**(مقاله پژوهشی)**

# تولید پروتئین هیدرولیزشده قارچ خوراکی با استفاده از آنزیم‌آلکالاز: بررسی تاثیر زمان هیدرولیز و غلظت پروتئین هیدرولیزشده بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن

**آیسان ایزانلو[۱]، علیرضا صادقی ماهونک[۲*]، هدی شهیری طبرستانی[۳]، شیما کاوه[۴]**

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم وصنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استاد، گروه علوم وصنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۳- استادیار،گروه علوم و صنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۴- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع‌غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۹ تاریخ پذیرش:۱۴۰۱/۰۲/۱۹

DOI: 10.30495/jfst.2022.1956962.1791

**چکیده**

به‌دلیل نگرانی‌هایی‌که در مورد ایمنی و سلامت آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانندBHT و BHA وجود دارد کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی‌آنتی‌اکسیدانی، نظیر پپتیدهای زیست‌فعال مورد توجه بسیاری از محققین قرارگرفته است. هدف این پژوهش تعیین زمان مناسب هیدرولیز پروتئین پودر قارچ‌دکمه‌ای(*Agaricus bisporus*) با آنزیم آلکالاز به منظور تولید پروتئین هیدرولیزشده با خواص‌آنتی‌اکسیدانی بالا بود. جهت انجام این پژوهش ابتدا قارچ خوراکی به پودر تبدیل‌گردید و سپس عمل هیدرولیز درطی زمان‌های۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۵۰ دقیقه با نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ و در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد صورت‌گرفت و تیمار مناسب براساس اندازه‌گیری قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه تولیدی تعیین‌گردید. نتایج نشان داد که زمان ۲۰۰ دقیقه جهت رسیدن به حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی مناسب می‌باشد. در مرحله بعد تاثیر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده در شرایط بهینه (۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) بر روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی در مقایسه با اسید آسکوربیک (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت. در تمامی آزمون‌های مورد بررسی محصول تولیدی رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان داد و با افزایش غلظت میزان مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن و قدرت آنتی‌اکسیدانی‌کل افزایش یافت و در غلظتهای ۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نتایج قابلیت آنتی‌اکسیدانی مشابه با اسید آسکوربیک (۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بود. نتایج نشان دادکه پروتئین هیدرولیزشده تولیدی پتانسیل مناسبی جهت استفاده به‌عنوان یک افزودنی فراسودمند و به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی در فرمولاسیون‌های غذایی دارد.

**واژه‌های کلیدی**: زمان هیدرولیز، هیدرولیزآنزیمی، قارچ خوراکی، خصوصیات آنتی‌اکسیدانی، پروتئین هیدرولیزشده.

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@gau.ac.ir

**۱-مقدمه**

اکسیداسیون لیپیدها منجر به تجزیه اسیدهای چرب و تغییر در بافت، طعم و ظاهر موادغذایی و در نتیجه کاهش کیفیت آن‌ها می‌گردد. هم‌چنین مشخص شده است که تنش‌های اکسیداتیو نقش مهمی در بروز برخی از بیماری‌های وابسته به سن ایفا می‌کنند. عواملی که در این بیماری‌ها نقش دارند پراکسیدهای لیپیدی وترکیباتی با وزن مولکولی کم می‌باشند که‌درمرحله نهایی واکنش‌های اکسیداسیون تولید می‌گردند. بنابراین‌برای‌جلوگیری‌ازاثرات‌منفی‌این‌واکنش در موادغذایی وحفاظت‌ازبدن‌دربرابراین‌بیماری‌ها،جلوگیری‌ازپراکسیداسیون لیپیدهاوتشکیل‌رادیکال‌های‌آزادفرآیندی‌حائز اهمیت میباشد (۲۷).درصنعت‌غذا از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA وBHT جهت جلوگیری از اکسیداسیون استفاده می‌شود و باوجوداین که‌این‌آنتی‌اکسیدان‌هادرمقایسه با آنتی‌اکسیدانهای طبیعی قدرت بیشتری دارند اما از نظر ایمنی و سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی‌وجوددارد،این‌امر منجر به افزایش توجه محققین به‌شناسایی‌آنتی‌اکسیدان‌های‌طبیعی‌برای‌استفاده‌در موادغذایی ودارویی‌شده‌است (۲۱). استرس اکسایشی[1]، از عوامل اصلی افت‌کیفیت وفساد مواد غذایی می‌باشد. علاوه براین، مصرف رادیکال‌های‌آزادو هیدروپراکسیدهای حاصل از این واکنش با خطر ابتلا به بیماری‌هایی نظیر سرطان، اختلالات عصبی و پیشرفت فرآیند پیری همراه می‌باشد. در همین راستا، کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی‌آنتی‌اکسیدان،نظیرپپتیدهای زیست فعال‌موردتوجه‌بسیاری‌از محققین می‌باشد (۲). مکانیسم دقیق آنتی‌اکسیدانی پپتیدها، هنوز به درستی شناخته شده نیست؛ هرچندکه‌محققین،توانایی‌مهار رادیکال‌آزاد وگونه‌های فعال اکسیژن، شلاته‌کنندگی یون‌های فلزی و اهدای پروتون را از جمله‌عوامل‌شرکت‌کننده دراین‌مکانیسم‌می‌دانند. با این حال، اثرگذاری‌هریک‌از فاکتورهای فوق الذکر در مهار اکسایش مواد غذایی به‌تنهایی کافی نیست و بروز چنین عملکردی در گرو مشارکت عوامل زنجیره‌ای دخیل درآن می‌باشد. به‌طور کلی‌ویژگی‌آنتی‌اکسیدانی‌پپتیدهاباویژگی‌ساختاری، آبگریزی وترکیب‌اسیدهای‌آمینه‌تشکیل‌دهنده‌زنجیره پپتیدی در ارتباط می‌باشد. پپتیدهای‌آنتی‌اکسیدان،توالی‌های‌کوتاه‌زنجیر حاوی ۱۰-۲اسیدآمینه‌می‌باشندکه‌حضوراسیدهای‌آمینه خاص نظیر، تیروزین، تریپتوفان، متیونین، سیستئین و هیستیدین در زنجیره پپتیدی‌موجب‌اثربخشی هرچه بیش‌تر ویژگی آنتی‌اکسیدانی، به‌ویژه‌توانایی‌مهاررادیکال آزاد درآن‌ها می‌گردد.اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹)، بلانسا و همکاران (۲۰۰۷) و گومارز و همکاران(۲۰۱۷)به‌ترتیب‌خاصیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از ضایعات ماهی قزل‌آلا، شیر و بذر کتان را به اثبات رساندند (۱۲،۸،۲۵). منابع‌گیاهی و حیوانی متعددی برای تولید پروتئین هیدرولیزشده مناسب هستند، منابع‌گیاهی‌به‌دلیل قیمت مناسب‌تر و آلرژی‌زایی کمتر، بیشتر مورد توجه قرارگرفته‌اند (۲۲). بوگاتف و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی‌خواص‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌ی‌ساردین با استفاده ازآنزیم‌های پروتئازی، به این نتیجه دست یافتند که با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده نیز افزایش می‌یابد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی نیز هستند (۷). زائو وهمکاران(۲۰۱۲)وآمایاپاروواتی‌وهمکاران(۲۰۱۴)، به ترتیب با هیدرولیز پروتئین برنج و صدف خوراکی‌گزارش‌کردند که با افزایش غلظت پپتیدهای حاصل قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد(۳۵،۳۰). باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) با هیدرولیز پروتئین ضایعات نوعی ماهی[2]، گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش درجه هیدرولیزافزایش‌می‌یابد،آن‌هاعلت‌این‌امر را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، بیان کردند(۶). یو و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش کردند که فرآیند هیدرولیزآنزیمی به‌طور معنی‌داری منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل پروتئین ماهی *Misgurnus anguillicaudatus* شده است و با افزایش درجۀهیدرولیزقابلیت‌مهاررادیکال هیدروکسیل به ۵۶ درصد رسید (۳۴). پدرام نیا و همکاران (۲۰۱۷) با هیدرولیز پروتئین دانه هندوانه با آنزیم پپسین نشان دادند که با افزایش غلظت آنزیم و زمان آنزیم زنی قدرت شلاته‌کنندگی ابتدا افزایش

1- Oxidative Stress

2 -*Apanopus carbo*

یافته و در ادامه کاهش می‌یابد (۱). چی و همکاران (۲۰۱۵) و ژی وهمکاران (۲۰۰۸)به‌ترتیب با هیدرولیزآنزیمی پروتئین جانداردریایی *Tegillarca granosa* و گیاه یونجه، فعالیت مهارراديکال هیدروکسیل پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کردند(۹،۳۲).قارچ‌به‌عنوان‌یکی‌ازقدیمی‌ترین مواد غذایی با ارزش غذایی در نظرگرفته می‌شود، و ارزش غذایی‌آن‌قابل مقایسه با ماهی وگوشت، می‌باشد (۱۶). قارچ منبع‌مناسبی‌ازاسیدهای‌آمینه‌ضروری‌متعدد،پروتئین‌ها، ویتامینها، موادمعدنی‌وغیره‌است‌به‌همین دلیل مصرف آن رو به افزایش است. ازنظرارزش‌غذایی کلاهک قارچ به‌طور متوسط دارای رطوبت۰/۳۴± ۹۰/۷۶، پروتئین ۰/۱۵ ± ۳۳/۶۵، چربی۰/۲۰ ± ۲/۴۸، کربوهیدرات ۰/۲۷± ۲۰/۵۹، فیبر۰/۱۱ ± ۳۳/۱۱، خاکستر۰/۲۰± ۱۰/۱۷ درصد بر مبنای وزن خشک و ارزش غذایی‌ساقه‌قارچ‌به‌طور متوسط شامل رطوبت ۰/۲۷± ۹۰/۰۱، پروتئین۰/۲۴±۱۹/۰۱،چربی۰/۲۴ ±۲/۰، کربوهیدرات ۰/۴۲ ± ۳۱/۴۱، فیبر ۰/۱۸ ± ۳۸/۰۸، خاکستر ۰/۲۲ ± ۹/۵ درصد برمبنای وزن‌خشک می‌باشد. باتوجه به ویژگی‌های مذکور، قارچ می‌تواند به‌عنوان منبع مناسبی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زادر صنایع‌غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد (۲۴). یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم قارچ پروتئین است، و بنابراین منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌باشد (۱۹). هدف از این پژوهش تعیین زمان بهینه هیدرولیز پروتئین قارچ‌خوراکی با آنزیم‌های آلکالاز جهت حصول به حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی و سپس مقایسه قابلیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات تولید شده در غلظت‌های مختلف با اسید آسکوربیک‌به‌عنوان یک آنتی اکسیدان پرکاربرد در صنعت می باشد.

## ۲-مواد و روش‌ها

### ۲-۱-مواد

آلکالاز، DPPH، پتاسیم فری سیانید، فریک کلراید، تری کلرواستیک‌اسید،آسکوربیک اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی شهرگرگان تهیه شدند.

### ۲-۲-آماده‌سازی قارچ‌خوراکی

قارچ‌های خریداری شده ابتدا شسته و قطعه قطعه شده سپس توسط آب‌داغ آنزیم‌بری ( فرو بردن درآب جوش به مدت۳ دقیقه و سپس فرو بردن درآب یخ) شدند. سپس در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد درآون تا زمانی که رطوبت آن‌ها به زیر ۱۰درصد برسد، خشک شدند. در نهایت قارچ‌های خشک شده به‌کمک آسیاب‌آزمایشگاهی تبدیل به پودر شده و پس از عبور از الک با مش ۸۰ درکیسه‌های‌پلی‌پروپیلنی‌بسته بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (۱۳).

### ۲-۳-اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

#### ۲-۳-۱-اندازه‌گیری میزان پروتئین

میزان پروتئین نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیزشده) با استفاده از روش کجلدال اندازه‌گیری شد. به‌این صورت‌که ۱ گرم از نمونه به درون لوله هضم‌کجلدال افزوده شد و به‌آن ۲۰میلی‌لیتراسیدسولفوریک‌غلیظ‌ویک‌قرص‌کاتالیزورکجلدال افزوده شد. از یک لوله هضم بدون نمونه و حاوی اسید و کاتالیزور به‌عنوان شاهد استفاده شد. عمل هضم به‌مدت ۱۲۰ دقیقه و با توان ۸۰ دستگاه تا شفاف‌شدن‌محتوی‌دستگاه انجام شد. پس‌ازسردشدن و خروج بخارات اسیدی مرحله‌ی تقطیر با استفاده‌ازسود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد با استفاده از دستگاه تقطیر انجام‌گرفت. در نهایت تیتراسیون نمونه با اسیدکلریدریک۰/۱نرمال در حضور معرف متیل رد و تا ارغوانی‌شدن‌نمونه‌صورت‌گرفت.درصد ازت نمونه با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد (۵).

معادله(۱):

$$\text{درصد ازت نمونه} = \frac{1.4 \times N \times (V1 - V2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق N نرمالیته اسیدکلریدریک،$V_1$ حجم اسید مصرفی برای نمونه، $V_2$ حجم مصرفی برای شاهد وm وزن نمونه بر حسب‌گرم می‌باشد. به‌منظور محاسبه درصد پروتئین میزان‌ازت‌درفاکتورپروتئین(۶/۲۵)ضرب‌و میزان آن محاسبه گردید.

**۲-۳-۲-اندازه‌گیری‌میزان‌رطوبت**

۲گرم‌نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیزشده) در ظروف فلزی‌آلومینیومی مخصوص‌اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سردشدن در دیسکاتور و توزین مجدد میزان رطوبت از طریق معادله (۲) محاسبه گردید (۵).

معادله(۲)

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(W1-W2)}{m} \times ۱۰۰$$

در رابطه فوق $W_1$وزن ظرف و نمونه قبل خشک کردن و $W_2$ وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m وزن نمونه می‌باشد.

**۲-۳-۳-اندازه‌گیری میزان خاکستر**

۲گرم‌نمونه(پودرقارچو پروتئین هیدرولیزشده) در بوته چینی با وزن مشخص‌توزین‌گردید و پس از سوزاندن اولیه روی هیتر، بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. عمل‌حرارت‌دهی‌درکوره تا زمانی که رنگ خاکستر روشن‌شود ادامه یافت. پس از سردکردن بوته در دسیکاتوروتوزین مجدد، مقدار خاکستر نمونه ازطریق معادله (۳) محاسبه گردید (۵).

معادله(۳)

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{(W1-W2)}{m} \times ۱۰۰$$

در رابطه فوق $W_1$ وزن بوته و خاکستر و $W_2$ وزن بوته و m وزن نمونه می‌باشد.

**۲-۳-٤-اندازه‌گیری‌میزان‌چربی**

برای اندازه‌گیری چربی۳ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیزشده) روی کاغذ صافی توزین شد و پس از بستن کاغذصافی‌در قسمت استخراج‌کننده دستگاه سوکسله قرار داده شد. پس از متصل کردن بالن با وزن مشخص، بالن با حلال هگزان پر و عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام شد. در مرحله بعد، پس از قرار دادن بالن‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، جهت خارج کردن حلال باقیمانده، بالن مجدا توزین شد. درصد چربی با استفاده از طریق معادله (۴) محاسبه گردید (۵).

معادله (۴)

$$\text{درصدچربی} = \frac{(W1-W2)}{m} \times ۱۰۰$$

در رابطه فوق $W_1$ وزن بالن، $W_2$ وزن اولیه بالن و m وزن نمونه می‌باشد.

**۲-٤-تولید پروتئین هیدرولیز شده**

جهت انجام هیدرولیز با آلکالاز از روش هی و همکاران (۲۰۱۲) باکمی‌تغییرات استفاده شد (۱۳). ۵۰ گرم پودر قارچ رادربالن‌حجمی‌توزین‌ودر۱۰۰۰میلی‌لیتربافرفسفات (pH=۸) مخلوط‌گردید. سپس به‌منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیزشده‌باحداکثرفعالیت آنتی‌اکسیدانی، عمل هیدرولیز درطی‌زمان‌های۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰و ۲۵۰ دقیقه با نسبت آنزیم به سوبسترا ۲٪ (برمبنای پژوهش‌های قبلی) و در دمای۵۰ درجه‌سانتی‌گراد صورت گرفت. پس از اتمام زمان هیدرولیز به‌منظور غیرفعال‌کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح‌شده با آنزیم‌دردمای۸۵ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد. هر تیمار به طور جداگانه در سانتریفیوژی یخچالدارربا ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد برای مدت۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیزشده خشک شد. پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای۱۸-درجه‌سانتی‌گرادنگهداری شد (۱). سپس در مرحله بعدقابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در زمانهای مختلف‌توسط‌روش‌های‌فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون‌آهن‌وظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی کل اندازه‌گیری گردید.

**۲-٤-۱-فعالیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH**

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ mg/ml) حل شدند. سپس، ۱/۵ml از هر نمونه با ۱/۵ml از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب‌محلول‌سوپرناتانت‌در طول موج ۵۱۷ nm خوانده

شد (۹). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۵ محاسبه گردید:

معادله(۵)

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

**۲-٤-۲-قدرت احیاکنندگی آهن**

ابتدا پودرهای‌هیدرولیزشده در آب مقطر (۴۰mg/ml) حل شد. سپس۱میلی‌لیتر از هر نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافرفسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصدمخلوط‌گردید، و در دمای۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرو استیک اسید۱۰درصد به مخلوط اضافه و۱۰ دقیقه باسرعت۲۵۰۰دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید۰/۱درصد(حجمی/وزنی)مخلوط‌گردید. جذب نمونه در۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط، خوانده شده و میزان جذب به عنوان قدرت احیاءکنندگی آهن‌گزارش‌گردید.حجم یکسانی از آب‌مقطر به جای نمونه برای تهیه‌ی نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهندهٔ افزایش قدرت احیاءکنندگی است (۳).

**۲-٤-۳-ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل**

ابتدا ۰/۱ml از نمونه حل شده در آب مقطر(۴۰(mg/ml) با ۱ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی مولار وآمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله اپندورف ریخته و به مدت۹۰ دقیقه در حمام آب۹۰ درجه سانتی‌گراد قرارگرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد و نتایج جذب به عنوان قدرت آنتی اکسیدانی کل گزارش‌گردید. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل بیشتر است (۲۶).

**۲-۵- بررسی تاثیر غلظت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی تیمار بهینه هیدرولیز شده**

پس از تعیین زمان بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با حداکثر قابلیت آنتی‌اکسیدانی، شرایط مذکور جهت تولید هیدرولیزشده بهینه مورد استفاده قرار گرفت. در مرحله بعد تاثیر غلظت‌های مختلف (۱۰ تا ۵۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) بر روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی و مقایسه آن با اسید آسکوربیک (با غلظت ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مورد بررسی قرار گرفت.

**۲-۵-۱-فعالیت مهار رادیکال‌آزادDPPH**

برای‌تعیین‌تاثیرغلظت‌پروتئین‌هیدرولیزشده(۵۰mg/ml -۱۰) برفعالیت‌مهارادیکال آزاد DPPH از روش چی و همکاران (۲۰۱۵)که در بخش۲-۱-۴ شرح‌داده‌شد استفاده‌گردید (۹).

**۲-۵-۲-تعیین قدرت احیاءکنندگی یون‌آهن**

برای‌تعیین‌تاثیرغلظت‌پروتئین‌هیدرولیزشده(۵۰mg/ml -۱۰) برقدرت‌احیاءکنندگی‌یون آهن از روش احمدی و همکاران (۲۰۰۷)که‌دربخش۲-۴-۲شرح داده شد استفاده گردید (۳).

**۲-۵-۳-ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل**

برای‌تعیین‌تاثیرغلظت‌پروتئین‌هیدرولیزشده(۵۰mg/ml-۱۰) قدرت احیاءکنندگی یون آهن از روش پری تو و همکاران (۱۹۹۹) که در بخش۲-۴-۳ شرح داده شد استفاده‌گردید (۲۶).

**۲-٦-تجزیه و تحلیل‌آماری**

دراین پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰،۲۰۰و۲۵۰ دقیقه) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده‌ی‌قارچ‌خوراکی‌وهم‌چنین‌تاثیرغلظت‌های‌مختلف تیماربهینه(غلظت۵۰mg/ml-۱۰)برویژگی‌های‌آنتی‌اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرارگرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌داربودن متغیر در P<۰/۰۵ و رسم نمودارها نیز با نرم‌افزار Excel 2013 انجام گرفت.

## ۳- نتایج و بحث

**۳-۱-ترکیب شیمیایی**

ترکیبات‌شیمیایی پودرقارچ و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آن در جدول ۱ آورده شده است. همان طورکه در جدول

زیر مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت پودرقارچ برابر با ۰/۵۲ ±۶/۲ درصد بود. مقدار رطوبت قارچ‌خوراکی در حدود ۹۰ درصد بودکه‌درطی‌فرآیندخشک‌کردن به این میزان کاهش داده شد. میزان‌چربی‌وخاکسترپودرقارچ براساس‌وزن‌خشک، به‌ترتیب (۰/۱۵ ±۳/۸) و (۰/۱۷ ±۷/۶۶) بود؛ که به ترتیب کمتر و بیشتر از مقادیر گزارش‌شده در منابع می‌باشند (۲۴). میزان‌پروتئین‌پودرقارچ‌برابربا۱/۲۶±۲۶/۶ درصد اندازه‌گیری شد. اوبوه (۲۰۰۹) میزان پروتئین موجود درکلاهک و ساقه قارچ را به‌ترتیب ۰/۱۵ ±۳۳/۶۵ و۰/۲۴ ±۱۹/۰۱، میزان خاکستر را به‌ترتیب ۰/۲۰ ±۱۰/۱۷ و۰/۲۲ ±۹/۵، و میزان چربی را به‌ترتیب۰/۲۰±۲/۴۸ و۰/۲۴±۲/۰۰ گزارش نمودند (۲۴). علت‌تفاوت‌ترکیبات شیمیایی نمونه به‌کارگرفته شده‌ی این پژوهش با پژوهش‌های قبل را می‌توان به‌دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرآیند خشک‌کردن نسبت داد. بعد از فرآیند هیدرولیز، میزان پروتئین در محصول هیدرولیز شده حاصل برابر با ۳۱/۹۴ درصد بود. دلیل افزایش میزان پروتئین درمحصول‌تولیدی‌فرآیندهضم‌آنزیمی‌وبه‌دنبال آن سانتریفوژ محصول‌تولیدی‌بودکه‌موجب‌حذف‌یکسری‌ترکیبات‌موجود در قارچ از جمله چربی و همچنین ترکیبات معدنی متصل به ساختار می‌گردد.

**جدول۱- ترکیب شیمیایی پودرقارچ و پروتئین هیدرولیزشده‌قارچ (برحسب درصد)**

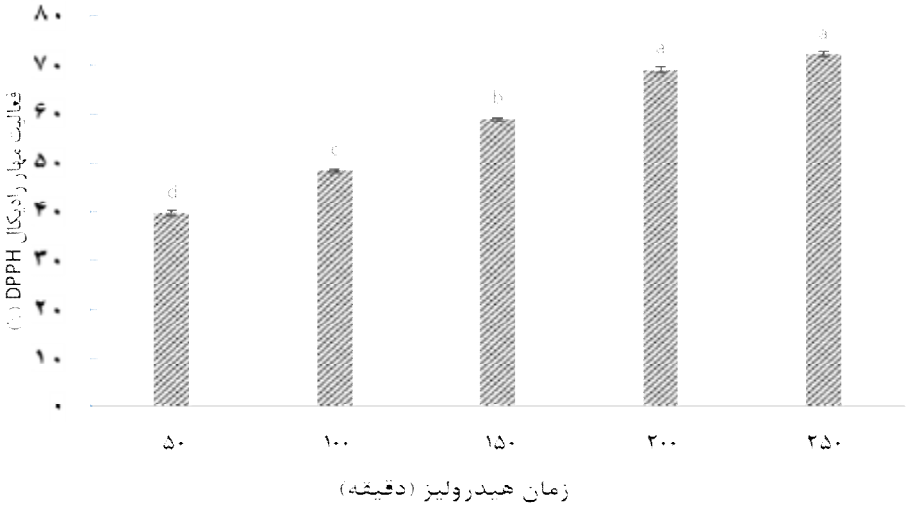
| ترکیب | پودرقارچ | پروتئین هیدرولیزشده‌قارچ |
|---|---|---|
| پروتئین (N×٦/٢٥) | ٢٦/٦ ± ٠/١٧ | ٣١/٩٤ ± ١/٤١ |
| چربی | ٣/٨ ± ٠/١٥ | – |
| رطوبت | ٦/٠٢ ± ٠/٥٢ | ٨/٧٩ ± ٠/١٧ |
| خاکستر | ٧/٦٦ ± ٠/١٢ | ٤/٢٦ ± ٠/٢٣ |
| کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات) | ٥٥/٩٢ ± ٠/١٥ | ٥٥/٠١ ± ٠/٧ |

*اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

*میانگین سه تکرار± انحراف معیار

**۳-۲-فعالیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH**

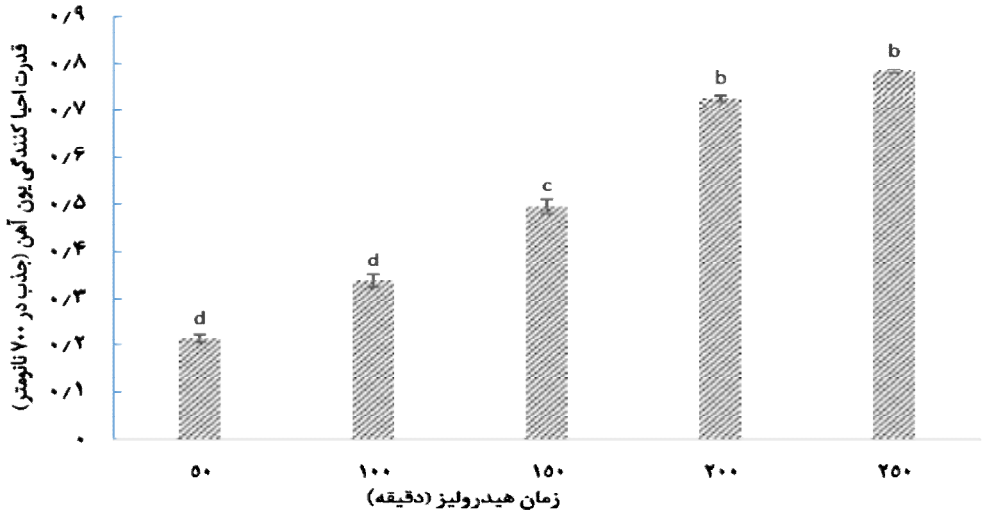
DPPH،رادیکال‌آزادمحلول‌درچربی‌است‌که‌دارای‌ماکزیمم جذب‌در۵۱۷ نانومتراست و پس از دریافت هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان‌به‌ترکیبی پایدار تبدیل می‌شود و جذب آن‌کاهش‌می‌یابد(۳۴،۳۵). نتایج‌حاصل‌ازارزیابی‌زمان‌هیدرولیز نشان‌می‌دهدکه‌با افزایش‌زمان‌هیدرولیز، قدرت مهار رادیکال DPPH، پروتئین‌های هیدرولیزشده به میزان قابل توجهی افزایش‌یافت($p<0/05$)،به‌طوری‌که‌درموردنمونه‌های‌حاصل از آلکالاز در محدوده‌ی ۷۲/۲۱-۳۹/۷ درصد بود. بنابراین افزایش‌زمان‌و درجه‌هیدرولیز منجربه‌تولید پپتیدهای دهنده ی پروتون‌شده‌که می‌توانند با رادیکال DPPH، واکنش داده و آن رابه‌ترکیبات پایدار تبدیل کنند و به واکنش‌های زنجیره ای رادیکالی‌خاتمه دهند. قدرت‌آنتی‌اکسیدانی به نوع پروتئاز به‌کار رفته، شرایط هیدرولیز، توالی وترکیب آمینواسیدی پپتیدهای‌حاصل‌بستگی‌دارد.گزارش‌شده‌است‌که‌تری‌پپتیدهایی که‌دارای‌لیزین‌یاتریپتوفان‌درانتهای‌Cهستندقدرت‌آنتی‌اکسیدانی قابل‌توجهی از خود نشان می‌دهند (۲۸). جامدار و همکاران (۲۰۱۰)، یوو همکاران(۲۰۰۹) و لی‌چن وهمکاران (۲۰۰۷)، نیزبه‌ترتیب باهیدرولیز پروتئین‌های سویا، ماهی تیان و کلاژن خوکی، رابطه‌ی مستقیمی‌را بین قدرت مهار رادیکال DPPH ودرجه هیدرولیزگزارش‌کردند که موافق با نتایج این تحقیق بود (۱۵،۲۰،۳۴).




**شکل۱- تاثیر زمان هیدرولیز برفعالیت مهار رادیکالDPPH پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی**

### ۳-۳-قدرت احیاءکنندگی یون‌آهن

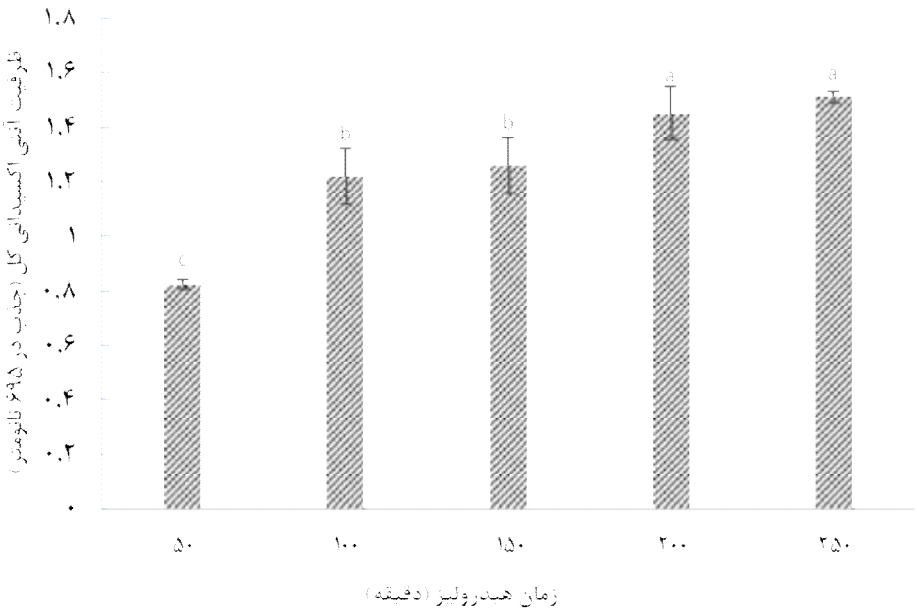
ارزیابی قدرت احیاء کنندگی در جهت سنجش قابلیت الکترون‌دهندگی ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به کار می‌رود. مطالعات مختلف نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاءکنندگی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال وجود دارد(۳۳). همان‌طورکه در شکل ۲، مشاهده می‌گردد، در تمامی نمونه‌های حاصل از هیدرولیز با آلکالاز با افزایش زمان هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن‌افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). این‌یافته‌ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم آلکالازبرافزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌اولیه می‌باشد. به‌طورکلی افزایش زمان با افزایش درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی می‌شود. این امر می‌تواند به‌دلایل مختلفی باشد از جمله این‌که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به‌آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (۳۶). از طرف دیگر افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرارگرفتن بیشتر آمینواسیدهای الکترون دهنده مانند لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌گردد که در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد (۱۵). یو و همکاران (۲۰۰۹)، زو و همکاران (۲۰۰۸)، وو و همکاران (۲۰۰۳)، به‌ترتیب افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده‌ی حاصل از ماهی‌تیان، زئین و ماهی ماکرل را گزارش کردند (۳۴،۳۶،۳۱). بررسی‌ها نشان داده است که با افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، پپتیدهای با قابلیت دادن الکترون جهت احیای یون آهن‌سه‌ظرفیتی‌به‌یون آهن دو ظرفیتی افزایش می‌یابند (۱۷). افزایش‌زمان‌هیدرولیزمی‌تواندمنجربه‌افزایش‌رهایش پپتیدهای دهنده‌ی‌الکترون‌شود ودرنتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. این نتایج موافق با یافته‌های خانتافنت و همکاران (۲۰۱۱)بودکه با هیدرولیزپروتئین گوشت‌ماهی گزارش کردند که‌افزایش زمان هیدرولیز همراه با افزایش درجه‌ی هیدرولیز منجربه‌افزایش قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل گردید (۱۸) که با نتایج سایر محققین در این زمینه هم‌خوانی دارد (۱۵، ۱۷، ۲۳).




**شکل۲- تاثیر زمان هیدرولیز بر قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از قارچ خوراکی**

**۳-٤-ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل**

ارزیابی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی‌به‌مولیبدن ۵ ظرفیتی است و روشی کمی برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی(قدرت‌آنتی‌اکسیدانی کل)است‌که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است (۲۶). در این پژوهش‌هیدرولیز به میزان‌قابل‌توجهی منجر به افزایش ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی‌پروتئین قارچ خوراکی گردید، افزایش زمان‌هیدرولیز همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها شد و با ادامه‌ی فرآیند هیدرولیز تا ۲۵۰ دقیقه قدرت آنتی‌اکسیدانی به طورمعنی‌داری افزایش یافت هر چند تفاوت معنی‌داری با زمان ۲۰۰ دقیقه مشاهده نشد($p<۰/۰۵$). درواقع با افزایش زمان‌فعالیت‌آنزیم‌های‌آلکالاز،رهاسازی‌پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی افزایش یافته است. این پپتیدها توانسته‌اند رادیکال‌های‌آزادرا به ترکیباتی پایدار با واکنش‌پذیری کمتر تبدیل‌کنند و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌کل نمونه‌ها با افزایش‌زمان‌افزایش‌یافته‌است(۴).افزایش‌ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز نشان می‌دهد که‌آنزیم‌آلکالازباشکستن‌زنجیره‌ی‌پروتئینی‌توانسته پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی‌کل افزایش یافته است (۴). تغییر در طول زنجیره‌های پپتیدی با گذشت زمان هیدرولیز نیز تأثیر به سزایی در قدرت ضد اکسایش دارد و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین دارای فعالیت ضداکسایش قوی‌تری هستند (۴). افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نشان از عملکرد مناسب آنزیم آلکالاز در تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی دارد و در نتیجه رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر تبدیل شده‌اند و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است (۴).




**شکل۳- تاثیر زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل پروتئین هیدرولیزشده قارچ**

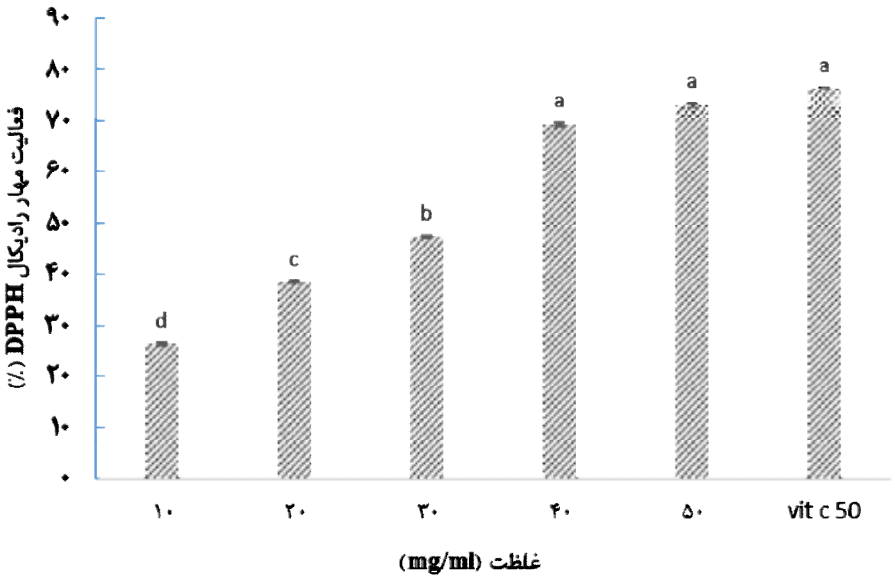
### ۳-۵-تاثیرغلظت‌برخصوصیات‌آنتی‌اکسیدانی‌تیمار بهینه هیدرولیز شده

نتایج حاصل از بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده در طی زمان‌های مختلف در بخش قبل نشان داد که افزایش زمان هیدرولیز منجر به افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی می‌گردد اما بین نمونه‌های هیدرولیزشده‌درزمان‌های ۲۰۰و۲۵۰دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده‌نشد($p<۰/۰۵$) در نتیجه زمان ۲۰۰ دقیقه جهت تولید تیمار بهینه مورد استفاده قرار گرفت. سپس در شرایط بهینه حاصل(زمان ۲۰۰ دقیقه، دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲ درصد) هیدرولیز انجام شد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی‌تیماربهینه‌ازنظرقدرت مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی یون آهن و آنتی‌اکسیدانی کل، در غلظت‌های (mg/ml)۵۰-۱۰درمقایسه با اسیدآسکوربیک(۵۰میلی‌گرم در میلی لیتر) سنجیده شد.

#### ۳-۵-۱-تاثیرغلظت بر میزان مهار رادیکال آزادDPPH

تاثیرغلظت‌های‌مختلف‌پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت mg/ml ۵۰-۱۰) بر روی میزان مهار رادیکال آزاد DPPH درمقایسه با اسیدآسکوربیک در شکل۴ آورده شده است. نتایج بیانگر این است که پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی از نظر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت میزان مهارراديكال‌آزادDPPH آن افزایش یافت. بین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز شده حاصل در غلظت‌های۴۰ و ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری وجود نداشت و از نظر قابلیت مهارکنندگی مشابه اسید آسکوربیک عمل نمودند. باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) و چی و همکاران (۲۰۱۵) به ترتیب با هیدرولیز پروتئین ماهی *Aphanopus carbo* و *Tegillarca granosa* فعالیت مهار رادیکال DPPH پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش‌کردند (۹،۶). ژائو و همکاران (۲۰۱۲) با هیدرولیز پروتئین برنج با آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم، پروتامکس، نوترئاز و تریپسین مشاهده کردند که بیشترین فعالیت مهار رادیکالDPPHمربوط‌به‌پپتیدهای‌حاصل‌از آنزیم پروتامکس است و پپتیدهای حاصل از تمامی آنزیم‌ها، رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهند و قدرت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها در بیشترین غلظت از قدرت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث کمتر است. این محققان گزارش کردندکه فعالیت آنتی‌اکسیدانی

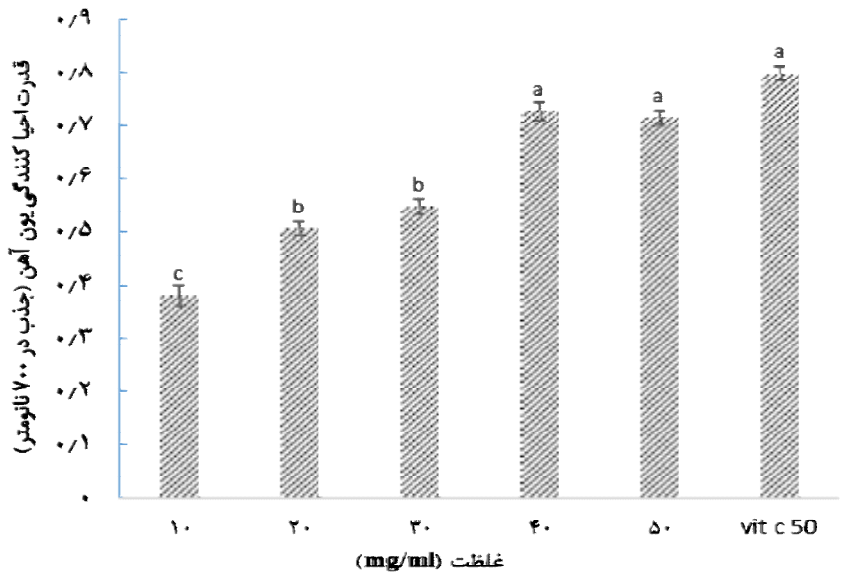
پپتیدهای‌حاصل از هیدرولیز به نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز بستگی دارد و با افزایش غلظت پپتیدها می‌توان به قدرت آنتی‌اکسیدانی مشابه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی (ویتامین ث) دست‌پیداکرد(۳۶).آمایاپارواتی‌وهمکاران(۲۰۱۴)با هیدرولیز پروتئین‌صدف خوراکی گزارش کردند که با افزایش غلظت پپتیدهای حاصل قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد (۳۰).




شکل٤- مقایسه قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیزشده قارچ خوراکی‌درغلظت های‌مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک

**۳-۵-۲-تاثیرغلظت بر قدرت احیاکنندگی‌یون‌آهن**

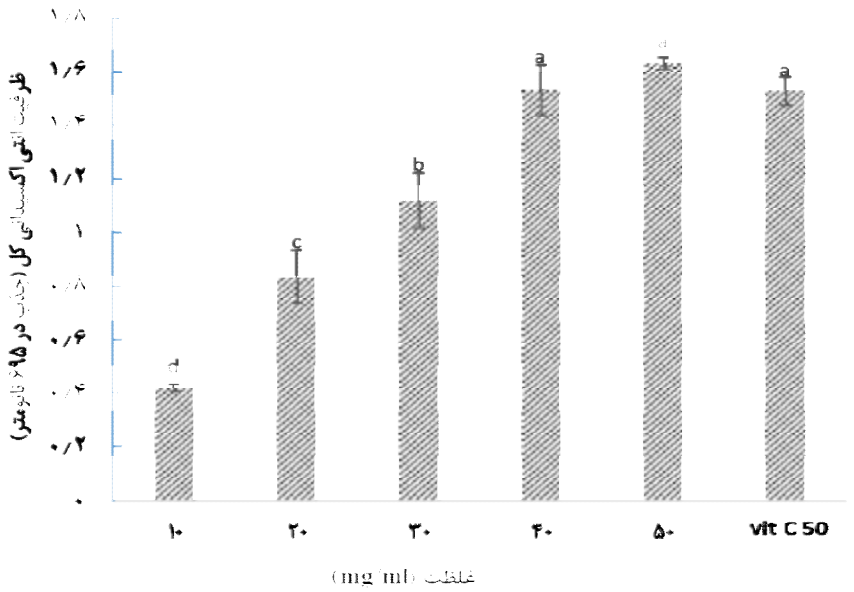
تاثیرغلظت‌های‌مختلف‌پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت۵۰-۱۰mg/ml) بر روی میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در مقایسه با اسید آسکوربیک در شکل ۵ آورده شده است. نتایج بیانگر این است که پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی از نظر میزان قدرت احیاءکنندگی‌یون آهن رفتاری وابسته به غلظت از خود نشان می‌دهد و با افزایش غلظت، میزان‌قدرت‌احیاءکنندگی‌یون‌آهن آن افزایش یافت. بین میزان‌قدرت‌احیاءکنندگی‌یون‌آهن هیدرولیز شده حاصل درغلظت‌های ۴۰و ۵۰ میلی‌گرم‌برمیلی‌لیتر اختلاف معنی داری وجود نداشت و از نظرمیزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن مشابه‌اسیدآسکوربیک‌عمل‌نمودند.کامبی‌و همکاران (۲۰۰۸) و ژی و همکاران (۲۰۰۸) نیز به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین کانولا وگیاه یونجه، قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل را وابسته به غلظت گزارش کردند (۱۰،۳۲). این نتایج در تطابق با نتایج تحقیقات اومایاپاراواتی و همکاران (۲۰۱۴)، زائو و همکاران (۲۰۱۲) به‌ترتیب تاثیر غلظت‌های متفاوت را برقدرت‌احیاءکنندگی‌پروتئین‌هیدرولیزشده‌صدف خوراکی، برنج و دانه شنبلیله بررسی کردند، می‌باشد (۳۰،۳۵).




**شکل۵-مقایسه قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیزشده قارچ خوراکی در غلظت‌های مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک**

**۳-۵-۳-تاثیر غلظت بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل**

تاثیرغلظت‌های‌مختلف‌پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی (غلظت۵۰-۱۰mg/ml) بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در مقایسه با اسید آسکوربیک در شکل ۶ آورده شده است. نتایج نشان دادکه پروتئین هیدرولیزشده قارچ خوراکی از نظرمیزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل رفتاری وابسته به غلظت ازخودنشان‌می‌دهد وبا افزایش غلظت، ظرفیت‌آنتی‌اکسیدانی کل‌آن‌افزایش‌یافت. بین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌حاصل‌درغلظت‌های ۴۰و ۵۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اختلاف معنی‌داری‌وجودنداشت و از نظرمیزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل‌مشابه‌اسیدآسکوربیک عمل نمودند. بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹) با تولید پروتئین هیدرولیز شدهٔ ماهی *Mustelus mustelus*، گزارش کردند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیزشده‌های حاصل وابسته به غلظت است و با افزایش غلظت به‌میزانی چشمگیر افزایش می‌یابد، اما کمتر از قدرت آنتی اکسیدانی BHA است (۷). آمایاپاروواتی و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌کل‌پروتئین‌های‌هیدرولیزشده‌ی صدف‌خوراکی‌راوابسته به‌غلظت‌گزارش‌کردند و بیان کردند که بیشترین فعالیت‌آنتی‌اکسیدانی‌کل در غلظت (mg/ml)۱ حاصل‌شد اما از نمونه‌ی کنترل (ویتامین ث) کمتر بود (۳۰).




**شکل٦-مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیزشده قارچ خوراکی در غلظت‌های مختلف در مقایسه با اسید آسکوربیک**

## ٤- نتیجه‌گیری

اکسیداسیون و تشکیل رادیکال‌های آزاد در مواد غذایی و همچنین اندام‌های هوازی امری اجتناب‌ناپذیر است. رادیکال‌های آزاد منجر به بروز بیماری‌های خطرناکی مانند بیماری‌های قلب و عروقی، آلزایمر و ... می‌شوند. در صنعت مواد غذایی از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی جهت ممانعت از اکسیداسیون استفاده‌می‌شوداما عوارض جانبی این ترکیبات باعث افزایش توجه صنعت غذا و محققین برای شناسایی و استخراج آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است. در میان آنتی‌اکسیدانهای طبیعی، پروتئین‌های هیدرولیز شده از جمله ترکیبات زیست فعال‌هستند که‌خواص سلامتی بخش متفاوتی از جمله خواص آنتی‌اکسیدانی‌ازخودنشان می‌دهند. در این پژوهش هیدرولیز پروتئین قارچ با آنزیم آلکالازطی زمان‌های ۲۵۰-۵۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌سانتی گرادونسبت آنزیم به سوبسترای ۲٪ انجام شد. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌ها نشان داد که‌باافزایش زمان‌هیدرولیز تا ۲۰۰ دقیقه، خواص آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، احیاءکنندگی یون آهن وظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل)افزایش یافت‌امااافزایش بیشترزمان هیدرولیز تاثیرمعنی‌داری بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن نداشت. از سوی دیگربررسی تاثیرغلظت‌پروتئین هیدرولیزشده قارچ بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان دهنده‌ی وابستگی فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزشده‌های حاصل به غلظت مورد استفاده بود. در تمامی‌خواص آنتی‌اکسیدانی‌موردبررسی‌قابلیت‌آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده قارچ در غلظت‌های (mg/ml) ۵۰ و ۴۰باخاصیت آنتی‌اکسیدانی‌ویتامین‌ث‌به‌عنوان‌یک‌آنتی‌اکسیدان سنتزی در غلظت (mg/ml) ۵۰، تفاوت معنی‌داری نداشت. این امر حاکی از قابلیت بالای پروتئین هیدرولیز شده‌ی قارچ تولیدی‌دراین‌پژوهش‌جهت‌رقابت‌با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشد. بنابراین، هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ با آنزیم آلکالاز راهکاری مناسب برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجه می‌باشد؛ به‌طوری‌که با مطالعات‌بیشتر وبررسی خواص سلامتی‌بخش آن به‌صورت درون‌تنی می‌توان از پروتئین هیدرولیز شده تولیدی به‌عنوان جایگزین آنتی‌اکسیدان‌های‌سنتزی‌در فرمولاسیون‌های غذایی به کار برد.

## ٥-منابع


۱. پدرام نیا، ا، مرتضوی، ع، صادقی ماهونک، ع، الهامی‌راد، ا، و آرمین، م، ۱۳۹٦. بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه

(Citrullus lanatus)با ارزیابی فعالیت چلات کنندگی‌با استفاده از روش سطح پاسخ. نوآوری در علوم و فناوری‌غذایی، ۹(٤)، صص.۱۳۳-۱۲۳.

۲. سلمانیان، ش، صادقی ماهونک, ع، خمیری، ماستری فراهانی، م، ۱۳۹۲. اسیدهای فنولی، فعالیت ضد رادیکالی و ضد میکربی عصاره متانولی برگ‌های اوجی. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران ۸(۲)، صص.۱٥٤-۱٤٥.

3. Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M., 2007. Antioxidant activity of *Kelussia odoratissima* Mozaff. in model and food systems. *Food Chemistry*, *105*(1), pp. 57-64.
4. Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (Morus indica L.) leaves. *Food Chemistry*, *102*(4), pp.1233-1240.
5. Association of Official Agricultural Chemists .,1975. *Official methods of analysis* (Vol. 222). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
6. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M. and Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process biochemistry*, *45*(1), pp.18-24.
7. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, *114*(4), pp.1198-1205.
8. Blanca, H. L., Ana, Q., Lourdes, A., and Isidra, R., 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, 17, pp. 42–49.
9. 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*, pp. 301-313.
10. Cumby, N., Zhong, Y., Naczk, M. and Shahidi, F., 2008. Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *109*(1), pp.144-148.
11. E Silva, F.G.D., Hernández-Ledesma, B., Amigo, L., Netto, F.M. and Miralles, B., 2017. Identification of peptides released from flaxseed (*Linum usitatissimum*) protein by Alcalase® hydrolysis: Antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, *76*, pp. 140-146.
12. Guimaraes, F., and Maria, F., 2017. Identification of peptides released from Flaxseed (*Iinum Usitatissimum*) protein by alcalase® hydrolysis: antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology*, 76, pp.140-146
13. He, J.Z., Ru, Q.M., Dong, D.D. and Sun, P.L., 2012. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, *17*(4), pp. 4373-4387.
14. Hernandez-Ledesma, B., Quiros, A., Amigo, L. and Recio, I., 2007. Identification of bioactive peptides after digestion of human milk and infant formula with pepsin and pancreatin. *International Dairy Journal*, *17*(1), pp. 42-49.
15. 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*(1), pp.178-184.
16. Janakat, S., Al-Fakhiri, S. and Sallal, A. K., 2004. A promising peptide antibiotic from *Terfezia claveryi* aqueous extract against Staphylococcus aureus in vitro. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological*

*Evaluation of Natural Product Derivatives*, *18*(10), pp.810-813.

17. 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), pp.1266-1272.
18. Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R., 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brown stripe red snapper (Lutjanus vitta). *LWT-Food Science and Technology*, *44*(4), pp.1139-1148.
19. Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I., Hadar, Y. and Schwartz, B.,2012. Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of Gastroenterology*, *47*(5), pp.504-518.
20. Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B. and Wu, Y., 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food Chemistry*, *102*(4), pp.1135-1143.
21. 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), pp.444-450.
22. Matthäus, B., 2002. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *50*(12), pp. 3444-3452.
23. Nourmohammadi, E. and Sadeghi Mahoonak, A. R., 2019. Health implications of bioactive peptides: A Review. International Journal for Vitamin and Nutrition Research, 88 (5), pp. 319-343.
24. Oboh, G. and Shodehinde, S.A., 2009. Distribution of nutrients, polyphenols and antioxidant activities in the pilei and stipes of some commonly consumed edible mushrooms in Nigeria. *Bulletin of the Chemical Society of Ethiopia*, *23*(3), pp.391-398.
25. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, *115*(1), pp.238-242.
26. Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M., 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*, *269*(2), pp. 337-341.
27. Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. and Kim, S.K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *16*(9), pp.562-569.
28. Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T. and Nokihara, K., 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *51*(12), pp.3668-3674.
29. Sun, Q., Shen, H. and Luo, Y., 2011. Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, *48*(1), pp.53-60
30. Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T., 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, *4*(3), pp.343-353.
31. 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), pp.949-957.

32. Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *111*(2), pp. 370-376.
33. Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A.A., Algur, Ö.F. and Bilaloğlu, V., 2000. Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (*Tilia argentea Desf* ex DC), sage (*Salvia triloba* L.), and Black tea (*Camellia sinensis*) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *48*(10), pp. 5030-5034.
34. 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*(2), pp.235-240.
35. Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q., 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chemistry*, *134*(3), pp.1360-1367.
36. 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), pp. 2714-2721.

(Original Research Paper)

# Production of Hydrolyzed Protein from Edible Mushroom Using Alcalase Enzyme:Investigation of the Effect of Hydrolysis Time and Concentration of Protein Hydrolysate on Its Antioxidant Capacity

**Isan Izanloo[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2*], Hoda Shahiri Taberestani[3], Shima Kaveh[4]**

1-MS.c Student 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-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
4-Ph.D Student of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received:18/04/2022 Accepted:09/05/2022

**Abstract**

Due to concerns about the safety and long-term health of synthetic antioxidants such as BHT and BHA, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, has attracted the attention of many researchers. The aim of this study was to determine the optimum hydrolysis time of edible mushroom protein (*Agaricus bisporus*) with alcalase enzyme to produce protein hydrolyzate with high antioxidant properties. For this study, first edible mushrooms were converted into powder and then was hydrolyzed in different times of 200, 150, 100, 50 and 250 minutes with an enzyme to substrate of 2% at temperature of 50 °C and then appropriate treatment based on antioxidant properties of the produced sample was determined. The results showed that hydrolysis time 200 minutes is suitable to achieve maximum antioxidant properties. Next, the effect of different concentrations (10 to 50 mg/ml) of hydrolyzed protein prepared under optimal conditions on the antioxidant properties of the product compared to ascorbic acid (50 mg/ml) was investigated. In all the tests, the product showed a concentration-dependent behavior and with increasing concentration, the DPPH free radical scavenging, iron ion reduction power and total antioxidant power increased and in concentrations of 40 and 50 mg/ml the antioxidant power was similar to ascorbic acid (50 mg/ml). The results showed that the hydrolyzed protein produced has the potential to be used as a functional ingredient and as an alternative to synthetic antioxidants in food formulations.

**Keywords:** Hydrolysis Time, Enzymatic Hydrolysis, Edible Mushroom, Antioxidant Properties, Protein Hydrolysate.

*Corresponding Authors: sadeghiaz@gau.ac.ir