱، ٦٥-٧٤.

٢. بهرامی‌سیرمندی، ح.، حسن‌زاده، ر. و بهرامی‌سیرمندی، س. ١٣٩٢. راهنمای جامع و مصور کشت و پرورش صیفی‌جات. *انتشارات تحقیقات، آموزش کشاورزی و منابع طبیعی (تاک)*، صفحات ١٣٠- ١٠٥.

٣. پدرام‌نیا، ا.، مرتضوی، ع.، صادقی ماهونک، ع. ر.، الهامی راد، ا. و آرمین، م. ١٣٩٦. بهینه‌سازی تولید پروتئین‌هیدرولیزشده دانه‌هندوانه (*Citrullus lanatus*) با ارزیابی فعالیت شلاته‌کنندگی با استفاده از روش سطح پاسخ. *نشریه نوآوری در علوم و فناوری‌غذایی*، جلد ۹، شماره ٤، ١٣٣-١٢٣.

٤. سرابندی، خ.، صادقی ماهونک، ع. ر.، همیشه کار، ح.، قربانی، م. و جعفری، م. ١٣٩٧. اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی کازئین با پانکراتین بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی کازئین هیدرولیز شده. *مجله علوم و صنایع‌غذایی*، جلد۱۵، شماره ۸۰، ۳۱۸-۳۰۳.

٥. شریعت‌علوی، م.، صادقی ماهونک، ع. ر.، قربانی، م.، اعلمی، مهران. و محمدزاده، ج. ١٣٩٧. تعیین شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیزشده با قابلیت آنتی‌اکسیدانی و کاهندگی نیتریک‌اکسید از ضایعات گوجه‌فرنگی توسط آلکالاز. *مجله علوم و صنایع‌غذایی*، جلد ۱۵، شماره ٨٤، ١٥١-١٣٧.

٦. شهیدی، ف.، کوچکی، آ. و بقایی، ه. ١٣٨٥. بررسی برخی ترکیبات شیمیایی و خواص فیزیکی دانه‌ی هندوانه، کدو، طالبی و خربزه بومی ایران و تعیین ویژگی‌های شیمیایی روغن حاصل از آن ها. *مجله علوم و صنایع کشاورزی*، جلد۲۰، شماره۵، ٤٢١-٤١١.

۷. صادقیان‌امین، ی.، صادقی‌ماهونک، ع. ر.، قربانی، م.، اعلمی، م. و جوشقانی، ح. ۱۳۹۸. اثر زمان فرآیند بر ویژگی‌های عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌هیدرولیزشده کینوا با الکالاز و پانکراتین. *مجله علوم تغذیه و صنایع-غذایی*، جلد ١٤، شماره ٤، ١٠٢-٨٩.

۸. کاوه، ش.، صادقی ماهونک، ع. ر.، قربانی، م. و سرابندی،خ.مقایسه‌ی ویژگی‌های‌آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌هیدرولیزشده دانه شنبلیله با آلکالاز و پانکراتین. ۱۳۹۷. *نشریه ی نوآوری در علوم وفناوری‌غذایی*، جلد۱۱، شماره ٤، ۸۸-۷۷.

۹. مظلومی، ن.، صادقی ماهونک، ع. ر.، قربانی، م. و هوشمند، غ. ر. ۱۳۹۸. تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیزپروتئین هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز. *مجله علوم و صنایع‌غذایی*، جلد ١٦، شماره ٨٨، ٣٥٦-٣٤٣.

۱۰. مهرگان‌نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع. ر.، قربانی، م.، طاهری، ع.، اعلمی، م. وکمالی، ف. ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس*(Crassius crassius)*. *نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع‌غذایی*، جلد ۲، شماره ٤، ٣٦٤- ٣٥١.

11. Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. and Agboola, S. 2014. Whey protein peptides as components of Nano emulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122: 15–27.
12. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. In model and food systems. *Food Chemistry*, 105: 57–64.
13. AOAC. Official methods of analysis (18th ed). 2008. *Association of Official Analytical Chemists Washagton*, DC 47.
14. Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A. 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4): 1233-1240
15. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. and Nunes, M. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18-24
16. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72: 248–54.
17. Centerano, G.C., Mellado, M.S. and Prentice-Henandez, C. 2011. Antioxidant Activity of protein Hydrolysates of Fish and Chicken Bones. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4): 280-288.
18. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. 1996. Antioxidant activity of designed peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 44(9): 2619-2623
19. Chen, H. M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K. and Nokihara, K., 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of agricultural and food chemistry*, 46(1): 49-53
20. Chi, C. F., Hu, F. Y., Wang, B., Li, T. and Ding, G. F. 2015. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (Tegillarca granosa) muscle. *Journal of Functional Foods,* 15: 301-313.
21. de Queioz, A. L. M., Bezerra, T., Kenia, A., de Freitas Pereira, S., da sliva, M. E. C., de Almeida Gadelha, C.A. and et al. 2017. Functional protein hydrolysate from goat by-products: Optimization and characterization studies. *Food Bioscience*, 20:19-27.

Science and Technology, 41(10): 1973-1977.
31. Meshginfar, N., Sadeghi Mahoonak, A. R., Ghorbani, M. and Aalamai, M. 2016. Effects of protein hydrolysate from sheep visceral on oxidative stability of soybean oil and chicken sausage. *Journal of Food Processing and Preservation* ISSN, 42(2): 234-247.
32. Mutilangi, W. A. M., Panyam, D. and Kilara, A. 1995. Hydrolysates from Proteolysis of Heat-denatured Whey Proteins. *Journal of food science*, 60(5): 1104-1109.
33. Nourmohammadi, E. and Mahoonak, A. R. 2019. Health implications of bioactive peptides: A Review. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 88(5): 319-343.
34. Onyeike. E. N. and Acheru. G. N. 2004. Chemical composition of selected Nigerian oil seeds and physicochemical properties of the oli extracts. *Food Chemistry*, 77: 431-437
35. Oveisi pour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H. 2009.The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties ofproteinhydrolysates from the Persian sturgeon (Acipenserpersicus) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
36. Pan, X., Zhao, Y.-Q., Hu, F.-Y., Wang, B. 2016. Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (Raja porosa) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25: 220-230.
37. Pihlanto A. 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal,* 16: 1306–14.
38. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, 269: 337–41.
39. Qian, Z.J., Jung, W. K., Byun, H. G. and Kim, S. K. 2008. Protective effect of an ant oxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, Crassostreagigas against free radical
22. Feyzi, S., Varidi, M., Zareb, F. and Varidi, M. J. 2015. Extraction Optimization of Fenugreek Seed Protein, *science of food and agriculture*, 15: 3165–3176.
23. Garcia-Moreno, P. J., Guadix, A., Guadix, E. M. and Jacobsen, C. 2016. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 203: 124-135.
24. Jahan-Mihan, A., Luhovyy, B. L. and El Khoury, D. 2011. Anderson, G.H. Dietary proteins as determinants of metabolic and physiologic functions of the gastrointestinal tract. *Nutrients*, 3: 574–603. [CrossRef]
25. Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. 2010. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry,* 121: 178-184.
26. Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H. and Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9): 1266-1272.
27. Kristinsson, H. G., Barbara, A. and Rasco, B. A. 2000. Kinetics of the hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle proteins by alkaline proteases and a visceral serine protease mixture. *Process Biochemistry*, 36(1): 131-139.
28. Mao, W. Y., Cheng, X., Wang, X. and Wu, S. I. 2011. Free-radical-scavering and anti-inflammatory effect of yek milk casein before and after enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 126: 484-490
29. Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 3444–3452.
30. Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. and Vioque, J. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. *LWT-Food*

Bilaloglu, V. 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of tilia (Tilia argentea Desf Ex DC), sage (Salvia trilobaL.) and black tea (Camellia sinensis) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 5030–5034

48. You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B. 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (Misgurnus anguillicaudatus) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10: 235–40.
49. Yu, L., Haley, S., Perret, J., Harris, M., Wilson, J. and Qian, M. 2002. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 1619–1624.
50. Zeb A. 2016. Phenolic profile and antioxidant activity of Melon (*Cucumis melo* L.) seeds from Pakistan. *Foods*, 5: 67–74.
51. Zhang, Q., Wu, C., Fan, G., Li, T. and Sun, Y. 2018. Improvement of antioxidant activity of Morchella esculenta protein hydrolysate by optimized glycosylation reaction, CYTA - *Journal of Food*, 16(1): 238-246.
52. Zou, Y., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., Zhang, D., Zou, Y., Zhang, M., Zhao, T., Mao, G., Feng, W., Wu, X. and Yang, L. 2016. Physicochemical, functional properties and antioxidant activities of porcine cerebral hydrolysate peptides produced by ultrasound processing. *Process Biochemistry*, 51: 431-443.
53. Zhu, L., Chen, J., Tang, X. and Xiong, Y. L. 2008. Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *56*(8): 2714-2721.

induced DNA damage. *Bioresource Technology*, 99: 3365-3371.

40. Siddeeg, A., Xu, Y. Jiang, Q. Al-Farga, A. and Wenshui, X. 2015. Influence of Enzymatic Hydrolysis on the Nutritional, Functional and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates Prepared from Seinat (Cucumis melo var. tibish) Seeds, *Journal of Food and Nutrition Research*, 3(4): 259-266.
41. Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella by- Product hydrolysate. *Food Technology*, 45 (2): 187- 194.
42. Taha, S. F., Mohamed, S. S., Wagdy M. S. and Mohamed, F. G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. *World Applied Sciences Journal*, 21: 651- 658.
43. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Habibi-Rezaei, M. 2011. Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolisis: Optimizition by Response Surface Methodology Using Alcalase®2.4L. *International Journal of Food Engineering*, 7(5): 1556-3758
44. Vanvi, A and Tsopmo, A. 2016. Pepsin Digested Oat Bran Protein: Separation, Antioxidant Activity, and Identification of New Peptides. *Hinawi Publishing Corporation Journal of Chemistry*, 8. Http://dx.doiorg/10.1155/2016/821637 8.
45. Wu H. C, Chen H.M. and Shiau C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). *Food Research International*, 36 (9-10): 949-957.
46. Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 111(2): 370-376.
47. Yildirim, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F. and

(Original Research Paper)

Effect of Enzyme Type and Hydrolysis Time on Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein

Masoomeh Alvand[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2*], Mohammad Ghorbani[3], Hoda Shahiri Tabarestani[4], Shima kaveh[5]

1- M.Sc Student of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2- professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
3- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
5- Ph.D Student of Food Chemistry, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 31/01/2021 Accepted:19/05/2021

Abstract

Enzymatic hydrolysis of protein sources is a common method in food processing. Hydrolyzed protein is a mixture of peptides and amino acids that have many health properties including anti-hypertensive, anti-cholesterol and antioxidant. Turkmen melon seed is one of the fruit by-product which can be a cost-effective source for the production of bioactive peptides. In this study, enzymatic hydrolysis of Turkmen melon seed protein with pancreatin and trypsin enzymes in enzyme to substrate ratio of 1% and time intervals of 20-200 minutes was performed. The degree of hydrolysis and antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, Fe^{3+} reducing power, total antioxidant activity and hydroxyl radical scavenging activity) of the obtained hydrolysates were investigated. The results showed that with increasing the hydrolysis time up to 180 minutes, the degree of hydrolysis increased significantly and after that no significant differences was observed in this factor. The maximum DPPH scavenging activity, Fe^{3+} reducing power and hydroxyl radical scavenging activity were obtained by hydrolysis with pancreatin enzyme and after 180 minutes of hydrolysis and were 72.49%, 0.55 (adsorption at 700 nm) and 59%, respectively. The maximum total antioxidant activity of pancreatin and trypsin hydrolysates was obtained after hydrolysis at 180 minutes and there was no significant difference between them. According to the results, compared to trypsin, pancreatin enzyme showed a better performance in the production of protein hydrolysate with maximum antioxidant properties. As a result, the resulting hydrolysates, can be used in food formulation as a natural preservative and the production of functional products.

Keywords: Pancreatin, Trypsin, Turkmen Melon Seeds, Enzymatic Hydrolysis, Antioxidant

*Corresponding Author: sadeghiaz@ yahoo.com