تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد ۲۱/ شماره ۷۳ پاییز و زمستان ۱۴۰۱/ص۷۵-۹۰
سایت مجله: https://fooder.areeo.ac.ir

نوع مقاله: علمی-پژوهشی

مقایسه ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه خربزه ترکمنی توسط پانکراتین و آلکالاز

معصومه الوند [۱]، علیرضا صادقی ماهونک*[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
۲*-۳ -۴ – بترتیب استاد، دانشیار، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۵- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۲/۴ ؛ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۵/۲

چکیده

درسال‌های اخیر به‌دلیل نگرانی‌های مرتبط با ایمنی و سلامت آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، توجه گسترده‌ای به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است. پپتیدهای زیست فعال یکی از انواع این آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند. دانهٔ خربزهٔ ترکمنی منبع غنی از پروتئین است. هدف این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانهٔ خربزهٔ ترکمنی با آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز در نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ درصد و فواصل زمانی ۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه است. درجهٔ هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های حاصل بررسی و نشان داده شد که با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۲۰ دقیقه، درجهٔ هیدرولیز افزایش می‌یابد و هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز دارای درجهٔ هیدرولیز بالاتری هستند، اما افزایش هیدرولیز تا ۲۰۰ دقیقه منجر به افزایش درجهٔ هیدرولیز هیدرولیزشده‌های پانکراتین، نسبت به آلکالاز، شده است. مقایسهٔ بین اغلب هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین و آلکالاز در زمان ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان نداد (در زمینهٔ فعالیت مهارراديکال آزاد DPPH هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز، تیمار ۱۶۰ دقیقه تیمار بهینه تعیین شد). بیشترین فعالیت مهارکنندگی DPPH، آنتی‌اکسیدانی کل توسط آنزیم پانکراتین به‌ترتیب پس از ۱۶۰ دقیقه و ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز به‌میزان ۷۲/۴۹ درصد و ۱/۲۷ (جذب در ۶۵۹ نانومتر) بود. مقایسهٔ قدرت احیاکنندگی بین هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز با هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین نشان داد که در تمام زمان‌های هیدرولیز، قدرت احیاکنندگی هیدرولیزهای حاصل از آلکالاز به میزان قابل توجهی بیشتر است. هیدرولیزشده‌های حاصل از الکالاز قابلیت بالایی در جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی دارند و می توانند به عنوان ترکیب دارویی به‌کار روند.

واژه‌های کلیدی: آنتی‌اکسیدان، اکسیداسیون، پپتید، زیست فعال، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

تنش اکسایشی نوعی بی‌تعادلی میان گونه‌های فعال اکسیژن و قدرت ضد اکسایشی دفاعی بدن است. این تنش تحت تأثیر فاکتورهای داخل سلولی مانند تنفس، کمبود اکسیژن در بافت بدن، گزانتین اکسیداز یا فاکتورهای خارج سلولی مانند آلودگی محیطی، امواج فرابنفش، آلاینده‌های مواد غذایی قرار می‌گیرد (Kaveh *et al.*, 2020 a). تنش‌های اکسایشی منجر به بروز برخی از بیماری‌های خاص مانند بیماری‌های قلبی و عروقی، سرطان، دیابت و ...

* نگارنده مسئول: Email: sadeghiaz@yahoo.com
http://doi: 10.22092/FOODER.2023.354314.1303
© 2023,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

می‌شوند (Sadeghi Mahoonak *et al*., 2022). به‌منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها، ضروری است از اکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال آزاد به وجود آمده در فرآوردهٔ غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود (Eskin & Przybylski., 2001). آنتی‌اکسیدان‌ها به‌منظور حفظ کیفیت محصولات غذایی و جلوگیری از اثرهای ناشی از اکسایش به‌کار می‌روند. آنتی‌اکسیدان ماده‌ای است که در غلظت‌های کم نسبت به مادهٔ اکسیدشونده به‌کار می‌رود و به‌گونه‌ای قابل توجه اکسیداسیون ماده را به‌تعویق می‌اندازد. از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌عنوان افزودنی غذایی به‌منظور جلوگیری از کاهش کیفیت غذا استفاده می‌شود. هر چند این آنتی‌اکسیدان‌ها، در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، فعالیت قوی‌تری از خود نشان‌می‌دهند، اما در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آنها نگرانی‌هایی وجود دارد. از سوی دیگر، امروزه تقاضا برای محصولات فراسودمند طبیعی به‌منظور افزایش سطح سلامتی بدن افزایش یافته است. بنابراین، شناسایی و کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌جای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است (Rezazadeh-Bari *et al*., 2019; Radi *et al*., 2023). یکی از انواع آنتی‌اکسیدان‌هایی که امروزه مورد توجه زیادی قرار گرفته‌است، پپتیدهای زیست‌فعال هستند (Sun *et al*., 2004). پپتیدهای زیست فعال از اجزای پروتئین شناخته می‌شوند که در ساختمان پروتئین اولیه غیرفعال و حاوی ۲۰ تا ۳ اسیدآمینه‌اند و وزن مولکولی کمتر از ۶ هزار دارند (Jamdar *et al*., 2010). این پپتیدها با روش‌های آنزیمی، شیمیایی و یا تخمیری تولید می‌شوند. در این بین، استفاده از آنزیم برای هیدرولیز منابع پروتئینی به دلایلی مانند شرایط مساعد، تولید مناسب، فرآورده‌های جانبی کمتر و نابود نشدن اسیدآمینه مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. هیدرولیز پروتئین‌ها شامل شکستن آنها به پپتیدهای کوچک‌تر و آمینواسیدهای آزاد است. آنزیم‌های مورد استفاده برای هیدرولیز پروتئین‌ها ممکن است منشأ گیاهی، حیوانی و میکروبی داشته باشند (Taha *et al*., 2013).

پپتیدهای زیست فعال براساس نوع، تعداد و توالی اسیدآمینه ویژگی‌های سلامتی‌بخش متنوعی دارند مانند فعالیت‌های تسکین دهنده (پپتیدهای آپوئیدی)، قابلیت اتصال به مواد معدنی، تعدیل کنندهٔ ایمنی، ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدان، ضدلخته‌شدن خون، ضدفشار خون، کاهندهٔ کلسترول خون، ضد آلرژی‌زایی، بهبود قابلیت جذب زیستی و ضدسرطانی (Sarmadi & Ismail, 2010). آنزیم آلکالاز پروتئازی است غیراختصاصی میکروبی و قلیایی با فعالیت کاتالیتیکی بالا (Sherafat *et al*., 2013) Alcalase® 2.4 L. به دلیل عملکرد مناسب در pH قلیایی، تولید پروتئین‌هیدرولیزشده با درجهٔ هیدرولیز بالا و طول زنجیرهٔ پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود جلب کرده است (Ovissipour *et al*., 2010). پانکراتین مخلوطی از آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و کربوکسی پپتیداز است. این آنزیم از سلول‌های برون ریز لوزالمعده ترشح می‌شود و دارای حداکثر فعالیت در pH=۷/۴ است. عملکرد بسیار اختصاصی این آنزیم نسبت به پیوندهای پپتیدی منجربه کاربرد گستردهٔ آن در هیدرولیز پروتئین‌ها و تولید پپتیدهای زیست فعال گشته است (Megías *et al*., 2008). در این زمینه، محققان مختلفی به تولید پروتئین هیدرولیز شده از منابع پروتئین گیاهی و حیوانی توسط آنزیم‌های مختلف دست زده‌اند و شرایط مختلف هیدرولیز بر ویژگی‌های محصول تولیدی را بررسی کرده‌اند از جمله: فراوردهٔ جانبی ماهی ساردین (Bougatef *et al*., 2010)، پروتئین زردهٔ تخم مرغ (Sakanaka *et al*., 2004)، کینوآ (Sadeghian *et al*., 2020)، دانهٔ پرتقال (Mazlomi *et al*., 2019)، ضایعات میگو (Dey & Dora, 2014)، جوانهٔ گندم (Zhu *et al*., 2005)، و نخود (Li *et al*., 2008). از مزیت‌های منابع گیاهی، در مقایسه با منابع حیوانی، می‌توان

به آلرژی‌زایی کمتر، قیمت مناسب‌تر و دسترسی بالاتر اشاره کرد (Matthäus, 2002).

جامدار و همکاران (Jamdar *et al*., 2010) با بررسی اثر درجهٔ هیدرولیز بر ویژگی‌های عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شدهٔ بادام دریافتند که با افزایش درجهٔ هیدرولیز پروتئین (از ۱۰ درصد تا ۴۰ درصد) توسط آنزیم آلکالاز، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن III و مهارراديکال‌های DPPH افزایش می‌یابد، در حالی که قدرت احیاکنندگی روند کاهشی از خود نشان می‌دهد.

شریعت علوی و همکاران (Shariat-alavi *et al*., 2019) روی هیدرولیزشده‌های ضایعات حاصل از گوجه‌فرنگی با آلکالاز تحقیق کردند و نشان دادند که برای دستیابی به بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد (۸۵/۵۳ درصد) DPPH و رادیکال نیتریک اکسید (۶۱/۱۷ درصد)، شرایط بهینه عبارت از دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و میزان آنزیم به سوبسترا ۱/۸۵ درصداست.

مظلومی و همکاران (Mazlomi *et al*., 2019) با بهینه سازی تولید پپتیدهای ضداکسایش حاصل از هیدرولیز پروتئین هستهٔ پرتقال با آنزیم آلکالاز گزارش داده‌اند که امکان تولید پپتیدهایی با قدرت آنتی‌اکسیدانی بالا و قابل استفاده در مواد غذایی وجود دارد. مقادیر آنتی‌اکسیدانی فعالیت مهارراديکال‌های آزاد DPPH، قدرت مهارراديکال‌هایOH ، قدرت احیاکنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدان کل به‌ترتیب ۴۵/۸۵ درصد، ۹۱/۸۲ درصد، ۸۹/۳۵ درصد و ۳۹/۶۸ درصد به‌دست آمده است.

جی و همکاران (Je *et al*., 2009) با بررسی هیدرولیز شده‌های ماهی تن توسط آنزیم آلکالاز اعلام داشتند که میزان فعالیت آنزیم آلکالاز با افزایش مقدار آنزیم افزایش می‌یابد و اضافه کرده‌اند پپتیدهای با وزن مولکولی بین ۱ تا ۳ کیلودالتون نیز بیشترین قدرت مهارراديکال را دارند. این محققان بیشترین میزان قدرت مهارراديکال آزاد DPPH را حدود ۱۰۰ درصد اعلام کردند و افزوده‌اند فعالیت آنتی‌اکسیدانی تولید شده تحت تأثیر آمینواسیدهای تشکیل‌دهندهٔ آن قرار دارد.

اعتمادی و همکاران (Etemadi *et al*., 2016) فعالیت شلاته‌کنندگی و قدرت احیاکنندگی و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ سویا را بررسی کردند و نشان دادند بیشترین درجهٔ هیدرولیز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ آنسون بر کیلوگرم به‌میزان ۳۰/۴۹ درصد به‌دست آمده است، تحت این شرایط، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به حداکثر میزان خود رسیده است. این محققان می‌افزایند فعالیت احیاکنندگی یون آهن براساس شرایط ذکر شده، عدد جذب ۰/۱۵ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) را نشان داده که در مقایسه با بالاترین قدرت احیاکنندگی به‌دست آمده مقدار کمتری را نشان می‌دهد.

کاوه و همکاران (Kaveh *et al*., 2019 a) با بهینه سازی تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان با هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانهٔ شنبلیله و بررسی اثر غلظت بر خواص آنتی‌اکسیدانی، گزارش کردند بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH برابر ۹۸/۵۲ درصد و قدرت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب ۱/۲۶ در طول موج ۶۹۵ نانومتر) در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شده و بیشترین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل (۷۰/۹۹ درصد) و شلاته‌کنندگی آهن (۷۲/۶۳ درصد) و احیاکنندگی آهن (۰/۸۰ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در غلظت (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌دست آمده است.

خربزهٔ ترکمنی با نام علمی *Cucumis melo* var. *reticulata* از خانوادهٔ کدوییان است که خواص دارویی و تغذیه‌ای بالایی دارد و غنی از پروتئین، چربی، کربوهیدرات و عناصر معدنی به‌خصوص آهن، سدیم و پتاسیم است (Bahrami-sirmandi *et al*., 2010). این دانه حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی است و می‌تواند به‌عنوان منبعی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زا کاربرد گوناگون داشته باشد (Zeb, 2016). دانه‌های محصولاتی مانند خربزه، جز

در موارد اندک مصرف آجیلی و خوراک دام، مصرف دیگری ندارند و به عنوان ضایعات به‌هدر می‌روند. بنابراین، اعمال فرایندهای تکمیلی روی این ضایعات و تولید فرآورده‌های مختلف با ارزش افزودهٔ بالا راهکاری مفید در کاهش دورریز این مواد و افزایش بازده اقتصادی است (Shahidi *et al.*, 2006).

هدف از این پژوهش، هیدرولیز آنزیمی پروتئین دانهٔ خربزهٔ ترکمنی با آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز در مدت زمان ۲۰۰-۲۰ دقیقه است. بعد از محاسبهٔ درجه هیدرولیز، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهارکنندگی DPPH، قدرت احیاکنندگی و آنتی‌اکسیدانی کل) هیدرولیز شده‌های حاصل با ویتامین ث مقایسه شد.

مواد و روش‌ها

پانکراتین، آلکالاز، تری کلرواستیک اسید، پتاسیم فری سیانید، کوماسی بریلیانت بلو (G250)، DPPH، فریک کلراید، آسکوربیک اسید از شرکت سیگما و سود، کلریدریک اسید، اتانول درصد ۹۶، پتاسیم دی هیدروژن فسفات، اسیدفسفریک، سدیم فسفات و آمونیوم مولیبدات از شرکت مرک و دانهٔ خربزهٔ ترکمنی از شهرستان گنبد خریداری شد.

چربی‌گیری از دانه

دویست گرم دانهٔ خربزهٔ ترکمنی خشک شده آسیاب و با حلال هگزان به نسبت ۱:۱۰(حجمی- وزنی) مخلوط و به‌مدت ۴ ساعت با شیکر در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد با سرعت ۴۴۰ دوردردقیقه هم زده‌شد. حلال باقی‌مانده با آون تحت خلأ و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲ ساعت از آن جدا شد. پودر حاصل از الک با مش ۴۰ عبور داده شد (Feyzi *et al.*, 2015).

استخراج پروتئین

دانهٔ 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 به‌دست آمده 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 (ایزولهٔ پروتئین) با آب مقطر دو بار شسته و در ۵۰۰۰ دوربردقیقه به‌مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد. ایزولهٔ پروتئینی حاصل با خشک‌کن انجمادی، (مدل FD4، سازنده شرکت اپرون کره جنوبی)، خشک و تا آغاز آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Siddeeg *et al.*, 2015).

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

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

هیدرولیز آنزیمی

برای تهیهٔ پروتئین‌هیدرولیزشده از ایزولهٔ پروتئینی دانهٔ خربزهٔ ترکمنی از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در شرایط بهینهٔ فعالیت هر یک از آنزیم‌ها استفاده شد (جدول ۱). ایزولهٔ پروتئینی در غلظت ۵ درصد 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 ۲۵ درجه سانتی‌گراد فراهم شد. پس از رسیدن دمای انکوباتور به دمای بهینهٔ هر یک از آنزیم‌ها، ارلن‌ها درون انکوباتور قرار داده‌شدند و آنزیم‌ها به نسبت ۱ درصد به محلول اضافه شد. فرآیند هیدرولیز در شرایط همزدن مداوم با سرعت ۲۰۰ دوربردقیقه در فواصل زمانی ۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه دنبال شد. پس از طی زمان‌های مورد نظر، به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه قرار داده‌شدند و پس از آن

بااستفاده از ظرف حاوی یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد شدند. نمونه‌ها با سرعت ۸۰۰۰ بردقیقه به‌مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و سوپرناتانت جدا و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردیدند و تا زمان اجرای آزمون‌ها در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (Adjonu *et al*., 2014).

جدول ۱- شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین ایزوله دانهٔ خربزهٔ ترکمنی

Table 1- Hydrolysis condition of Turkmen melon seed protein isolate

آنزیم Enzyme	pH	دما Temperature	بافر ۰/۲ مولار Buffer 0/2 M
پانکراتین Pancreatin	۷/٤	٤٠±٥	K_2HPO_4-KH_2PO_4
آلکالاز Alcalase	۸	٥٠±٥	K_2HPO_4-KH_2PO_4

تعیین درجهٔ هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین‌هیدرولیزشده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴ مولار) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. مخلوط در ۱۰۰۰ دوربردقیقه و به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی‌تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ مولار با روش بردفورد (Bradford, 1976)

تعیین و درجهٔ هیدرولیز با استفاده از رابطهٔ (۱) تعیین شد.

(۱)

$$DH\ (\%) = \frac{\text{میزان پروتئین در سوپرناتانت حاوی } TCA}{\text{میزان پروتئین در سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده}} \times 100$$

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH[1]

ابتدا پودرهای‌هیدرولیزشده در آب مقطر (۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) حل شد. پس از آن ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی (۰/۱ میلی‌مولار) مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه مخلوط شد. مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ دوربردقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومترخوانده‌شد. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطهٔ (۲) محاسبه شد (Wu *et al*., 2003).

$$I\ (\%) = [\frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب بلانک}}{\text{جذب بلانک}}] \times 100 \ldots\ldots \quad (۲)$$

تعیین قدرت احیاکنندگی

برای تعیین قدرت احیاکنندگی نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ میلی‌لیتر نمونهٔ حل شده در آب مقطر (در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۰/۵ میلی‌لیتر بافرفسفات (۰/۲ مولار pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ۱ درصد (حجمی- وزنی) مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن ۰/۵ میلی‌لیتر محلول‌تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ دوربردقیقه سانتریفوژ شد. یک میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی- وزنی) مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهندهٔ افزایش قدرت احیاکنندگی است (Ahmadi *et al*., 2007).

[5] 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl) hydrazyl
Diphenylpicrylhydrazyl

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این روش بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی است 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 شد 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 نمونهٔ شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهندهٔ بیشتر بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل است (Perito *et al.*, 1999).

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش، مقایسهٔ اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۲۰ تا ۲۰۰ دقیقه) با آنزیم پانکراتین و آلکالاز بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده با کاربرد تجزیهٔ واریانس یک‌طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ ارزیابی شد. کلیهٔ آزمون‌ها در ۳ تکرار اجرا شد. میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در $p<0/05$ مقایسه و نمودارها با نرم افزار Excel 2013 رسم شد.

نتایج و بحث

آنالیز ترکیبات شیمیایی دانهٔ خربزهٔ ترکمنی

خصوصیات شیمیایی دانهٔ خربزهٔ ترکمنی در جدول ۲ آورده شده است. میزان پروتئین دانهٔ کامل و آرد چربی‌گیری شده به‌ترتیب ۲۸/۷۲ درصد و ۴۰/۶۹ درصد است. افزایش میزان پروتئین در ایزولهٔ پروتئینی (۹۸/۱۵ درصد) به‌دلیل چربی‌گیری با هگزان، کاهش رطوبت و در نهایت فرایند استخراج پروتئین در محلول قلیایی طی سانترفیوژ و رسوب در نقطهٔ ایزوالکتریک و درنتیجه حذف اغلب ناخالصی‌های موجود است. مقدار پروتئین در دانهٔ کامل، در مقایسه با سایر پژوهش‌های مربوط به دانهٔ خربزه (Onyeike & Acheru, 2004; Shahidi *et al.*, 2006) بیشتر یا یکسان بود. میزان چربی دانهٔ کامل، آرد چربی‌گیری شده و چربی ایزوله پروتئینی به‌ترتیب ۱۷/۵ درصد، ۸/۳۲ درصد و ۵/۶ درصد بود. کاهش میزان چربی ایزوله پروتئینی به‌دلیل چربی‌گیری کنجالهٔ دانهٔ خربزهٔ ترکمنی با هگزان و همچنین اتصال چربی به پروتئین‌های انحلال‌ناپذیر بعداز شکسته شدن پیوندهای پپتیدی طی هیدرولیز و رسوب آنها طی سانترفیوژ و سپس حذف این ترکیبات انحلال‌ناپذیر است. کمترین میزان خاکستر در ایزولهٔ پروتئینی دیده شد که فرآیند استخراج پروتئین در pH قلیایی منجربه رسوب مقدار زیادی از ترکیبات غیرپروتئینی می‌شود که در انتها حذف خواهند شد. کاهش میزان رطوبت در ایزولهٔ پروتئینی در مقایسه با دانهٔ کامل و پودر چربی‌گیری شده به‌دلیل استفاده از آون با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور خروج هگزان باقی‌مانده در پودر چربی‌گیری شده و همچنین فرایند خشک کردن رسوب پروتئینی حاصل از استخراج پروتئین در pH اسیدی توسط خشک‌کن انجمادی بود.

جدول ۲-ترکیبات شیمیایی دانهٔ کامل، پودر چربی‌گیری‌شده و ایزولهٔ پروتئینی خربزهٔ ترکمنی

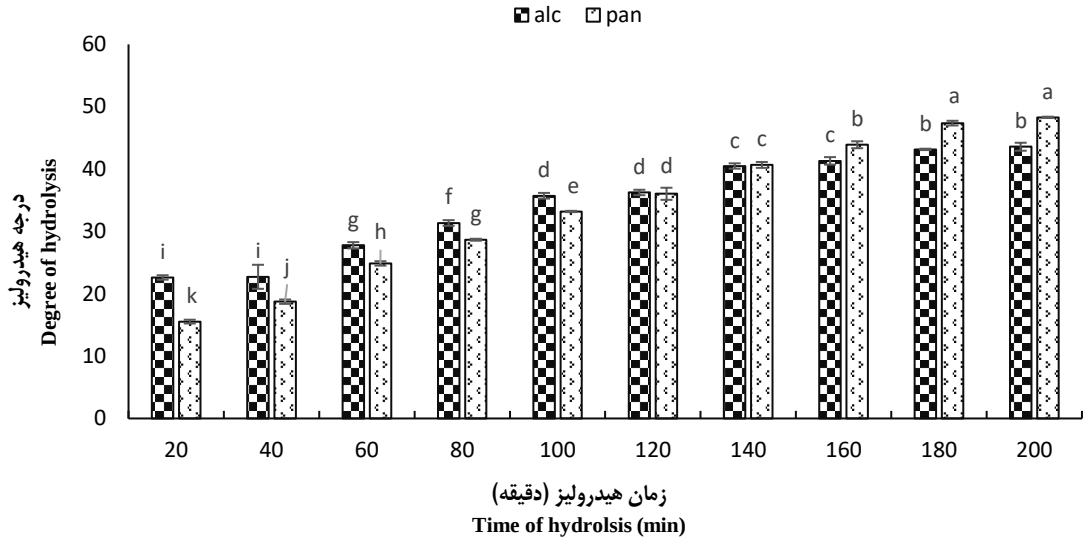
Table 2- chemical composition of whole seed, defatted powder and protein isolate of Turkmen seed

	پروتئین (درصد) Protein (%)	رطوبت (درصد) Moisture (%)	چربی (درصد) Fat (%)	خاکستر (درصد) Ash (%)
دانهٔ کامل whole seed	۲۸/۷۲/±۰/۱	۸/۵/±۰/۲۵	۱۷/۵/±۰/۱	٦/۲±۰/۲۸
پودر چربی‌گیری‌شده Defatted powder	٤۰/٦۹/±۰/۱۵	٦/۳۳/±۰/۲۷	۸/۳۲/±۰/۲٦	۳/۵/±۰/۳٤
ایزولهٔ پروتئینی protein isolate	۹۸/۱۵/±۰/۲۲	٤/۱۸/±۰/۱٤	۵/٦/±۰/۲۹	۲/۱۲/±۰/۳۰

درجهٔ هیدرولیز

درجهٔ هیدرولیز معیاری از میزان شکستن ساختار پروتئینی و درنتیجه تولید پپتید و اسیدهای آمینه است (Jahan-Mihan *et al*., 2011). شکل ۱ اثر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم را بر درجهٔ هیدرولیز پروتئین دانهٔ خربزهٔ ترکمنی نشان می‌دهد. نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه درمورد آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز اختلاف معنی‌داری وجود ندارد و از نظر اقتصادی و به‌منظور جلوگیری از اتلاف زمان و استفاده از ظرفیت دستگاه‌ها، باید تیمار با مقدار بیشینه و با زمان پایین‌تر را مدنظر قرار داد. آنالیز آماری نشان‌دهندهٔ اثر معنی دار ($p<0/05$) زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر درجهٔ هیدرولیز است، به‌طوری که پس از ۱۸۰ دقیقه از فرآیند هیدرولیز با پانکراتین و آلکالاز به‌ترتیب ۴۷/۳۶ درصد، ۴۳/۱۵ درصد درجهٔ هیدرولیز به‌دست آمد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، در زمان هیدرولیز ۱۲۰-۲۰ دقیقه درجهٔ هیدرولیز هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز بیشتر از پانکراتین بود در حالیکه در زمان‌های هیدرولیز ۲۰۰-۱۴۰ دقیقه هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین دارای درجهٔ هیدرولیز بیشتری بودند. به‌طور کلی مطالعات نشان داده است که با افزایش زمان هیدرولیز، درجهٔ هیدرولیز افزایش می‌یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچک‌تر با وزن مولکولی کمتر و زنجیرهٔ کوتاه‌تر می‌شود (Xie *et al*., 2008).

اعتمادی و همکاران (Etemadi *et al*., 2018) با بررسی هیدرولیزشده‌های سویای حاصل از آلکالاز گزارش کردند با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد. سوئیسی و همکاران (Souissi *et al*., 2007) با بررسی اثر زمان بر هیدرولیزهای امعا و احشای ماهی ساردین مشاهده کردند با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه، درجهٔ هیدرولیز افزایش می‌یابد. این نتایج مشابه گزارش‌های کاوه و همکاران (Kaveh *et al*., 2022)، اویسی‌پور و همکاران (Oveissipour *et al*., 2009) ، جامدار و همکاران (Jamdar *et al*., 2010)، یو و همکاران (You *et al*., 2009) و طاهری و همکاران (Taheri *et al*., 2011) است که اثر آنزیم‌های مختلف را به‌ترتیب بر دانهٔ شنبلیله، ضایعات ماهی ازون‌برون (آلکالاز)، بادام زمینی (آلکالاز)، ماهی لچ (پاپایین و پروتامکس) و ماهی ساردین (آلکالاز) بررسی کردند.

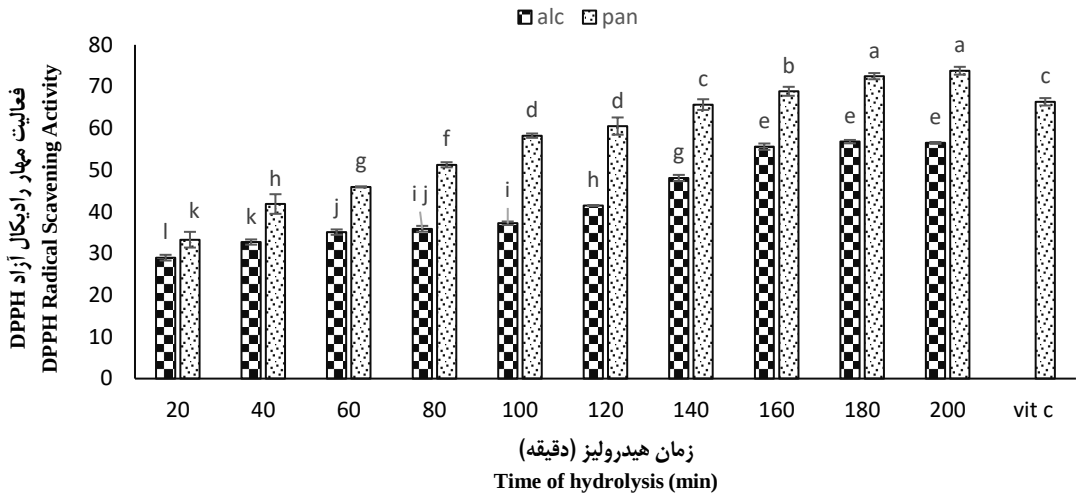


شکل ۱- تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر درجهٔ هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شدهٔ دانهٔ خربزهٔ ترکمنی (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 1- The effect of hydrolysis time and enzyme type on degree of hydrolysis of Turkmen melon seed protein hydrolysate (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin) .Similar lowercase letters indicate no significant difference at the 5% level.

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

عوامل مختلفی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH مؤثر هستند که از مهم‌ترین آنها می‌توان به زمان فرآیند، درجهٔ هیدرولیز و عملکرد هر آنزیم بر تولید پپتیدهای زیست‌فعال و رهایش آمینواسید آنتی‌اکسیدان لیپوفیل اشاره کرد. در مورد اثر زمان فرآیند و در نتیجه درجهٔ هیدرولیز، طی افزایش زمان هیدرولیز و افزایش درجهٔ هیدرولیز و پس از آن رهایش بیشتر پپتیدها و آمینواسیدهای هیدروفوب و فعال، موجب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها می‌شود (Jamdar *et al.*, 2010). طبق آنالیز آماری، با افزایش زمان هیدرولیز به همراه افزایش درجهٔ هیدرولیز، میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش ($p<0/05$) یافته است. براساس نتایج به‌دست آمده، مقایسهٔ بین هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین، تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه، تفاوت معناداری وجود ندارد و تیمار ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. در حالی که مقایسهٔ بین هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز، تیمار ۱۶۰ دقیقه با ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه اختلاف معناداری نداشته درنتیجه از نظر کاهش هزینه‌ها و جلوگیری از اتلاف بازدهی دستگاه‌ها، تیمار ۱۶۰ دقیقه به‌عنوان بهترین تیمار انتخاب شد. از سوی دیگر، مقایسهٔ بین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین در تمامی زمان‌ها به‌مقدار قابل توجهی بالاتر از هیدرولیز شده‌های حاصل آلکالاز بوده‌اند به طوری که بیشینه میزان فعالیت رادیکال آزاد هیدرولیزشدهٔ حاصل از پانکراتین در زمان ۱۸۰ دقیقه ۷۹/۴۹ درصد بود. میزان فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH ویتامین ث (غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برابر با ۶۶/۳۴ درصد بود که در مقایسه با هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین مقدار کمتری را نشان داد. در تطابق با این نتایج، صادقیان و همکاران (Sadeghian *et al.*, 2020)، مظلومی و همکاران (Mazloomi *et al.*, 2019)، طاهری و همکاران (Taheri *et al.*, 2011) و کاوه و همکاران (Kaveh *et al.*, 2019 b) به‌ترتیب با بررسی هیدرولیزشده‌های کینوا، هستهٔ پرتقال، ماهی ساردین و دانهٔ شنبلیله حاصل از پانکراتین و آلکالاز گزارش داده‌اند با افزایش زمان (صرف نظر از نوع آنزیم) فعالیت مهار رادیکال آزاد افزایش می‌یابد.

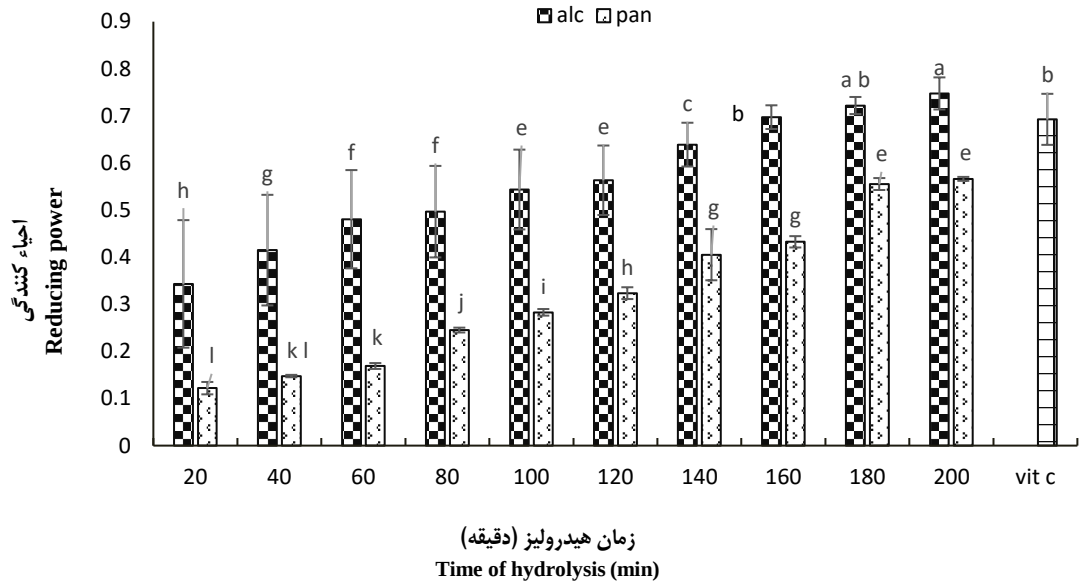


شکل ۲- تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شدهٔ دانهٔ خربزهٔ ترکمنی (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 2- The effect of hydrolysis time and enzyme type on DPPH radical scavenging activity of Turkmen melon seed protein hydrolysate (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). Similar lowercase letters indicate no significant difference at the 5% level.

قدرت احیاکنندگی یون آهن III

آزمون قدرت احیاکنندگی منعکس‌کننده قدرت الکترون‌دهی آنتی‌اکسیدان است. هیدرولیز شده‌های پروتئینی با قدرت احیاکنندگی بالاتر توانایی بهتری برای اهدای الکترون یا هیدروژن دارند. این مسئله شاخص مهمی برای ارزیابی هر ترکیب به‌عنوان آنتی‌اکسیدان است (Hashemi *et al.*, 2022). براساس آنالیز آماری شکل ۳ با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده تاحدی ($p< 0/05$) افزایش یافت. یو و همکاران (You *et al.*, 2009) ، خانتافانت و همکاران (Khantaphant *et al.*, 2011)، وو و همکاران (Wu *et al.*, 2003) و کاوه و همکاران (Kaveh *et al.*, 2019 c) افزایش قدرت احیاکنندگی را با افزایش زمان هیدرولیز در پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌ترتیب حاصل از ماهی لچ، عضله ماهی، ماهی ماکرول و شنبلیله گزارش کرده‌اند. نتایج به‌دست آمده نشان داد بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه حاصل از پانکراتین و آلکالاز اختلاف معناداری وجود ندارد و تیمار ۱۸۰ دقیقه به‌عنوان تیمار بهینه تعیین شد. از طرفی دیگر، قدرت احیاکنندگی هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز در تمامی زمان‌های هیدرولیز به‌طور قابل توجهی بیشتر از قدرت احیاکنندگی هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین بود. بیشینهٔ قدرت احیاکنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شدهٔ حاصل از آلکالاز و پانکراتین در زمان ۱۸۰ دقیقه به‌ترتیب ۰/۷۲ و ۰/۵۵ بود (جذب در ۷۰۰ نانومتر). این مقدار برای نمونهٔ کنترل (ویتامین ث در غلظت ۴۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، ۰/۶۹ به‌دست آمد. به طورکلی، تفاوت در قدرت احیاکنندگی نمونه‌ها را می‌توان به تفاوت در ترکیب آمینواسیدی پپتیدها مرتبط دانست. در این راستا مطالعات نشان داده است که افزایش رهایش آمینواسیدهایی مانند تریپتوفان، متیونین، لیزین، هیستیدین و تیروزین باعث افزایش قدرت آنتی اکسیدانی می‌شود (Sadeghi Mahoonak & Kaveh, 2022).

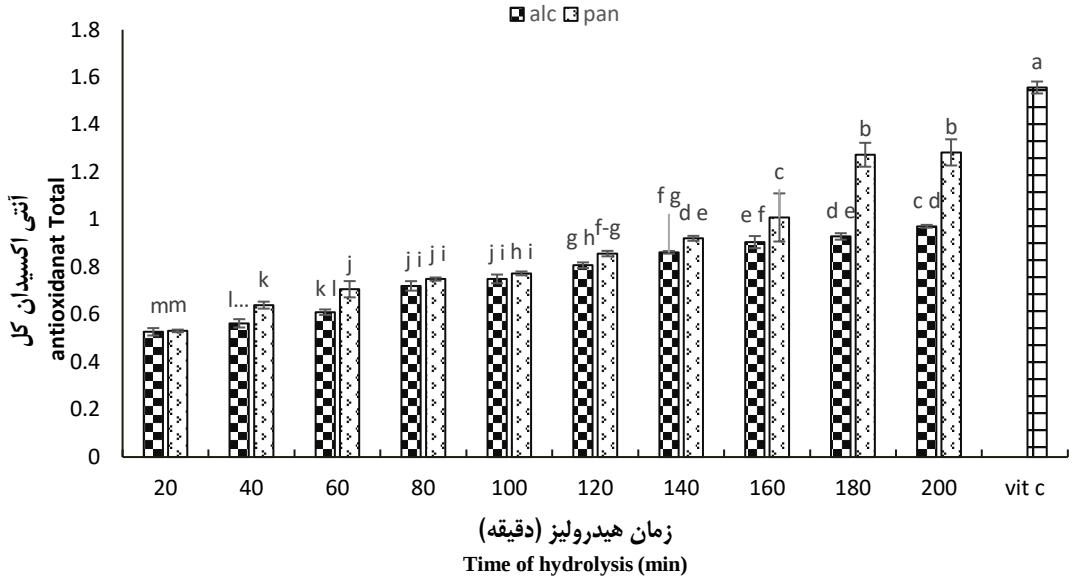


شکل ۳- تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر قدرت احیاکنندگی آهن پروتئین هیدرولیز شده دانهٔ خربزهٔ ترکمنی (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. 3- The effect of hydrolysis time and enzyme type on Fe reducing power of Turkmen melon seed protein hydrolysate (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). Similar lowercase letters indicate no significant difference at the 5% level.

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل روشی برای تعیین کمیت ظرفیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات انحلال پذیر در آب و چربی است. براساس آنالیز آماری، با افزایش مدت زمان تا ۱۸۰ دقیقه همراه با افزایش درجهٔ هیدرولیز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به‌طور قابل توجهی افزایش یافت. این نتیجه مشابه نتیجهٔ تحقیقات کاوه و همکاران (Kaveh *et al.*, 2020 b) است که با بررسی هیدرولیزشده‌های شنبلیله توسط پانکراتین و آلکالاز گزارش کردند با افزایش زمان هیدرولیز به همراه افزایش درجهٔ هیدرولیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش می‌یابد با این تفاوت که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز بالاتر از میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین است. نتایج تحقیق نشان داد بین تیمار ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه در هردو آنزیم اختلاف معناداری وجود ندارد و تیمار ۱۸۰ دقیقه به‌دلیل صرفهٔ اقتصادی و جلوگیری از کاهش بازدهی دستگاه‌ها بهترین تیمار انتخاب شد. از سوی دیگر، مقایسه بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های هیدرولیزشده نشان داد قدرت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین در تمامی زمان‌های هیدرولیز بیشتر از قدرت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز است. بیشینه (۱/۲۷) (جذب در ۶۵۹ نانومتر) فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین بود. میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل برای نمونهٔ کنترل (ویتامین ث) ۱/۵۵ (جذب در ۶۵۹ نانومتر) بود که در مقایسه با هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین به‌نسبت بالاتر بود. یافته‌ها نشان‌دهندهٔ این است که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، منجر به افزایش رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی می‌شود، این پپتیدها می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به ترکیباتی پایدار تبدیل کنند، درنتیجه با افزایش مدت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافته است (Arab shahi *et al.*, 2007).



شکل ٤- تأثیر زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شدهٔ دانهٔ خربزهٔ ترکمنی (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). حروف کوچک مشابه نشان دهنده عدم تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ می‌باشد.

Fig. hydrolysate (Alc: Alcalase, Pan: Pancreatin). Similar lowercase letters indicate no significant difference at the 5% level.

نتیجه گیری

توجه پژوهشگران به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌دلیل نگرانی‌هایی است که در ارتباط با ایمنی و سلامت آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی وجود دارد. دانهٔ خربزهٔ ترکمنی می‌تواند منبعی غنی از ترکیبات زیست فعال باشد. در این پژوهش، پروتئین دانهٔ خربزهٔ ترکمنی با پانکراتین و آلکالاز با نسبت ۱ درصد (نسبت آنزیم به سوبسترا) هیدرولیز شد. نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد اثر زمان بر هیدرولیز در خصوص هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز، تیمار ۲۰ تا ۱۲۰ دقیقه بیشتر بود تا در هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین، در حالی که تیمار ۱۴۰ دقیقه تا ۲۰۰ دقیقه هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین نسبت به هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز به میزان بالاتری بود. مقایسه بین اغلب هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین و هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز در زمان ۱۸۰ دقیقه و ۲۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نداشتند (در خصوص فعالیت مهارادیکال آزاد DPPH ، هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز تیمار ۱۶۰ دقیقه تیمار بهینه تعیین شد). به‌منظور جلوگیری از اتلاف زمان، استفاده از ظرفیت دستگاه‌ها و کاستن از هزینه‌ها، تیمار با زمان پایین مدنظر قرارگرفت. بیشترین فعالیت مهارکنندگی DPPH، آنتی‌اکسیدانی کل توسط آنزیم پانکراتین به‌ترتیب پس از ۱۶۰ دقیقه و ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز به‌میزان ۷۲/۴۹ درصد و ۱/۲۷ (جذب در ۶۵۹ نانومتر) به‌دست آمد، در حالی که مقایسهٔ قدرت احیاکنندگی هیدرولیزشده‌های حاصل از آلکالاز نشان داد که در تمام زمان‌های هیدرولیز به‌میزان قابل توجهی بالاتر قدرت احیاکنندگی هیدرولیزشده‌های حاصل از پانکراتین بود. نتایج بررسی‌ها همچنین نشان داد که هیدرولیز شده‌های دانهٔ خربزهٔ ترکمنی می‌تواند قابلیت بالایی در فرمولاسیون محصولات غذایی مختلف، پیشگیری از اکسیداسیون و به‌عنوان ترکیب دارویی داشته باشد.

تعارض منافع

نویسندگان در خصوص انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

مراجع

Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., and Agboola, S. 2014. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. Journal of Food Engineering. 122, 15-27.

Ahmadi, F., Kadivar, M., and Shahedi, M. 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. Food Chemistry. 105(1): 57-64.

AOAC. Official methods of analysis (18th Ed). 2008. Association of Official Analytical Chemists Washagton. DC 47.

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

Bahrami-sirmandi, S., Bahrami-sirmandi, H., and Hassanzade, R. 2010. Comprehensive and Illustrated Guide to Summer Cultivation. Tehran, Agricultural Education and Extension Publications. (In Persian)

Bougatef, A., Hajji. M., and Balti. R. 2010. Antioxidant and free radical – scavenging activities of smooth hound muscle protein hydrolysates obtained by gastro intestinal proteases. Food chemistry. 114(4): 1198-1255.

Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 72(1-2): 248-254.

Hashemi, S.M.B., Abedi, E., Kaveh, S. and Mousavifard, M., 2022. Hypocholesterolemic, antidiabetic and bioactive properties of ultrasound-stimulated exopolysaccharide produced by Lactiplantibacillus plantarum strains. Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre, 28, p.100334.

Dey, S. S., Dora, K. C. 2014. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (Penaeus monodon and Penaeus indicus). Journal of food science and technology. 51(3): 449-457.

Eskin, N. A. M. and Przybylski, R. 2001. Antioxidants and shelf life of foods. In Food microbiological changes. Eds. Ds. Robinson and NAM Eskin. CRC Press. 175-203

Etemadi, M., Sadeghi-mahoonak, A.R. Ghorbani, M. and Maqsoudlou, Y. 2016. Production and evaluation of chelating activity and reducing power of hydrolyzed proteins derived from soy protein. Journal of Food Science and Nutrition. 13(1): 65-74. (In Persian)

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.

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.

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.

Je, J. Y., Lee, M. H., Lee, K. h. Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International. 42: 1266-1272.

Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K., 2019 a. Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 14(1): 77-87.

Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K., 2019 b. Optimization of production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed. Journal of Food Science and Technology. 15 (84): 75-88.

Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K., 2019 c. Antioxidant properties of fenugreek bioactive peptides prepared with pancreatin enzyme. Food Engineering Research. 18(67): 103-122.

Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A. and Sarabandi, K., 2020 a. The Effect of Solvent Type, Time and Extraction Method on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Eggplant Peel Extract. Karafan Quarterly Scientific Journal. 17(2): 129-141.

Kaveh, S., Sadeghimahonak, A. R., Ghorbani, M., Sarabandi, Kh. 2020 b. Comparison of antioxidant properties of fenugreek seed protein hydrolyzed with alcalase and pancreatin. Journal of Innovation in Food Science and Technology. 11(4): 77-88. Kaveh, S., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M. and Jafari, S.M., 2022. Fenugreek seed (Trigonella foenum graecum) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. Industrial Crops and Products. 182, p.114908.

Khantaphant, S., Benjakul, S., Ghomi, M. R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper. LWT-Food Science and Technolology. 44: 1139-1148.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry. 106(2): 444-450.

Matthäus, B. 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. J. Agric. Food Chemistry. 50: 3444–3452.

Mazloomi, N., Sadeghi-mahonak, A.R., Ghorbani, M. and Hoshmand, Gh.R.2019. Determination of optimal production conditions of antioxidant peptides resulting from hydrolysis of orange kernel protein with alkalase enzyme. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 16(88): 343-356. (In Persian)

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 Science and Technolology. 41(10): 1973-1977.

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

Ovissipour, M. R., Abedin, A. M., Motamedzadegan, A. and Nazari, R. M. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste protein of yellowfin tuna (Thunnus albacares). Food and Bioprocess Technolology. 5(2): 696-705.

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.

Radi, M., Shadikhah, S., Sayadi, M., Kaveh, S., Amiri, S. and Bagheri, F., 2023. Effect of Thymus vulgaris Essential Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers in Alginate-Based Edible Coating on the Postharvest Quality of Tangerine Fruit. Food and Bioprocess Technology. 16(1):185-198.

Rezazadeh-Bari, M., Najafi-Darmian, Y., Alizadeh, M. and Amiri, S., 2019. Numerical optimization of probiotic Ayran production based on whey containing transglutaminase and Aloe vera gel. Journal of food science and technology. 56(7): 3502-3512.

Sadeghian, A., Sadeghi-mahoonak, A.R. Ghorbani, M., Aalami, M. and Joshghani, H. 2020. Effect of process time on functional and antioxidant properties of quinoa hydrolyzed protein with alcalase and pancreatin Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 14(4): 89-102. (In Persian)

Sadeghi Mahoonak, A.R. and Kaveh, S., 2022. Assessment of ACE-inhibitory and Antioxidant Activities of the Peptide Fragments from Pumpkin Seeds. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 17(3), pp.45-56.

Sadeghi Mahoonak, A.R. Kaveh, S., Alvand, M. 2022. The effect of molecular weight and amino acid composition on antioxidant properties of peptide components of pumpkin seed protein hydrolysate. Journal of Food Processing and Preservation. 14(1): 39-58.

Sakanaka, S., Tachibana, Y., Ishihara, N., Juneja, L. R. 2004. Antioxidant activity of egg-yolk protein hydrolysates in a linoleic acid oxidation system. Food Chemistry. 86(1): 99-103.

Sarmadi, B.H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. Peptides. 231(10):1949–56.

Shahidi, F., Kochaki, A., Baghaii, H. 2006. Investigation of some chemical compounds and physical properties of watermelon, squash, cantaloupe and melon seeds native to Iran and determination of chemical properties of their oil. Journal of Agricultral Science and Technology. 20(5): 421-411. (In Persian)

Shariat-alavi, M., Sadeghimahonak, A. R., Ghorbani, M., alami, M., Mohamadzade, J. 2019. Determine the optimum conditions for producing protein hydrolysates with antioxidant and nitric oxide reduction of tomato waste by Alcalase.Food Science and Technology. 15(84): 137-151. (In Persian)

Sherafat, N., Motamedzadegan, a., Safari, R. 2013. Effect of waste hydrolysis time after cooking of Hoover tuna on recycling efficiency and molecular size of proteins hydrolyzed with alkalase enzyme. Innovation Food Science and Technology. 5(3): 47-54. (In Persian)

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.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella by- Product hydrolysate. Food technology and biotechnology. 45(2): 187- 194.

Sun, J., He, H. and Xie, B. J. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom Ganoderma lucidum. Journal of agricultural and food chemistry. 52: 6646–6652.

Taha, S. F., Mohamed, S. S., Wagdy M. S., Mohamed, F. G. 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of enzymatic hydrolysis products from sunflower protein isolate. World Applied Science Journal. 21: 651-658.

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.

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.

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.

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.

Zeb, A. 2016. Phenolic profile and antioxidant activity of Melon (Cucumis melo L.) seeds from Pakistan. Foods. 5: 67–74.

Zhu, K., Zhou, H., and Qian, H. 2006. Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. Process Biochemistry. 41(6):1296-1302.

Food Engineering Research/Vol.21/No.73/Autumn & Winter 2022/P: 75-90

Journal Home page: https://fooder.areeo.ac.ir/

Original Research

Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase

M. Alvand, A. Sadeghi Mahoonak*, M. Ghorbani, H. Shahiri Tabarestani and S. Kaveh

* Corresponding Author: Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com

Received:6 October 2021,Accepted:16 August 2022

http://doi: 10.22092/FOODER.2023.354314.1303

Abstract

In recent years, due to concerns about the safety and health of synthetic antioxidants, there has been widespread attention to the use of natural antioxidants. Bioactive peptides are one of these types of natural antioxidants. Turkmen melon seeds are a rich source of protein. The purpose of this study, was to perform enzymatic hydrolysis of Turkmen melon seed protein with pancreatin and alcalase enzymes in the ratio of enzyme to substrate of 1% and at intervals of 20-200 minutes. The degree of hydrolysis and antioxidant properties (DPPH radical scavengingactivity, Fe^{3+} reducing power, and total antioxidant activity) of the obtained hydrolysates were investigated. Based on the results obtained from the effect of time on hydrolysis for alcalase-derived hydrolysates, the treatment was 20 to 120 minutes longer than pancreatin, while the treatment of pancreatin-derived hydrolysates for 140 to 200 minutes was higher than that of alcalase. The results showed that there was no significant difference between most of the hydrolysates from pancreatin and alcalase at 180 minutes compared to 200 minutes (about the free radical scavenging activity of DPPH hydrolyzes from alcalase, 160 minutes was determined as the best treatment). The highest scavenging activity of DPPH was total antioxidant by pancreatin enzyme after 160 minutes and 180 minutes of hydrolysis and respectively 72.49% and 1.27 (absorption at 659 nm). The results showed that the produced hydrolysates have a high ability to prevent food oxidation or be used as a medicinal compound.

Keywords: Antioxidant, Oxidation, Peptide, Bioactive, Enzymatic hydrolysis