تاثیر نوع پیش‌تیمار و آنزیم بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده قارچ‌خوراکی (*Agaricus bisporus*)

آیسان ایزانلو[a]، علیرضا صادقی ماهونک[b] *

[a] *دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*

[b] *استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران*

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۱/۰۶/۱۱ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۱/۱۰/۱۳

https://dorl.net/dor/20.1001.1.20080123.1402.20.3.3.5 DOI: 10.30495/jftn.2023.69244.11218

چکیده

مقدمه: رادیکال‌های آزاد حاصل از واکنش‌های اکسیداسیون باعث افت کیفیت مواد غذایی و همچنین عامل بروز بیماری‌های مختلف نظیر سرطان می‌باشند. در همین راستا، کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی، نظیر پپتیدهای زیست‌فعال مورد توجه محققین می‌باشد.

مواد و روش‌ها: هدف از این پژوهش مقایسه اثر چهار آنزیم آلکالاز، تریپسین، پپسین، پانکراتین، بدون و با پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت در شرایط اپتیمم هیدرولیز (برمبنای تحقیقات قبلی) بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده قارچ‌دکمه‌ای (Agaricus bisporus) بود. در این پژوهش عمل هیدرولیز جهت رسیدن به حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با نسبت آنزیم به سوبسترا ۱٪ و در دمای اپتیمم هر آنزیم با و بدون پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت (مایکروویو با توان ۱۲۰W و سپس هیدرولیز با آنزیم در زمان ۹۰ دقیقه و پیش‌تیمار فراصوت با توان ۱۶۰وات سپس هیدرولیز با آنزیم در زمان ۶۰ دقیقه و برای نمونه‌های بدون پیش‌تیمار زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه جهت هیدرولیز توسط هرآنزیم) انجام گرفت.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل به‌میزان ۱/۶۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) با هیدرولیز توسط آنزیم پپسین، بالاترین قدرت احیاءکنندگی یون‌آهن به‌میزان ۲/۸۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) با هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز، بالاترین قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن به‌میزان ۶۵/۰۸٪ با هیدرولیز توسط آنزیم تریپسین و بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به‌میزان ۸۰/۵۷٪ با هیدرولیز توسط آنزیم پپسین همگی درنمونه‌های پیش تیمارشده با فراصوت ۱۶۰ وات در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه مشاهده شد. پیش تیمار فراصوت و سپس پیش تیمار مایکروویو کارایی بالایی را در بهبود ویژگی آنتی اکسیدانی نمونه‌های هیدرولیز شده نسبت به نمونه‌های بدون پیش تیمار در زمان کوتاه‌تر هیدرولیز نشان دادند.

نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد که جهت ایجاد ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی مورد نظر در پروتئین هیدرولیز شده حاصل از قارچ خوراکی، بایستی از ترکیب خاص آنزیم هیدرولیز کننده و پیش تیمار استفاده نمود و پیش تیمار فراصوت نسبت به مایکروویو کارایی بهتری در این زمینه از خود نشان داد. پروتئین هیدرولیز شده تولیدی از قارچ‌خوراکی با ترکیب مختلف آنزیم و پیش‌تیمار از خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی برخوردار بود و بنابراین می‌تواند به عنوان یک جزء فراسودمند در فرمولاسیون مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: *پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت، قارچ‌خوراکی‌دکمه‌ای، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز آنزیمی*

* نویسنده مسئول مکاتبات email: sadeghiaz@gau.ac.ir

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 به‌سن ایفا می‌کنند. عواملی که در این بیماری‌ها نقش دارند پراکسیدهای لیپیدی و ترکیباتی با وزن مولکولی کم می‌باشند که در مرحله نهایی واکنش‌های اکسیداسیون تولید می‌گردند؛ بنابراین برای جلوگیری از این اثرات در موادغذایی و حفاظت از بدن در برابر این بیماری‌ها، جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها و تشکیل رادیکال‌های آزاد فرآیندی حائز اهمیت می‌باشد (Rajapakse *et al*., 2005). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی کاربرد زیادی در صنعت موادغذایی دارند، اما افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان و نگرانی‌ها در رابطه با اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی باعث افزایش توجه محققین به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی شده است (Parker *et al*., 2003). پپتیدهای زیست‌فعال توالی‌هایی با ۲۰-۳ اسیدآمینه هستند که از شکسته‌شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می‌شوند (Nourmohammadi *et al*., 2017). پپتیدهای زیست‌فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی برعملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری برسلامتی می‌شود. ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال برروی منابع پروتئینی مختلف مانند پروتئین سویا (Beermann *et al*., 2009)، پروتئین آب‌پنیر (Zhang *et al*., 2013)، سفیده‌تخم‌مرغ (Nimalaratne *et al*., 2015) و تخم‌کتان (Gao *et al*., 2010) مورد بررسی قرار گرفته است. رایج‌ترین روش تولید پپتیدهای زیست‌فعال، هیدرولیز پروتئین‌ها به کمک آنزیم‌ها می‌باشد (Korhnen *et al*., 2006). خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده به‌عوامل زیادی از جمله نوع سوبسترا، شرایط هیدرولیز (دما، زمان، pH) نوع آنزیم و نوع فرآیند پیش‌تیمار پروتئین بستگی دارد. فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می‌باشند (Zhou *et al*., 2017). درنتیجه امروزه از روش‌های مختلف نظیرامواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا و غیره برای پیش‌تیمار پروتئین و رفع مشکلات فوق استفاده می‌شود (Li *et al*., 2018). علاوه بر این کاربرد پیش‌تیمار باعث بهبود دسترسی آنزیم به‌نقاط شکست سوبسترا و افزایش درجه هیدرولیز می‌گردد (Pan et al., 2016). استفاده ترکیبی از پیش‌تیمار و هیدرولیز آنزیمی باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود (Chen *et al*., 2011). فراصوت، به‌عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود (Wen *et al*., 2018). گزارش شده است که فراصوت می‌تواند به‌طور قابل توجهی هیدرولیز آنزیمی و خواص پروتئین‌ها را بهبود ببخشد (Wang *et al*., 2015). فرایند فراصوت تاثیری برروی ساختار اولیه پروتئین ندارد با این حال موجب تغییر در ساختار سوم و چهارم پروتئین می‌گردد که این امر در ویژگی‌های عملکردی و زیست‌فعالی آن تاثیرگذار است(Walters, 2019). تحقیقات نشان داده است که پیش‌تیمار فراصوت پروتئین جوانه گندم بدون چربی با فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی، غلظت پپتید بالاتری را در پروتئین هیدرولیزشده نسبت به نمونه بدون پیش‌تیمار فراصوت نشان داد (Qu *et al*., 2013). مکانیسم فراصوت به تأثیرات حرارتی، کاویتاسیون و کارایی مکانیکی آن نسبت داده می‌شود به‌طوری که می‌تواند باعث افزایش انتقال جرم و افزایش تماس بین سوبسترا و آنزیم یا تغییر در ساختار فضایی سوبسترا گردد (Chandrapala *et al*., 2012). پیش‌تیمار مایکروویو روشی تمیز، سریع، راحت و مقرون به صرفه برای گرم کردن می‌باشد، که می‌تواند با قطبی کردن درشت مولکول‌ها، اثر گرمایی ایجاد کند و در نتیجه با قطب‌های میدان الکترومغناطیسی همسو شده، که ممکن است باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی شود (Saha *et al*., 2011). گرمایش مایکروویو عامل تغییرات ساختاری پروتئین‌ها می‌باشد به‌طوری که پس از جذب انرژی مایکروویو منجر به تغییر در ساختار ثانویه و سوم پروتئین‌ها می‌شود (Chian *et al*., 2019). نکته مهم این است که محققان نشان داده‌اند که تابش امواج مایکروویو می‌تواند پیوندهای غیرکووالانسی مولکول‌ها مانند پیوندهای دی‌سولفیدی و پیوندهای هیدروژنی را بشکند که منجر به‌باز شدن ساختارهای پروتئینی می‌شود (Banik *et*

al., 2003). قارچ به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین موادغذایی با ارزش‌غذایی در نظر گرفته می‌شود، و ارزش‌غذایی آن‌ها قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می‌باشد (Janakat *et al*., 2004). قارچ منبع مناسبی از اسیدهای‌آمینه ضروری متعدد، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، موادمعدنی وغیره است به‌همین دلیل مصـرف آن رو به افزایش است. باتوجه به ویژگی‌های مذکور، قارچ می‌تواند به‌عنوان منبع مناسبی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زا در صنایع‌غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد (Oboh *et al*., 2009). Kimatu و همکاران (2017) به‌بررسی پروتئین هیدرولیزشده و پپتیدهای حاصل از قارچ‌خوراکی *Agaricus bisporus* پرداختند. هیدرولیز با استفاده از آلکالاز، پانکراتین، فلاورزیم، آلکالاز – پانکراتین و آلکالاز–فلاورزیم صورت گرفت. پروتئین‌های هیدرولیزشده با روش فراپالایش به فراکسیون‌های با وزن مولکولی مختلف <۱، ۱–۳، ۳–۵ و ۵–۱۰ کیلودالتون تفکیک شدند. EC_{50} هیدرولیزهای حاصل در فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در۵ روز اینکوبه کردن مشابه یکدیگر بود در صورتی که ممانعت از اکسیداسیون اسیدلینولئیک برای هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز–فلاورزیم بیشترین میزان (۶۶/۴۹) بود. فراکسیون‌های مختلف در آزمون FRAP فعالیت وابسته به غلظت نشان دادند و بالاترین فعالیت مربوط به فراکسیون‌های حاصل از پانکراتین و آلکالاز با وزن‌مولکولی ۱–۳ کیلودالتون به‌ثبت رسید.Farzaneh و همکاران (2018)، در پژوهشی بر روی قارچ *Agaricus bisporus* و *Terfezia claveryi* از آنزیم‌های‌گوارشی (پپسین– آلفاکیموتریپسین– تریپسین) جهت هیدرولیز پروتئین قارچ استفاده نمودند. درجه‌هیدرولیز، نوع‌آنزیم و قارچ و همچنین تاثیر پیش‌تیمار آنزیم‌بری (بلانچینگ) بر روی پپتیدهای تولیدی بررسی‌شد. نتایج نشان داد که برخی پپتیدهای تولیدی از هر دو نوع قارچ نسبت به پروتئین‌های اولیه فعالیت ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند. تاکنون تحقیقی بر روی تاثیر توام نوع پیش تیمار و آنزیم هیدرولیز کننده بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی صورت نگرفته است. بنابراین هدف از این پژوهش مقایسه اثر چهار آنزیم آلکالاز، تریپسین، پپسین، پانکراتین، بدون پیش‌تیمار و با پیش‌تیمار بهینه مایکروویو و فراصوت در شرایط اپتیمم بر قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین قارچ‌دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به‌روش سطح پاسخ برای دستیابی به بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل، قدرت احیاءکنندگی یون‌آهن، قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH است.

مواد و روش‌ها

- مواد

تریپسین، آلکالاز، پپسین، پانکراتین، DPPH، پتاسیم فری‌سیانید، فریک‌کلراید، تری‌کلرواستیک‌اسید، آسکوربیک‌اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ‌خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی تهیه شدند.

- آماده‌سازی قارچ‌خوراکی

قارچ‌های خریداری شده ابتدا شسته و قطعه قطعه، سپس توسط آب داغ آنزیم‌بری (فرو بردن در آب جوش به مدت ۳ دقیقه و سپس فرو بردن در آب یخ) شدند. سپس در دمای ۸۰ درجه‌سانتی‌گراد در آون تا زمانی که رطوبت آن‌ها به زیر ۱۰ درصد برسد، خشک شدند. در نهایت قارچ‌های خشک شده به کمک آسیاب آزمایشگاهی تبدیل به پودر شدند و پس از عبور از الک با مش ۸۰ در کیسه‌های پلی‌پروپیلنی بسته‌بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (He *et al*., 2012).

- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC انجام شد. برای تعیین میزان پروتئین‌کل در مواد خام اولیه، از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابرترم، FX118-30) استفاده شد و میزان رطوبت با قرار دادن در آون ۱۰۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد (Horwitz *et al*., 1970).

- تولید پروتئین هیدرولیز شده

جهت انجام هیدرولیز از روش Paisansak و همکاران (2020)، با کمی تغییرات استفاده شد. ۵۰ گرم پودر قارچ در بالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر مناسب جهت

فعالیت هر آنزیم (آلکالاز pH=8، تریپسین pH=8، پپسین pH=2، پانکراتین pH=8) مخلوط گردید. سپس به‌منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان هیدرولیز اپتیمم جهت رسیدن به حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (برمبنای نتایج آزمون‌های اولیه) با نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ درصد و در دمای اپتیمم هر آنزیم (آلکالاز دمای ۴۰درجه‌سانتی‌گراد، پپسین در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، تریپسین در دمای۳۷ درجه‌سانتی‌گراد، پانکراتین در دمای ۳۷ درجه‌سانتی‌گراد) با و بدون پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت (مایکروویو MODEL NO: GMO1894-20LN و پروب فراصوت، فرکانس ۲۴ کیلو هرتز، مدل UP 200H Ultraschallprozessor) قبل از افزودن آنزیم انجام گرفت. جهت تعیین شرایط مناسب پیش تیمارهای مورد استفاده ابتدا آزمون‌های اولیه به شرح ذیل انجام گرفت. جهت پیش‌تیمار مایکروویو از توان‌های ۲۸۰W، ۲۰۰، ۱۲۰ به‌ترتیب (به‌مدت ۳۸، ۵۴ و ۹۰ ثانیه) و جهت پیش‌تیمار فراصوت از توان۸۰ و ۱۶۰وات (به‌مدت۵ دقیقه) و سپس هیدرولیز در زمان‌های مختلف ۲۱۰-۳۰ دقیقه استفاده شد و در نهایت تیمارهای با بالاترین قابلیت آنتی‌اکسیدانی جهت هر روش انتخاب گردیدند که عبارت بودند از پیش‌تیمار مایکروویو باتوان ۱۲۰W و سپس هیدرولیز در زمان ۹۰ دقیقه و پیش‌تیمار فراصوت با توان ۱۶۰وات سپس هیدرولیز در زمان ۶۰ دقیقه. دراین پژوهش هیدرولیز با چهار نوع آنزیم مختلف در بهترین شرایط پیش تیمار انتخابی صورت گرفت تا بهترین ترکیب پیش‌تیمار و آنزیم هیدرولیزکننده به دست آید. همچنین بر اساس آزمون‌های اولیه برای نمونه‌های بدون پیش‌تیمار زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به‌عنوان زمان اپتیمم هیدرولیز جهت هرآنزیم انتخاب گردید. پس از اتمام زمان هیدرولیز به‌منظور غیرفعال‌کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه‌سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. هرتیمار به‌طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل با خشک‌کن انجمادی برای به‌دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیزشده خشک گردید. سپس پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد قابلیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف توسط روش‌های فعالیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، شلاته کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اندازه‌گیری گردید.

- آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH: ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب‌مقطر (۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) حل شدند. سپس، ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانول (۰/۱۵ میکرومول)DPPH مخلوط و به‌مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰rpm به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد(Chi *et al.*, 2015). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید:

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

Ablank جذب نمونه کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می‌شود) و Asample جذب نمونه می‌باشد.

قدرت احیاکنندگی آهن: ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب‌مقطر (۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) حل شدند. سپس ۱میلی‌لیتر از هر نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر از بافرفسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید و در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی‌لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی‌لیتر فریک کلراید ۰/۱ درصد (حجمی/وزنی) مخلوط گردید. در نهایت جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر پس از ۱۰ دقیقه نگهداری در دمای محیط خوانده شد. حجم یکسانی از آب‌مقطر به جای نمونه برای تهیه‌ی نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهندهٔ افزایش قدرت احیاکنندگی است (Bougatef *et al.*, 2009).

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر از نمونه حل شده در آب‌مقطر (۴۰ میلی‌گرم برمیلی‌لیتر) با ۱ میلی‌لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات‌سدیم ۲۸ میلی‌مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی‌مولار) در لوله اپندورف ریخته و به‌مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب‌مقطر دوبار تقطیر به‌عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (Dasgupta and De, 2007). باتوجه به بالابودن میزان جذب درغلظت مورداستفاده، نمونه نسبت ۵۰ به ۵۰ رقیق شد و آزمون مجددا تکرار شد.

- **فعالیت شلاته‌کنندگی یون‌آهن**

ابتدا، ۱ml نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت (mg/ml) ۴۰ با ۰/۰۵ ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ ml محلول فروزین (۵ mM) افزوده و مخلوط به‌شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲nm خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد (Jamdar *et al.*, 2010). فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد:

فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

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

Ablank جذب نمونه کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول مخلوط می‌شود) و Asample جذب نمونه می‌باشد.

- **تجزیه و تحلیل آماری**

در این پژوهش اثر آنزیم‌های مختلف (آلکالاز، پپسین، تریپسین و پانکراتین) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی قارچ خوراکی با و بدون پیش‌تیمار مایکروویو و فراصوت با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار 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 نرم‌افزار Excel 2013 انجام گرفت.

یافته‌ها

- **ترکیب شیمیایی**

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودرقارچ

Table 1- Chemical composition of mushroom powder

Chemical Composition	Amount
Protein (N× 6.25)	26.6 ± 0.17
Fat	3.8 ± 0.15
Moisture	6.02 ± 0.52
Ash	7.66 ± 0.12
Carbohydrate (by Difference)	55.92 ± 0.15

اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

Data reported as dry basis

*میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

Mean ± three replications

- **تاثیر نوع آنزیم و پیش‌تیمار بر روی قابلیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH**

در شکل ۱ قابلیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰ وات و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت توان ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز، پانکراتین، تریپسین، پپسین) و تحت شرایط اپتیمم هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل ۱ دو عامل بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH موثر هستند که شامل نوع آنزیم و روش پیش‌تیمار می‌باشند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، در بین کلیه نمونه‌ها، نمونه هیدرولیز شده حاصل از آنزیم پپسین و پیش تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر تیمارها عملکرد بهتری داشته به‌طوری‌که میزان فعالیت مهار رادیکال آزادDPPH آن به‌میزان ۸۰/۵۷ درصد بود. در مورد آنزیم پپسین نمونه‌های تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر تیمارها عملکرد بهتری داشت و میزان مهار آن به‌میزان ۷۵/۳۵ درصد بود. در نمونه‌های بدون پیش‌تیمار آنزیم پپسین نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و مهار رادیکال آزادDPPH در آن ۵۷/۰۱ درصد بود. نوع آنزیم فاکتور بسیار مهم و تاثیرگذاری در خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها بود.

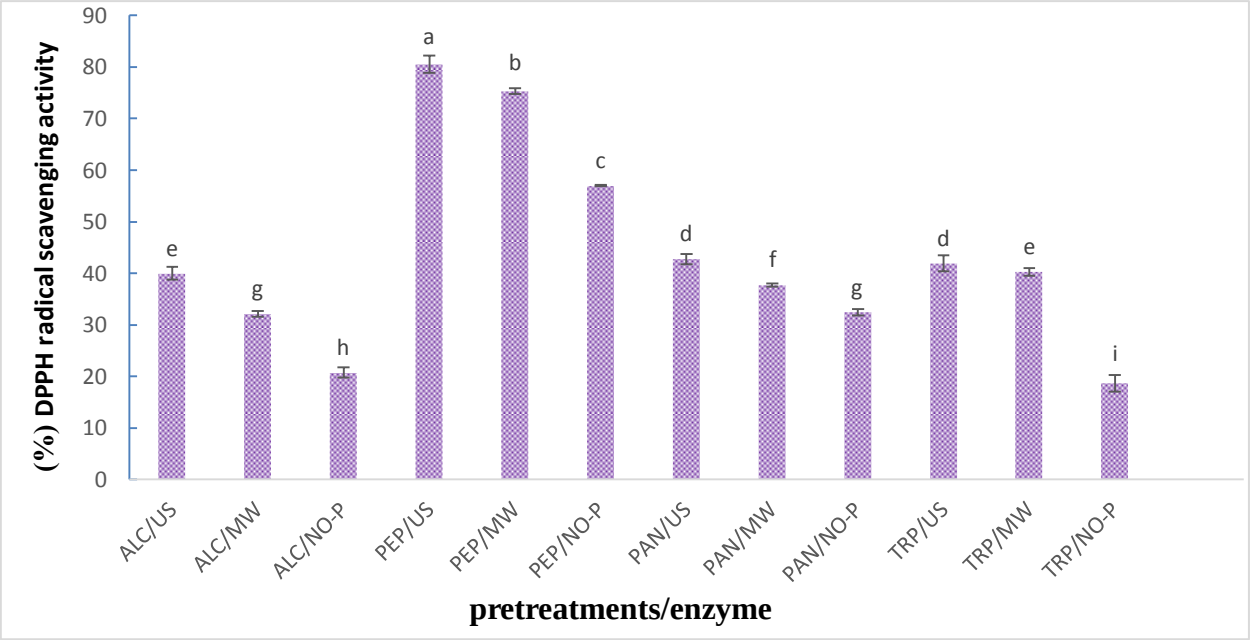

Figure 1- DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed samples without pretreatment (NO_P), hydrolyzed with 120W microwave pretreatment, hydrolyzed with 160W ultrasound pretreatment, under the influence of enzymes type (alcalase (ALC), pancreatin (PAN), trypsin (TRP), pepsin (PEP)) under optimal enzymatic hydrolysis conditions.
All data are mean± SD of three replications
Similar letters in columns indicate the absence of statistically significant differences between treatments ($p<0.05$).

شکل ۱- قابلیت مهار رادیکال‌آزادDPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار(PNO_)، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو(MW) توان ۱۲۰ وات و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت (US) توان ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز(ALC)، پانکراتین(PAN)، تریپسین(TRP)، پپسین(PEP)) در شرایط اپتیمم هیدرولیز آنزیمی.
کلیه داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار سه تکرارمی‌باشند.
حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آماری بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

- تاثیر نوع آنزیم و پیش‌تیمار بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

در شکل ۲ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰W و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز، پانکراتین، تریپسین، پپسین) در شرایط اپتیمم هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل۲ نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، آنزیم پپسین در نمونه‌های هیدرولیز شده و پیش تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری از نظر میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل با میزان ۱/۶۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) نشان داد. همچنین آنزیم پانکراتین در نمونه‌های تیمارشده با مایکروویو نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل در آن به‌میزان ۱/۳۶ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. در نمونه‌های بدون پیش‌تیمار آنزیم پانکراتین نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل آن به میزان ۱/۲۹ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. نتایج این بررسی نشان داد بالاترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با استفاده از آنزیم پپسین با پیش‌تیمار فراصوت به‌میزان ۱/۶۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بدست آمد.

- تاثیر نوع آنزیم و پیش‌تیمار بر روی قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن

در شکل ۳ قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰W و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت توان ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز، پانکراتین، تریپسین، پپسین) تحت شرایط اپتیمم هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل ۳ نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، در نمونه‌های هیدرولیز شده، آنزیم آلکالاز در نمونه تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر آنزیم‌ها از نظر قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن عملکرد بهتری با میزان برابر با ۱/۴۲ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) برخوردار بود (p<۰/۰۵). همچنین آنزیم آلکالاز در نمونه‌های تیمارشده با مایکروویو نسبت به سایر آنزیم‌ها از نظر قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن عملکرد بهتری داشت و میزان آن ۱/۳۹ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) بود. در نمونه‌های بدون پیش‌تیمار آنزیم آلکالاز از نظر قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و میزان آن معادل با ۱/۳۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. نتایج این بررسی نشان داد که بالاترین قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن با استفاده از آنزیم آلکالاز با پیش‌تیمار فراصوت به میزان ۱/۴۲ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) به‌دست آمد.

- تاثیر نوع آنزیم و پیش‌تیمار بر روی قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن

یون آهن (Fe^{++}) یکی از قوی‌ترین پرواکسیدان‌ها در بین یون‌های فلزی است که منجر به آغاز و سرعت بخشی به اکسیداسیون چربی با دخالت پراکسید هیدروژن در واکنش تولید گونه‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل می‌گردد (Yamauchi *et al*., 1988). به‌غیر از آهن، فلزات دیگری مانند Cu و Co می‌توانند بر سرعت اکسیداسیون لیپید موثر باشند. از این رو شلاته‌شدن یون‌های فلزی با پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها می‌تواند واکنش اکسیداسیون را به تاخیر اندازد فروزین یک کمپلکس بنفش رنگ با یون آهن (Fe^{++}) تشکیل می‌دهد (Khantaphant *et al*., 2011).

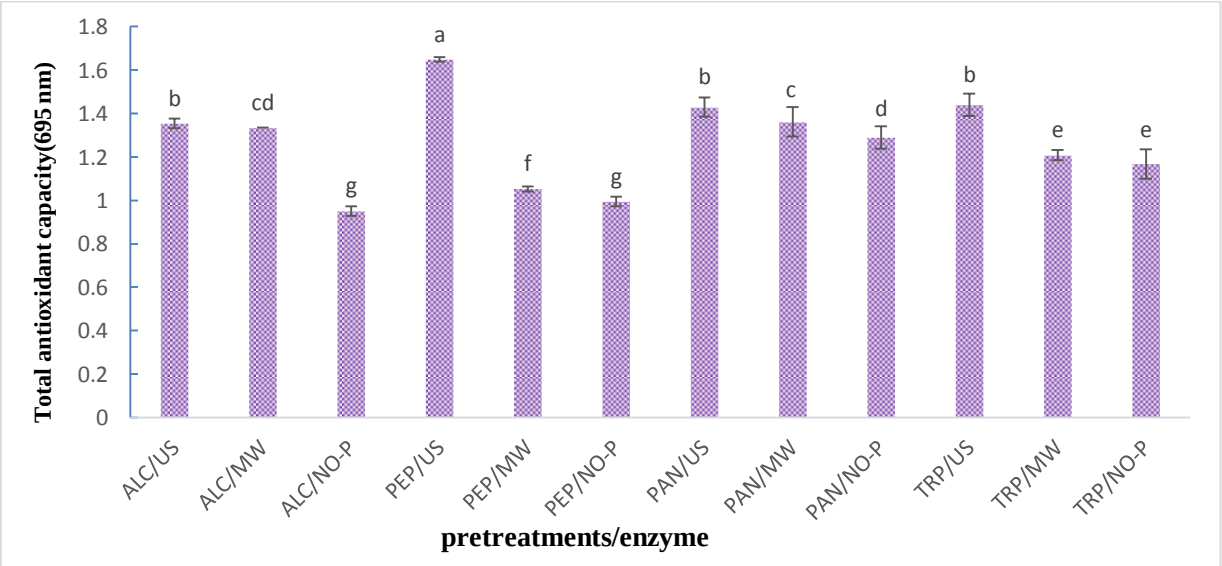

Figure 2- The total antioxidant capacity of hydrolyzed protein samples without pretreatment (NO_P), hydrolyzed protein with 120W microwave pretreatment and hydrolyzed protein with 160W ultrasound pretreatment, under the influence of the type of enzyme (alcalase (ALC), pancreatin (PAN), trypsin (TRP), pepsin (PEP)) under optimal enzymatic hydrolysis conditions

All data are mean± SD of three replications

Similar letters in columns indicate the absence of statistically significant differences between treatments (p<0.05)

شکل ۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار (NO-P)، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰W و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت توان ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز (ALC)، پانکراتین (PAN)، تریپسین (TRP)، پپسین (PEP)) در شرایط اپتیمم هیدرولیز آنزیمی

کلیه داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشند.

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آماری بین تیمارها می‌باشد (p<۰/۰۵)

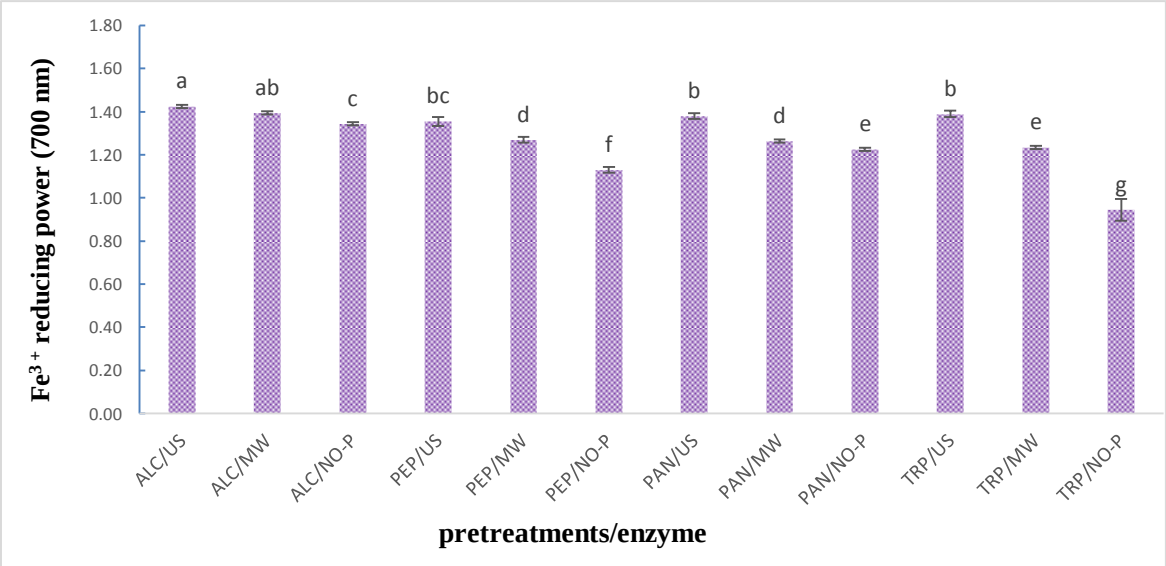

Figure 3- Fe^{3+} reducing power of hydrolyzed protein samples without pretreatment (NO_P), hydrolyzed protein with W120 microwave pretreatment and hydrolyzed protein with 160W ultrasound pretreatment, under the influence of enzyme type (alcalase (ALC), pancreatin (PAN), trypsin (TRP), pepsin (PEP)) in optimal conditions of enzymatic hydrolysis

All data are mean± SD of three replications

Similar letters in columns indicate the absence of statistically significant differences between treatments ($p<0.05$)

شکل ۳- قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار (NO - P)، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰W و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت توان ۱۶۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز (ALC)، پانکراتین (PAN)، تریپسین (TRP)، پپسین (PEP)) در شرایط اپتیمم هیدرولیز آنزیمی

کلیه داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار سه تکرارمی‌باشند.

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آماری بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

باتوجه به شکل ۴ نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد در نمونه‌های هیدرولیز شده، آنزیم تریپسین و پانکراتین در نمونه تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر آنزیم‌ها از نظر قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن عملکرد بهتری داشته و میزان آن به‌ترتیب برابر با ۶۵/۰۸٪ و ۶۴/۶۵ بود. همچنین آنزیم تریپسین در نمونه‌های تیمارشده با مایکروویو نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن آن به‌میزان ۶۲/۷۶٪ بود. در نمونه‌های بدون پیش‌تیمار آنزیم تریپسین نسبت به سایر آنزیم‌ها عملکرد بهتری داشت و قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن آن به میزان ۵۰/۴۹٪ بود.

بحث

- تاثیر پیش‌تیمار بر روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی درشرایط مختلف

نتایج این تحقیق نشان داد که در اغلب نمونه‌های هیدرولیز شده، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل، و قدرت شلاته‌کنندگی یون‌آهن در نمونه‌های پیش‌تیمار شده با فراصوت با توان ۱۶۰وات بالاتر از سایر تیمارها و بعد از آن نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو و در نهایت نمونه‌های بدون پیش‌تیمار عملکرد ضعیف‌تری داشتند. این امر حاکی از بهبود قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز هیدرولیز شده قارچ خوراکی تحت تاثیر پیش تیمارهای به کاربرده شده به خصوص فراصوت بود. درهر یک از پیش تیمارهای مورد استفاده، تاثیر آنزیم مورد استفاده برروی خاصیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی از نظر آماری معنی‌دار بود. گزارش شده است که فراصوت باعث ایجاد یک سری تغییرات شیمیایی و فیزیکی در پروتئین، مانند اثرات مکانیکی، حفرگی، اثرات گرمایی، هم‌زدن دینامیکی، تنش‌برشی و اغتشاش می‌گردد (Zhang *et al*,. 2017). این اثرات شامل شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر

ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و درنتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین‌ها می‌گردد (Ding *et al*,. 2018). حفرگی صوتی موجب بهبود کیفیت انتقال بین آنزیم و سوبسترا می‌شود در نتیجه فراصوت می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین، کاهش اندازه پپتید و افزایش دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی گردد (Li *et al*., 2018). تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش‌تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی می‌تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین‌ها باشد (Chen *et al*., 2011). فراصوت موجب کاهش زمان هیدرولیز و افزایش آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود و موجب افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. پیش‌تیمار فراصوت، اسیدآمینه‌های فعال را منتقل و در معرض قرار داده و در واکنش‌های اکسیداسیون دخالت می‌کند (Wali *et al*., 2017). پژوهشگران نشان دادند که استفاده از توان بالای فراصوت موجب تغییر آرایش ساختار پروتئین و در نتیجه بهبود فرایند هیدرولیز آنزیمی می‌گردد، همچنین نشان دادند که پیش‌تیمار فراصوت باعث افزایش نرخ هیدرولیز می‌گردد. همچنین پیش‌تیمار فراصوت موجب می‌شود که در طول هیدرولیز، بخش‌های پروتئینی با وزن مولکولی بالا به بخش‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً کوچک با ظرفیت اهدای الکترون تجزیه شوند و بنابراین می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آن‌ها را به محصولاتی با ثبات‌تر تبدیل کنند، بنابراین موجب توقف واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌گردند (Aderinola *et al*., 2019).

در زمینه تاثیر پیش تیمارفراصوت بر بهبود ویژگی آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده مطالعات مختلفی صورت گرفته است. پیش‌تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی در تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam *et al*,. 2015). به عنوان مثال، دریک

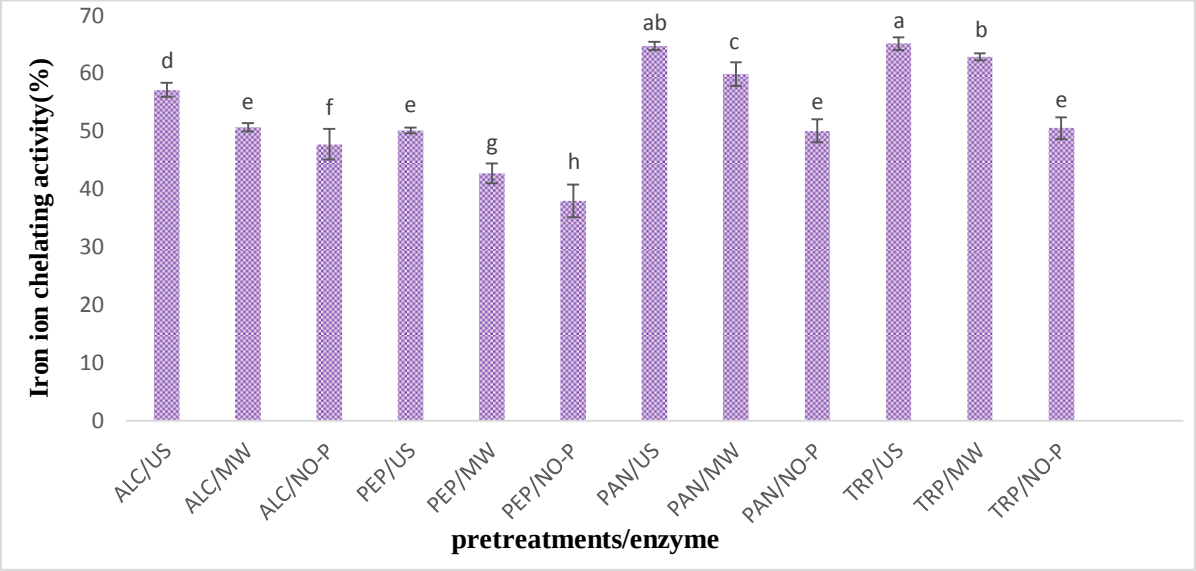

Figure 4- Iron ion chelating activity of hydrolyzed protein samples without pretreatment (NO_P), hydrolyzed protein with W120 microwave pretreatment and hydrolyzed protein with 160W ultrasound pretreatment, under the influence of enzyme type (alcalase (ALC), pancreatin (PAN), trypsin (TRP), pepsin (PEP)) in optimal conditions of enzymatic hydrolysis

All data are mean± SD of three replications

Similar letters in columns indicate the absence of statistically significant differences between treatments ($p<0.05$)

شکل ٤- قدرت شلاته کنندگی یون‌آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار (NO-P)، پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار مایکروویو توان ۱۲۰W و پروتئین هیدرولیز شده با پیش‌تیمار فراصوت توان ۱٦۰وات، تحت تاثیر نوع آنزیم (آلکالاز (ALC)، پانکراتین (PAN)، تریپسین (TRP)، پپسین (PEP)) در شرایط اپتیمم هیدرولیز آنزیمی

کلیه داده‌ها بر اساس میانگین ± انحراف معیار سه تکرارمی‌باشند.

حروف مشابه در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار از نظر آماری بین تیمارها می‌باشد ($p<۰/۰۵$)

بررسی نشان داده شد که پروتئین‌های هیدرولیز شده *Erythrina edulis* تیمار شده با فراصوت نسبت به نمونه‌های تیمارنشده دارای بالاترین فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به‌ترتیب با مقادیر IC_{50} در محدوده ۱۵۱/۱۳ تا ۱۷۳/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۴/۵۲ تا ۷۷/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند (Téllez-Morales *et al*., 2020). همچنین گزارش شد، فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیزشده گردو با تیمار فراصوت باتوان۸۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، ۱۲۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۵، ۲۰، ۲۵، و ۳۰ دقیقه)، ۱۴۰۰ وات (به‌مدت ۵، ۱۰، و ۱۵ دقیقه)، و ۱۸۰۰ وات (به‌مدت ۲۰ دقیقه) بالاتر از نمونه شاهد بود. آن‌ها گزارش کردند که این نتایج ممکن است به‌دلیل تغییرات ساختاری در فراکسیون‌های ایزوله پروتئینی گردو پس از پیش‌تیمار فراصوت باشد که باعث می‌شود فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های آن متفاوت باشد. پیش‌تیمار فراصوت با شدت بالا می‌تواند محیط اطراف گروه‌های پروتئینی را تغییر داده، در نتیجه مکان‌های آبگریز ایزوله پروتئین گردو در معرض قرار می‌گیرند؛ که درنهایت این امر موجب افزایش سطح تماس بین آنزیم و سوبسترا شده و باعث بهبود فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گردو می‌شود (Matmaroh *et al*,. 2011). در بررسی Zou و همکاران (2019)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مغزخوک تیمار شده با فراصوت نسبت به‌تیمار نشده بالاتر بود، به طوریکه مقادیر DPPH، ABTS، HRSA، $CA\ Fe^{2+}$ و قدرت احیا به‌ترتیب ۷۲، ۷۳، ۵۶، ۶۰ و ۰،۶۵ درصد بود. دلیل این امر آن است که پیش‌تیمار فراصوت باعث تشکیل پپتیدها/ اسیدهای آمینه زنجیرکوتاه با وزن مولکولی کم و پپتیدهای با خاصیت آب‌دوستی و آبگریزی بالا (Asp، Glu، Pro، Arg، His، Met، Leu، Ala، Tyr، و Val) می‌شود، که این ترکیبات دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی هستند و بنابراین باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی سیستم می‌شوند. پژوهشگران گزارش کردند که پیش‌تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلایسینین وگلایسینین به‌طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیزشده افزایش داد، که دلیل آن افزایش نسبت‌های مارپیچα و چرخش‌بتا، و کاهش در صفحه‌بتا و نسبت مارپیچ تصادفی دو بخش پروتئین پس از پیش‌تیمار فراصوت می‌باشد. علاوه بر این، هضم آلکالاز به‌کمک پیش‌تیمار فراصوت به‌دلیل تشکیل پپتیدهای زنجیرکوتاه حاوی اسیدآمینه‌های آبگریز با وزن مولکولی بین ۲۰۰- ۳۰۰۰ دالتون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده ذرت را افزایش می‌دهد (Liang et al., 2017). Zou و همکاران (2019)، گزارش کردند که پروتئین هیدرولیز شده مغزخوک تهیه شده با پیش‌تیمار فراصوت قدرت احیاءکنندگی بالاتری نسبت به نمونه‌های تیمارنشده نشان می‌دهد. آن‌ها بیان کردند که نمونه‌های تیمارشده با فراصوت دارای توانایی اهدا الکترون بالاتری می‌باشند و در نتیجه از قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار هستند. مطالعات نشان داده است که پیش‌تیمار فراصوت می‌تواند آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین بادام‌زمینی (Yu *et al*., 2012) و گلوتن گندم (Zhu *et a*l., 2011) را تسهیل کند.

پیش‌تیمار با مایکروویو نیز یک استراتژی شناخته شده برای افزایش دسترسی به پیوندهای حساس به هیدرولیز است که مکان‌های برش آنزیم و قرار گرفتن در معرض پروتئازها را تسهیل می‌کند. تصور می‌شود که امواج مایکروویو موجب باز شدن ساختار پروتئین و افزایش دسترسی آنزیم‌ها به پیوندهای پپتیدی می‌گردند که این امرمنجر به تولید هیدرولیزات با فعالیت‌های زیستی مناسب می‌شود (Ketnawa and Liceaga,. 2017). تیمار مایکروویو تحت شرایط کنترل شده باعث تخریب شبکه پیوندهای هیدروژنی، تغییر در چرخش دوقطبی مولکول‌های پروتئین و مهاجرت یون‌ها در محیط‌های آبی می‌شود (Mahroug *et al*., 2019). اثرات مایکرویو شامل شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و درنتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین‌ها می‌باشد (Ding *et al*., 2018). تاثیرکاربرد تابش مایکروویودر ترکیب با هیدرولیز آنزیمی جهت کاهش حساسیت زایی و بهبود فعالیت زیستی پپتیدها قبلا به‌اثبات رسیده است (Ketnawa and Liceaga,. 2017). مشخص شده است که این اثرات ناشی از ترکیبی از برهمکنش‌های حرارتی و غیرحرارتی با مواد آلی هستند که به‌طور معمول در طی روش‌های حرارت‌دهی مرسوم در دسترس نمی‌باشند. مطالعات مختلف اثر کاربرد تابش

مایکروویو در کاهش زمان هیدرولیز در نتیجه افزایش سرعت واکنش و افزایش بازدهی کلی محصول را به اثبات رساندند (Urbizo-Reyes *et al.*, 2019). پژوهشگران گزارش کردند که تیمار مایکروویو می‌تواند پروتئین‌های گیاهی را به مولکول‌های کوچک‌تر هیدرولیز کند و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش می‌یابد (Gao *et al.*, 2019). Zhu و همکاران (2011) گزارش دادند، قدرت احیا زئین هیدرولیزشده پس از تیمار با مایکروویو توسط پپسین به‌مدت ۱ ساعت و پانکراتین به‌مدت ۲ ساعت، افزایش یافت. Gazikalović و همکاران (2021)، گزارش کردند که بسته به‌شرایط فرآوری و پیش‌تیمار مایکروویو هیدرولیزآنزیمی می‌تواند ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی و عملکردی گلوتن را بهبود بخشد. فعالیت به‌دام اندازی رادیکال‌آزاد با روش ABTS بررسی شد و نتایج نشان داد که گلوتن هیدرولیز شده در مقایسه با پروتئین تیمارنشده دارای قابلیت مهارکنندگی بالایی هستند.Wang و همکاران (2022)، گزارش کردند، افزایش بیشتر در FRAP (ferric-reducing antioxidant power) در پروتئین باکویت تارتاری جوانه‌زده پس از تیمار مایکروویو نشان می‌دهد که تیمار با مایکروویو ممکن است، باعث گسترش ساختار مولکولی پروتئین باکویت تارتاری جوانه‌زده شده، پپتیدهای کوتاه بیشتری تشکیل داده و موجب افزایش در معرض قرارگیری گروه‌های سولفیدریل و هیدروکسیل فنولی با توانایی احیاء قوی در داخل مولکول‌ها می‌گردد در نتیجه ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل پروتئین باکویت تارتاری جوانه‌زده افزایش یافت.Gazikalović و همکاران (2021)، در مورد تاثیر هیدرولیز آنزیمی در پیش‌تیمار مایکروویو گلوتن جهت تسریع هیدرولیز آنزیمی و کاهش حساسیت‌زایی آن گزارش کردند که افزایش ابتدایی حساسیت به هیدرولیز آنزیمی در توان‌های پایین‌تر مربوط به تغییرات ساختاری مولکول‌های گلوتن در نتیجه حرارت‌دهی مایکروویو است که منجر به باز شدن کلی یا جزئی پلی‌پپتیدها درنتیجه در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی قرار گرفته در داخل ساختار می‌شود، در نتیجه این پیوندها دسترسی بیشتری برای حمله آنزیمی پیدا می‌کنند. مشخص شد که توان مایکروویو و دماهای ایجادشده توسط این پیش‌تیمار باعث ایجاد تغییر در مولکول پروتئین می‌گردند که این تغییرات با باز شدن و تجمع مولکول پروتئین در ارتباط می‌باشند.

- تاثیر نوع آنزیم بر روی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی درشرایط مختلف

براساس نتایج این پژوهش نمونه هیدرولیز شده حاصل از آنزیم پپسین و پیش تیمارشده با فراصوت نسبت به سایر تیمارها خواص آنتی‌اکسیدانی بر مبنای قابلیت مهار رادیکال‌آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی‌کل بالاتری را نشان داد، در حالی‌که قدرت‌احیاءکنندگی یون‌آهن با استفاده از آنزیم آلکالاز با پیش‌تیمار فراصوت و قدرت شلاته کنندگی یون آهن درنمونه‌های تیمار شده با آنزیم تریپسین و پانکراتین با پیش‌تیمار فراصوت بیشترین میزان را نشان دادند. درهر یک ازآنزیم‌های مورد استفاده، تاثیر پیش تیمار مورد استفاده برروی برروی خاصیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی از نظر آماری معنی‌داربود.

نوع آنزیم یکی از پارامترهای اصلی تعیین کننده فرآیند هیدرولیز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز پروتئین و پپتیدها است. برای آزاد سازی پپتیدهای مورد نظر می‌توان از اندو یا اگزو پپتیدازهای استفاده کرد. ترجیحاً اگزو پپتیدازهای به‌دلیل زمان هیدرولیز کوتاه‌تر و کنترل بهتر عملیات هیدرولیز برای بدست آوردن پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی با وزن مولکولی و ترکیب اسید آمینه مورد نیاز انتخاب می‌شوند (Ambigaipalan,and Shahidi., 2017). به طور کلی آنزیم آلکالاز یک نوع آنزیم اندوپپتیداز است که می‌تواند پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره بشکند و منجر به رها سازی الیگوپپتید و یا پلی پپتیدهای با طول زنجیره متوسط تا کوتاه و نیز پپتیدهایی حاوی اسیدهای آمینه آبگریز گردد. آنزیم آلکالاز منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (Sun *et al.*, 2011). آنزیم تریپسین باندهای پپتیدی بین آرژنین و لیزین و اسیدآمینه‌های دیگر را جدا

می‌کندو بر اساس موقعیت این اسیدهای آمینه در زنجیره‌های پروتئینی، اندازه‌های پپتیدی مختلفی ممکن است تشکیل گردد. تریپسین در جایگاه فعال خود دارای سرین و حلقه‌ی ایمیدازول است بنابراین این آنزیم باندهای پپتیدی متفاوت بین اسیدهای آمینه‌ی متفاوت را می شکنند (Khantaphant *et al*., 2011). پانکراتین مخلوطی از آنزیم‌های تریپسین، کیموتریپسین، الاستاز و کربوکسی پپتیداز 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 (Megías *et al*., 2008). در تحقیقات مختلف تاثیر نوع آنزیم هیدرولیز کننده بر قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده مورد مطالعه قرارگرفته است. به عنوان نمونه Jang و همکاران (2017)، اثر پنج پپتیداز به نام‌های آلکالاز، کولوپولین، فلوورزیم، نوتراز و پروتامکس را بر روی فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده نوعی ماهی (*Sandfish*) ارزیابی کردند. بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز تهیه شده با استفاده ازآلکالاز یافت شد. برعکس، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیزهای به‌دست آمده توسط نوتراز و پروتامکس کمترین میزان را داشتند. تفاوت در فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیزهای تهیه شده از پنج پپتیداز به‌دلیل تفاوت ترکیب اسیدهای‌آمینه در هیدرولیزها و عدم تشابه در ویژگی آنزیم‌های مورد استفاده گزارش شده است. از سوی دیگر، Je و همکاران (2017)، گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز گوشت ماهی تن تهیه شده توسط پاپائین بیشتر از هیدرولیزشده‌های به‌دست آمده با استفاده از آلکالاز، α–کیموتریپسین، نوتراز، پپسین و تریپسین بود. در مطالعه دیگردر میان پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهیچه ماهی فلاندرو با استفاده از هشت آنزیم مختلف، هیدرولیزشده‌های با α–کیموتریپسین بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت مهار رادیکال پراکسید رانشان داد و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پپسین کمترین فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل را نشان دادند (Ko *et al*., 2013). ویژگی پروتئاز بر اندازه، مقدار، ترکیب اسید آمینه آزاد و پپتیدها و توالی اسیدآمینه آن‌ها تأثیر می‌گذارد که به نوبه خود بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها تأثیر می‌گذارد. تفاوت بین پروتئین‌های هیدرولیز شده در خواص آنتی‌اکسیدانی به این دلیل است که این آنزیم‌ها دارای الگوهای جداسازی پیوند پپتیدی متفاوتی هستند. Peñta-Ramos and Xiong (2002) در تحقیقات خود از آنزیم‌های مختلف برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ایزوله‌های پروتئین سویا حرارت دیده و حرارت ندیده استفاده کردند. آن‌ها گزارش دادند که استفاده از آنزیم‌های مختلف منجر به تشکیل مخلوطی از پپتیدها با درجات مختلف هیدرولیز و بر این اساس محدوده‌های متفاوتی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود. در یک تحقیق آلکالاز و پانکراتین در تولید پپتیدهای زیست‌فعال مشتق شده از *Bunium persicum Bioss* (زیره سیاه) بدون چربی استفاده شدند. نتایج نشان داد که فعالیت مهار رادیکال DPPH با استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده آلکالاز بیشتر بود، در حالی که محصول به‌دست آمده با استفاده از پانکراتین اثر بازدارندگی بالاتری بر مهار رادیکال کاتیونی $ABTS^{+}$ داشتند (Shahi et al., 2020). در تحقیق دیگری پاپائین، تریپسین، پانکراتین، آلکالاز و فلوورزیم در هیدرولیز پروتئین کیک بذر کتان مورد ارزیابی قرار گرفتند و مشخص شد که پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌دست آمده با استفاده از آلکالاز و پانکراتین دارای بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Karamać *et al*., 2016). در تحقیق Fu و همکاران (2015) هیدرولیز با آنزیم‌های آلکالاز یا پاپائین از ژلاتین پوست ماهی سالمون (*Oncorhynchus keta*) انجام گرفت. نتایج نشان داد که هیدرولیزهای تولید شده توسط این دو پروتئاز دارای فعالیت مهاری بسیار قوی نسبت به رادیکال‌های سوپراکسید و فعالیت ضعیف نسبت به DPPH و رادیکال هیدروکسیل هستند.

در یک مطالعه پپسین، تریپسین، کیموتریپسین، آلکالاز و فلوورزیم برای هیدرولیز عصاره پروتئینی بادام وحشی (*Amygdalus scoparia*) استفاده شد. بر اساس فعالیت‌های مهار رادیکال به‌دست آمده توسط azino-– 2, 3-ethylbenzothiazoline-6- sulphonic) bis2′ acid) و فعالیت احیاکنندگی یون‌آهن هیدرولیزها، مشخص شد که هیدرولیز با آنزیم آلکالاز دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی است (Mirzapour *et al*., 2016). Shazly

و همکاران (2019) پروتئین هیدرولیز شده را با استفاده از کازئین گاومیش و گاو تیمار شده با آنزیم‌های پپسین، تریپسین، آلکالاز یا پاپائین به‌دست آوردند. نمونه‌های هیدرولیز شده آلکالازی کازئین گاومیش و پروتئین هیدرولیز شده تریپسینی کازئین گاوی بهترین خواص آنتی‌اکسیدانی را نشان دادند. در پژوهشLi و همکاران (2012)، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی ماهی کپور *(grass carp) (Ctenopharyngodon idellus)* تهیه شده با آلکالاز یا پاپائین مورد بررسی قرار گرفت. در این مورد، مشاهده شد که در همان درجه هیدرولیز، هیدرولیز پاپائین دارای فعالیت مهارکنندگی DPPH و قدرت احیاء بیشتر نسبت به هیدرولیز شده‌های آلکالاز است. در یک تحقیق پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی کپور معمولی با تیمار پپسین، تریپسین یا آلکالاز تهیه شد. پروتئین‌های هیدرولیز شده تولیدی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی را به روشی وابسته به دوز در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی مانند فعالیت مهار رادیکال DPPH، فعالیت مهار رادیکال $ABTS^{+}$، قدرت احیا کنندگی یون آهن و قدرت شلاته کنندگی یون آهن نشان دادند (van *et al*., 2015). Chaiو همکاران (2015)، نشان دادند که آلکالاز، در مقایسه با پاپائین و تریپسین، بهترین پروتئاز برای تولید هیدرولیز آنزیمی با فعالیت‌های شلاته کنندگی یون آهن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی از پروتئین‌های ماهی خال‌آبی *(blue-spotted)* است. در مقاله دیگری، ژلاتین استخراج شده از پوست تیلاپیا نیل به طور مستقل توسط چندین پروتئاز هیدرولیز شد، در میان محصولات به‌دست‌آمده، هیدرولیز آنزیمی فلوورزیم دارای فعالیت قوی در مهار رادیکال ABTS بود و همچنین اکسیداسیون اسید لینولئیک را در سطح بالایی مهار می‌کرد، در حالی که هیدرولیز آلکالاز بیشترین قدرت احیا را نشان داد و هیدرولیز بروملین بالاترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن را داشت (Choonpicharn *et al*., 2015). Liuet و همکاران (2015) از آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلوورزیم با نسبت آنزیم/سوبسترا با غلظت ۱۳٫۵٪ برای هیدرولیز آرد گلوتن ذرت پیش‌تیمار شده استفاده کردند و گزارش نمودند که هیدرولیزهای به‌دست آمده در همه موارد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی را هم در شرایط آزمایشگاهی و هم در داخل بدن نشان می دهند.

به‌طورکلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده به منبع پروتئین، نوع پروتئاز، شرایط هیدرولیز بستگی دارد (Klompong *et al*., 2007; Mine *et al*., 2010). تغییر در نوع آنزیم، منبع پروتئین، شرایط آماده سازی نمونه و نوع پیش تیمار در فرآیند تولید پپتیدها بر روی نوع پپتید تولیدی و ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها موثر است (Mine *et al*., 2010).

نتیجه‌گیری

امروزه با توجه بـه‌خاصـیت آنتـی‌اکسـیدان‌هـای طبیعی در جلوگیری از عمل رادیکال‌های آزاد، کاربرد آن‌ها در پزشکی و صنایع‌غذایی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیـت آنتـی‌اکسـیدانی پپتیـدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی مختلف شده است. نتایج این پژوهش نشان داد که، بهترین پیش‌تیمار جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ خوراکی با بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی فراصوت و سپس تیمار مایکروویو می‌باشد. استفاده از پیش تیمار فراصوت و سپس پیش تیمار مایکروویو کارایی بالایی را در بهبود ویژگی آنتی اکسیدانی نمونه‌های هیدرولیز شده نسبت به نمونه‌های بدون پیش‌تیمار در زمان کوتاه‌تر هیدرولیز نشان دادند. با توجه به نتایج مشخص شد که نوع آنزیم نیز تاثیر زیادی در قابلیت آنتی اکسیدانی محصول نهایی دارد، بنابراین جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده باکارآیی آنتی اکسیدانی بالا بایستی از ترکیب مناسب آنزیم و پیش تیمار استفاده نمود. با توجه به ساختار پروتئینی متفاوت در سوبستراهای پروتئینی نظیر قارچ خوراکی و تاثیرمتفاوت پیش‌تیمارهای مورد استفاده برروی این ساختارها وهمچنین عملکرد متفاوت آنزیم‌های هیدرولیز کننده ضروری است که تاثیر ترکیب این دو عامل جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا مد نظر قرار گیرد.

منابع

Aderinola, T. A., Fagbemi, T. N., Enujiugha, V. N., Alashi, A. M. & Aluko, R.E. (2019). In vitro antihypertensive and antioxidative properties of alcalase-derived Moringa oleifera seed globulin hydrolysate and its membrane fractions. Journal of Food Processing and Preservation, 43(2), p.e13862.

Ambigaipalan, P. & Shahidi, F. (2017). Bioactive peptides from shrimp shell processing

discards: Antioxidant and biological activities. Journal of Functional Foods, 34, 7-17.

Banik, S. B. A., Bandyopadhyay, S. & Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwave—a brief review. Bioresource Technology, 87(2), 155-159.

Beermann, C., Euler, M., Herzberg, J. & Stahl, B. (2009). Anti-oxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. European Food Research and Technology, 229 (4), 637-644.

Bhat, Z. F., Kumar, S. & Bhat, H. F. (2015). Bioactive peptides of animal origin: a review. Journal of Food Science and Technology, 52(9), 5377-5392.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. & 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), 1198-1205.

Chai, T.T., Tong, S.R., Law, Y.C., Ismail, N.I.N., Manan, F.A. & Wong, F.C. (2015). Anti-oxidative, metal chelating and radical scavenging effects of protein hydrolysates from blue-spotted stingray. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14(8), 1349-1355.

Chandrapala, J., Oliver, C., Kentish, S. & Ashokkumar, M. (2012). Ultrasonics in food processing. Ultrasonics Sonochemistry, 19(5), 975-983.

Chen, L., Chen, J., Ren, J. & Zhao, M. (2011). Effects of ultrasound pretreatment on the enzymatic hydrolysis of soy protein isolates and on the emulsifying properties of hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(6), 2600-2609.

Chi, C.F., Hu, F.Y., Wang, B., Li, T. & 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.

Chian, F.M., Kaur, L., Oey, I., Astruc, T., Hodgkinson, S. & Boland, M. (2019). Effect of Pulsed Electric Fields (PEF) on the ultrastructure and in vitro protein digestibility of bovine longissimus thoracis. LWT-Food Science and Technology, 103, 253-259.

Choonpicharn, S., Jaturasitha, S., Rakariyatham, N., Suree, N. & Niamsup, H. (2015). Antioxidant and antihypertensive activity of gelatin hydrolysate from Nile tilapia skin. Journal of Food Science and Technology, 52(5), 3134-3139.

Dasgupta, N. & De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. Food Chemistry, 101(2), 471-474.

Ding, Q., Zhang, T., Niu, S., Cao, F., Wu-Chen, R.A., Luo, L. & Ma, H. (2018). Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. Ultrasonics Sonochemistry, 42, 704-713.

Farzaneh, P., Khanahamadi, M., Ehsani, M. R. & Sharifan, A. (2018). Bioactive properties of Agaricus bisporus and Terfezia claveryi proteins hydrolyzed by gastrointestinal proteases. LWT-Food Science and Technology, 91, 322-329.

Fu, Y. & Zhao, X.H. (2015). Utilization of chum salmon (Oncorhynchus keta) skin gelatin hydrolysates to attenuate hydrogen peroxide-induced oxidative injury in rat hepatocyte BRL cell model. Journal of Aquatic Food Product Technology, 24(7), 648-660.

Gao, C., Wang, F., Yuan, L., Liu, J., Sun, D. & Li, X. (2019). Physicochemical property, antioxidant activity, and cytoprotective effect of the germinated soybean proteins. Food Science & Nutrition, 7(1), 120-131.

Gao, D., Cao, Y. & Li, H. (2010). Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(11), 1855-1860.

Gazikalović, I., Mijalković, J., Šekuljica, N., Jakovetić Tanasković, S., Đukić Vuković, A., Mojović, L. & Knežević-Jugović, Z. (2021). Synergistic Effect of Enzyme Hydrolysis and Microwave Reactor Pretreatment as an Efficient Procedure for Gluten Content Reduction. Foods, 10(9), p.2214.

He, J.Z., Ru, Q.M., Dong, D.D. & Sun, P.L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. Molecules, 17(4), 4373-4387.

Horwitz, W., Chichilo, P. & Reynolds, H. (1970). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.

Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. & 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), 178-184.

Janakat, S., Al-Fakhiri, S. & 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), 810-813.

Jang, H.L., Shin, S.R. & Yoon, K.Y. (2017). Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (Arctoscopus japonicus). Food Science and Biotechnology, 26(5), 1191-1197.

Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G. & Kim, S.K. (2017). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42(5), 840-846.

Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. Food Chemistry, 119(1), 336-342.

Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C. & O'Donnell, C.P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. Trends in Food Science & Technology, 46(1), 60-67.

Karamać, M., Kosińska-Cagnazzo, A. & Kulczyk, A. (2016). Use of different proteases to obtain flaxseed protein hydrolysates with antioxidant activity. International Journal of Molecular Sciences, 17(7), p.1027.

Ketnawa, S. & Liceaga, A.M. (2017). Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates. Food and Bioprocess Technology, 10(3), 582-591.

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 (Lutjanus vitta). LWT-Food Science and Technology, 44(4), 1139-1148.

Kimatu, B.M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F. & Hu, Q. (2017). Antioxidant potential of edible mushroom (Agaricus bisporus) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. Food Chemistry, 230, 58-67.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. & Shahidi, F. (2007). Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry, 102, 1317-1327.

Ko, J.Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. & Jeon, Y.J. (2013). Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (Paralichthys olivaceus) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology, 52, 113-120.

Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. International Dairy Journal, 16(9), 945-960.

Li, X., Da, S., Li, C., Xue, F. & Zang, T. (2018). Effects of high-intensity ultrasound pretreatment with different levels of power output on the antioxidant properties of alcalase hydrolyzates from Quinoa (Chenopodium quinoa Willd.) protein isolate. Cereal Chemistry, 95(4), 518-526.

Li, X., Luo, Y., Shen, H. & You, J. (2012). Antioxidant activities and functional properties of grass carp (Ctenopharyngodon idellus) protein hydrolysates. Journal of the Science of Food and Agriculture, 92(2), 292-298.

Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K. & Oladejo, A.O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. Journal of Food Quality, Volume 2017, Article ID 2784146.

Liu, X., Zheng, X., Song, Z., Liu, X., kumar Kopparapu, N., Wang, X. & Zheng, Y. (2015). Preparation of enzymatic pretreated corn gluten meal hydrolysate and in vivo evaluation of its antioxidant activity. Journal of Functional Foods, 18, 1147-1157.

Mahroug, H., Ribeiro, M., Rhazi, L., Bentallah, L., Zidoune, M.N., Nunes, F.M. & Igrejas, G. (2019). How microwave treatment of gluten affects its toxicity for celiac patients? A study on the effect of microwaves on the structure, conformation, functionality and immunogenicity of gluten. Food Chemistry, 297, p.124986.

Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A. B. & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (Parupeneus heptacanthus). Food Chemistry, 129(3), 1179-1186.

Megías, C., Pedroche, J., Yust, M. M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F. & Vioque, J. (2008). Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. LWT-Food Science and Technology, 41(10), 1973-1977.

Mine, Y., Li-Chan, E. & Jiang, B. (2010). Bioactive proteins and peptides as functional foods and nutraceuticals. (pp. 1-40). USA: John Wiley & Sons Publication, Inc. and IFT Press.

Mirzapour, M., Rezaei, K., Sentandreu, M.A. & Moosavi-Movahedi, A.A. (2016). In vitro antioxidant activities of hydrolysates obtained from Iranian wild almond (A mygdalus scoparia) protein by several enzymes. International Journal of Food Science & Technology, 51(3), 609-616. [In Persian]

Nimalaratne, C., Bandara, N. & Wu, J. (2015). Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. Food Chemistry, 188, 467-472.

Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M. & Sadeghi, M. (2017). The optimization of the production of anti-oxidative peptides from enzymatic hydrolysis of Pumpkin seed protein. Iranian Food Science and Technology Research Journal, 13(1), 14-26 [In Persian].

Oboh, G. & 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).

Paisansak, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, O., Choowongkomon, K., & Karnchanata, A. (2020). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptide derived from the shiitake mushroom (Lentinula edodes). Journal Food Science and Technology, 58(1), 85–97.

Pan, A.D., Zeng, H.Y., Alain, G.B.F.C. & Feng, B. (2016). Heat-pretreatment and enzymolysis behavior of the lotus seed protein. Food Chemistry, 201, 230-236.

Parker, T.D., Adams, D.A., Zhou, K., Harris, M. & Yu, L. (2003). Fatty acid composition and oxidative stability of cold-pressed edible seed oils. Journal of Food Science, 68(4), 1240-1243.

Peñta-Ramos, E.A. & Xiong, Y.L., (2002). Antioxidant activity of soy protein hydrolysates in a liposomal system. Journal of Food Science, 67(8), 2952-2956.

Qu, W., Ma, H., Liu, B., He, R., Pan, Z. & Abano, E.E. (2013). Enzymolysis reaction kinetics and thermodynamics of defatted wheat germ protein with ultrasonic pretreatment. Ultrasonics Sonochemistry, 20(6), 1408-1413.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. & 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), 562-569.

Saha, M., Eskicioglu, C. & Marin, J. (2011). Microwave, ultrasonic and chemo-mechanical pretreatments for enhancing methane potential of pulp mill wastewater treatment sludge. Bioresource Technology, 102(17), 7815-7826.

Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S.Z. & Najafian, L. (2020). Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. Heliyon, 6(2), p.e03365.

Shazly, A. B., Mu, H., Liu, Z., Abd El-Aziz, M., Zeng, M., Qin, F., Zhang, S., He, Z. & Chen, J. (2019). Release of antioxidant peptides from buffalo and bovine caseins: Influence of proteases on antioxidant capacities. Food Chemistry, 274, 261-267.

Sun, Q., Shen, H. & Leu, Y. (2011) .Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. Journal Food Science and Technology, 21, 6646-6652.

Téllez-Morales, J. A., Hernández-Santo, B. & Rodríguez-Miranda, J. (2020). Effect of ultrasound on the techno-functional properties of food components/ingredients: A review. Ultrasonics Sonochemistry, 61, 104787.

Urbizo-Reyes, U., San Martin-González, M.F., Garcia-Bravo, J., Vigil, A.L.M. & Liceaga, A.M. (2019). Physicochemical characteristics of chia seed (Salvia hispanica) protein hydrolysates produced using ultrasonication followed by microwave-assisted hydrolysis. Food Hydrocolloids, 97, p.105187.

van Wageningen-Kessels, F., Van Lint, H., Vuik, K. & Hoogendoorn, S. (2015). Genealogy of traffic flow models. EURO Journal on Transportation and Logistics, 4(4), 445-473.

Wali, A., Ma, H., Shahnawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J. & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. Journal of Chemistry, Article ID 4373859.

Walters, M.E. (2019). Effects of Ultrasonication on the Antioxidant and Anti-diabetic Properties of Hydrolyzed Oat Proteins (Doctoral dissertation, Carleton University).

Wang, B., Atungulu, G.G., Khir, R., Geng, J., Ma, H., Li, Y. & Wu, B. (2015). Ultrasonic treatment effect on enzymolysis kinetics and activities of ACE-inhibitory peptides from oat-isolated protein. Food Biophysics, 10(3), 244-252.

Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C.S., Zandile, M., Duan, Y., Ma, H. & Luo, X. (2018). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops–A review. Ultrasonics Sonochemistry, 48, 538-549.

Yamauchi, R., Tatsumi, Y., Asano, M., Kato, K. & Ueno, Y. (1988). Effect of metal salts and fructose on the autoxidation of methyl linoleate in emulsions. Agricultural and Biological Chemistry, 52(3), 849-850.

Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C. & Yang, Q. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (Arachin conarachin L.) antioxidant hydrolysate. International Journal of Molecular Sciences, 13(7), 9051-9068.

Zhang, Q. X., Wu, H., Ling, Y. F. & Lu, R. R. (2013). Isolation and identification of antioxidant peptides derived from whey protein enzymatic hydrolysate by consecutive chromatography and Q-TOF MS. Journal of Dairy Research, 80(3), 367-373.

Zhang, Y., Ma, L., Cai, L., Liu, Y. & Li, J. (2017). Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials. Ultrasonics Sonochemistry, 36, 88-94.

Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.A., Zhang, Y., Ma, H., Gao, X. & Otu, P.N.Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. LWT-Food Science and Technology, 77, 488-496.

Zhu, K.X., Su, C.Y., Guo, X.N., Peng, W. & Zhou, H.M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. International Journal of Food Science & Technology, 46(5), 1053-1059.

Zou, Y., Yang, H., Li, P.P., Zhang, M.H., Zhang, X.X., Xu, W.M. & Wang, D.Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. Poultry Science, 98(4), 1925-1933.

Effect of Type of Pretreatment and Enzyme on Antioxidant Capacity of Hydrolyzed Protein of Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*)

I. Izanloo[a], A. Sadeghi Mahoonak[b*]

[a] MSc Student of the Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

[b] Professor of the Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Received: 2 September 2022 Accepted: 3 January 2023

Abstract

Introduction: Free radicals originate from oxidation reactions decrease food quality and also promote incidence of various diseases such as cancer. In this regard, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, is of interest to many researchers.

Materials and Methods: In this research the effects of four enzymes, alcalase, trypsin, pepsin, and pancreatin, without pretreatment and with microwave and ultrasound pretreatment under optimal hydrolysis conditions on the antioxidant capacity of edible mushroom hydrolyzed protein were compared. The hydrolysis process to reach the maximum antioxidant activity with a ratio of enzyme to substrate of 1% and at the optimum temperature of each enzyme with and without microwave and ultrasound pretreatment and ultrasound pretreatment with 160W power, then hydrolysis with enzyme was was carried out for 60 minutes and for samples without pretreatment, hydrolysis time was 120 minutes for each enzyme.

Results: The results showed that the highest amount of total antioxidant capacity was 1.64 with hydrolysis by pepsin enzyme, the highest reducing power of iron ion was 2.80 with hydrolysis by alcalase enzyme. The highest iron ion chelation power of 65.08% was achieved with hydrolysis by trypsin enzyme and the highest DPPH free radical inhibition activity of 80.57% with hydrolysis by pepsin enzyme, all in the samples pre-treated with 160W ultrasound in the hydrolysis time of 60 minutes. Ultrasound pretreatment and then microwave pretreatment showed high efficiency in improving the antioxidant properties of hydrolyzed samples compared to samples without pretreatment in shorter hydrolysis time.

Conclusion: The results indicated that in order to create the desired antioxidant properties in the hydrolyzed protein obtained from edible mushrooms, a special combination of hydrolyzing enzyme and pretreatment should be used, and ultrasound pretreatment is more effective than microwave in this field. Hydrolyzed proteins produced from edible mushrooms with different combinations of enzymes and pretreatments showed good antioxidant properties and therefore can be used as a functional component in food formulations.

Keywords: *Antioxidant Properties, Edible Mushroom, Enzymatic Hydrolysis, Microwave and Ultrasound Pretreatment.*

* Corresponding Author: sadeghiaz@gau.ac.ir