

تأثیر پیش تیمار اولتراسوند بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی گلوتن هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین

محمد لطیف^۱، سید حسین حسینی قابوس^{۲*}، علیرضا صادقی ماهونک^۳

گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
مرکز تحقیقات صنایع غذایی شرق گلستان، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

چکیده

در این پژوهش بررسی تأثیر پیش تیمار اولتراسوند در شدت‌های ۴۵ و ۹۰ درصد بر خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و آنتی اکسیدانی کل) هیدرولیز شده گلوتن با استفاده از آنزیم تریپسین در بازه زمانی ۱۸۰-۳۰ دقیقه بررسی شد. در مرحله بعد تأثیر غلظت‌های متفاوت (۸۰-۲۰ mg/ml) تیمار بهینه بر خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، آنتی اکسیدانی کل و شلاته کنندگی یون آهن) بررسی و با خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین ث به عنوان یک آنتی اکسیدان سنتزی مقایسه شد. نتایج نشان داد که پیش تیمار اولتراسوند با شدت ۴۵ درصد به طور معنی داری باعث افزایش خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و آنتی اکسیدانی کل) هیدرولیز شده گلوتن در تمامی زمان‌های هیدرولیز شد. از طرف دیگر شدت بیشتر اولتراسوند تأثیر منفی بر خواص آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها داشت. در نهایت تیمار با اعمال اولتراسوند با شدت ۴۵٪ و هیدرولیز در زمان ۱۵۰ دقیقه که دارای بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بود به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. بررسی تأثیر غلظت بر خواص آنتی اکسیدانی نشان داد که بیشترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (۶۹/۱۶ درصد) و مهار رادیکال آزاد DPPH (۴۹/۷۶ درصد) در غلظت (۶۰ mg/ml) و بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۰/۹۳۷)، جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر) در غلظت (۷۰ mg/ml) به دست آمد. در نتیجه هیدرولیز شده گلوتن قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی جهت تولید مواد غذایی فراسودمند را دارد همچنین از آن به عنوان یک ترکیب زیست فعال می توان در صنایع دارویی بهره برد.

واژگان کلیدی: آنتی اکسیدان، اولتراسوند، پروتئین هیدرولیز شده، تریپسین، گلوتن.

*مسئول مکاتبات: SH.Hosseinighaboos@iau.ac.ir

گونه‌های فعال اکسیژن از جمله رادیکال‌های آنیونی سوپراکسید و هیدروکسیل می‌توانند منجر به آسیب‌های بیوشیمیایی و فیزیولوژیکی بسیاری شوند که در نتیجه بروز بیماری‌های خطرناک و کشنده‌ای مانند سرطان و بیماری‌های قلبی عروقی را در پی دارد (۱۶). ترکیبات آنتی اکسیدانی می‌توانند واکنش‌های اکسیداتیو را خنثی کرده و با کاهش غلظت رادیکال‌های آزاد وقوع اکسیداسیون چربی‌ها را به تأخیر اندازند (۴۶). ترکیبات آنتی اکسیدان سنتزی مانند BHA^۱، BHT^۲، PG^۳ و TBHQ^۴ تأثیرگذاری مناسبی دارند و ارزان قیمت هستند اما پتانسیل بیماری‌زایی آنها منجر به بروز نگرانی‌هایی در بین محققین شده است که در نتیجه در بسیاری از کشورها استفاده از این ترکیبات در صنعت مواد غذایی محدود و یا متوقف شده است (۲۶). بنابراین در سال‌های اخیر شناسایی ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی از جایگاه ویژه‌ای در بین محققین برخوردار شده است. در میان ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی پتیدیهای زیست فعال حاوی ۲۰-۲ آمینو اسید و وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون هستند و با هیدرولیز آنزیمی و یا تخمیر میکروبی پروتئین اولیه آزاد می‌شوند (۳۲). پتیدیهای آنتی اکسیدان از منابع گیاهی گوناگونی استخراج شده است از جمله زین ذرت (۲۸)، پروتئین بادام زمینی (۴۷)، پروتئین جوانه گندم (۲۰)، پروتئین سویا (۳۴)، شنبلیله (۱) و پروتئین هسته انگور (۱۴). در این میان گلوتن گندم گزینه‌ی مناسبی جهت استخراج پتیدیهای زیست فعال است. گلوتن مهم‌ترین پروتئین ذخیره‌ای گندم است (۳۷) که به دلیل عدم حلالیت در آب به راحتی می‌توان آنها را به شکل تقریباً خالص از سایر اجزاء گندم جدا نمود. گلوتن (بر حسب ماده خشک) دارای ۸۰ درصد پروتئین، ۸ درصد لیپید و مقادیری کربوهیدرات و خاکستر می‌باشد. گلوتن، عامل مهمی در منحصر به فرد بودن گندم به شمار می‌آید. امروزه از گلوتن گندم به دلیل نامحلول بودن در pH خنثی و خواص ویسکوالاستیک آن در هنگام هیدراتاسیون، برای افزایش قدرت آرد در صنایع نانوائی استفاده می‌شود (۲۳). کارایی فرایند هیدرولیز آنزیمی در بهبود خواص عملکردی و زیست‌فعالی پروتئین‌های غذایی در بسیاری از مطالعات اثبات شده است؛ با این وجود کاربرد پیش تیمارهایی که منجر به عملکرد بهتر آنزیم‌ها و تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی اکسیدانی بیشتر

^۱ butylated hydroxyanisole
^۲ butylated hydroxytoluene
^۳ propyl gallate
^۴ Tertiary butylhydroquinone

شود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. در میان پیش تیمارهای مناسب، اولتراسوند به‌عنوان یک تکنولوژی غیرحرارتی مناسب به‌طور گسترده‌ای در صنعت مواد غذایی به‌ویژه برای استخراج ترکیبات زیست فعال (۲۱)، هیدرولیز آنزیمی (۱۹) و امولسیفیکیشن (۸) مورد استفاده قرار گرفته است. امواج فراصوت به عنوان امواج با فرکانس‌هایی بیشتر از آستانه شنوایی انسان در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز تعریف می‌شوند (۲۷). این امواج به سه دسته فراصوت توانی^۱ (فرکانس ۱۶ تا ۱۰۰ کیلوهرتز)، فراصوت فرکانس بالا^۲ (فرکانس ۱۰۰ کیلوهرتز تا ۱ مگاهرتز)، فراصوت تشخیصی^۳ (۱ تا ۱۰۰ مگاهرتز) تقسیم می‌شوند (۳۳). مطالعات نشان داده است که تیمار اولتراسوند منجر به تغییراتی در ساختمان دوم و سوم پروتئین‌ها می‌شود که در نتیجه باعث باز شدن جزئی ساختار آنها و قرارگیری بهتر پروتئین‌ها در معرض آنزیم‌های پروتئازی همچون پپسین، تریپسین، آلکالاز و پانکراتین می‌شود (۴۴). مطالعات گوناگونی تاثیر پیش تیمار اولتراسوند را بر خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مورد بررسی قرار داده اند از جمله: Wen و همکاران (۲۰۱۸)، Li و همکاران (۲۰۱۸) و Ulko و همکاران (۲۰۱۵) که به ترتیب تاثیر مثبت پیش تیمار فراصوت را بر بهبود خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گیاه arrowhead، کینوا و شیر اثبات کردند (۴۱ و ۳۵ و ۲۵). بنابراین با توجه به موارد گفته شده هدف از این پژوهش بررسی تاثیر پیش تیمار اولتراسوند در شدت‌های مختلف (۹۰ و ۴۵ درصد) بر خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH^۴ و آنتی اکسیدانی کل) پروتئین هیدرولیز شده گلوتن با استفاده از آنزیم تریپسین در بازه زمانی ۱۸۰-۳۰ دقیقه بود. در مرحله بعد تاثیر غلظت‌های متفاوت (۸۰-۲۰ mg/ml) بر خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، آنتی اکسیدانی کل و شلاته کنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده بهینه بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

تریپسین، دی کلرید آهن، فروزین، آسکوربیک اسید و DPPH از شرکت سیگما و اتانول، سود، اسید کلریدریک، پتاسیم دی-هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات از شرکت مرک و گلوتن با گلوتن با ۸۷ درصد پروتئین از شرکت چیچک سنبله خریداری شدند.

۲-۲- پیش تیمار اولتراسوند

^۱ power ultrasound
^۲ High frequency ultrasound
^۳ Diagnostic ultrasound
^۴ ۲,۲-diphenyl-۱-picrylhydrazyl

ابتدا محلول ۵ درصد گلوتن در بافر فسفات ($\text{pH} = 7, 0/2 \text{ M}$) تهیه شد. محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتی گراد بمدت ۲۴ ساعت حل شد. به منظور اعمال اولتراسوند از پروب اولتراسوند (ساخت ایران، مدل UHP۴۰۰) با فرکانس ثابت ۳۰ KHz و زمان ۵ دقیقه در شدت های ۹۵ و ۴۵ درصد استفاده شد. برای جلوگیری از افزایش دما حین اعمال اولتراسوند از حمام یخ استفاده گردید (۲۵).

۳-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده ی گلوتن

ایزوله ی پروتئین گلوتن (نمونه ی بدون اعمال فراصوت، نمونه های تیمار شده با فراصوت) در غلظت ۵٪ جهت انجام هیدرولیز با تریپسین در بافر فسفات مخلوط و به طور مداوم به مدت ۳۰ دقیقه جهت هیدراسیون کامل در دمای محیط همزده شد. پس از ثابت شدن دمای انکوباتور شیکر دار به ۳۷ درجه سانتی گراد نمونه ها درون انکوباتور (ساخت ایران، مدل PIT۰۵۳RS) قرار داده شده و آنزیم تریپسین (مرک-حاصل از پانکراس گاو) به نسبت ۱٪ به محلول اضافه گردید. واکنش در محدوده ی زمانی ۱۸۰-۳۰ دقیقه انجام شد. پس از طی زمان های مورد نظر، برای غیرفعال سازی آنزیم، نمونه ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه و سپس در ظرف حاوی یخ جهت رسیدن به دمای محیط قرار داده شدند. در مرحله بعد نمونه ها با دور $8000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ سانتریفیوژ (ساخت آلمان، شرکت HETTICH) و مایع رویی آن ها جدا شد و با استفاده از دستگاه خشک-کن انجمادی (ساخت آلمان، شرکت Christ) خشک و تا زمان انجام آزمون ها در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۶).

۴-۲- ویژگی های آنتی اکسیدانی

۴-۲-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH ابتدا پروتئین هیدرولیز شده گلوتن در آب مقطر با غلظت 40 mg/ml حل - شدند. در مرحله بعد $1/5$ میلی لیتر از هر نمونه با $1/5$ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH ($0/15 \text{ mM}$) مخلوط و جهت اختلاط کامل بمدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در نهایت مخلوط حاصل در 2500 rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شدند. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (۴۲). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید:

$$I (\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100$$

(۱)

A_{blank} جذب شاهد و A_{sample} جذب نمونه می باشد.

۲-۴-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

برای ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه ها، به طور خلاصه ۰/۱ ml از نمونه حل شده در آب مقطر با غلظت ۴۰mg/ml با ۱ml از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ M، فسفات سدیم ۲۸ Mm و آمونیوم مولیبدات ۴ mM) مخلوط شده و به مدت ۹۰ min در حمام آب ۹۰°C قرار گرفته شد. پس از سرد شدن، جذب نمونه ها در ۶۹۵ nm اندازه گیری شد. جذب بیشتر نشان دهنده ی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بیشتر است (۳۰).

۲-۵-۲- بررسی تاثیر غلظت بر خصوصیات آنتی اکسیدانی تیمار بهینه پروتئین هیدرولیز شده گلوتن

برای ارزیابی تاثیر غلظت (۲۰-۸۰mg/ml) بر مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تیمار بهینه به ترتیب از روش Wu و همکاران (۴۲) و Prieto و همکاران (۳۰) که در قسمت قبل ذکر گردید استفاده شد.

۲-۵-۱- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

برای ارزیابی فعالیت شلاته کنندگی یون آهن، ابتدا ۱ml پروتئین هیدرولیز شده حل شده در آب مقطر در غلظت (۸۰mg/ml- ۲۰) با ۰/۰۵ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. در مرحله بعد ۰/۱ml محلول فروزین (۵mM) اضافه و مخلوط هم زده شد. پس از ۱۰min نگهداری مخلوط در دمای محیط جذب آن در ۵۶۲nm خوانده شد (۱۷). فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با استفاده از معادله (۲) محاسبه گردید:

$$\text{Chelating effect } (\%) = \left[\frac{A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{control}}} \right] \times 100 \quad (2)$$

A_{blank} (جذب نمونه شاهد فاقد ترکیب فعال) و A_{sample} (جذب نمونه هیدرولیز شده) هستند.

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۶ ارزیابی شد. آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای بررسی معنی‌دار بودن متغیر در سطح $p < 0.05$ انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار Excel ۲۰۱۳ نمودارها رسم گردید.

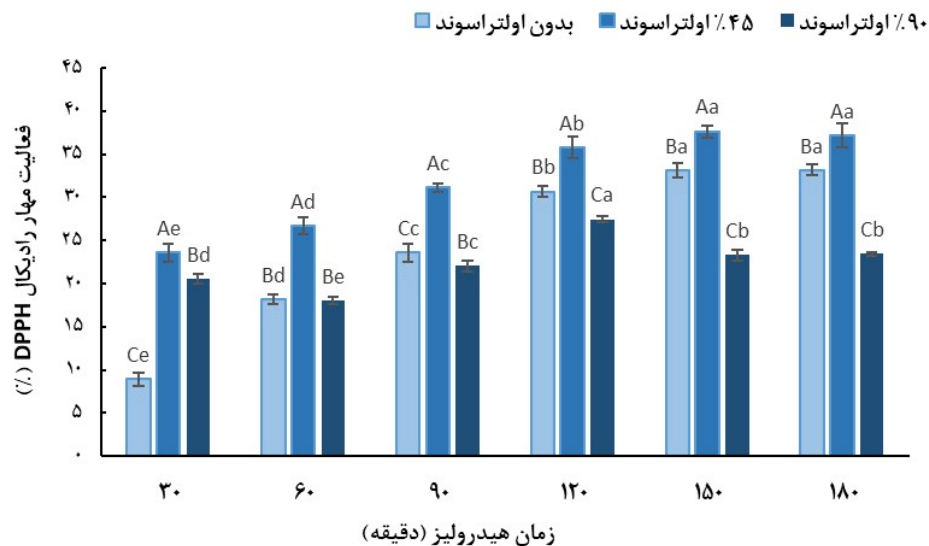
۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH، رادیکال آزاد محلول در چربی است که در ۵۱۷ نانومتر دارای بیشینه جذب است و با دریافت هیدروژن از ترکیب با خاصیت آنتی‌اکسیدانی پایدار شده و جذب آن کم می‌شود (۴۵). نتایج حاصل از ارزیابی زمان هیدرولیز نشان داد که در نمونه‌های بدون اعمال پیش تیمار فراصوت و نمونه با پیش تیمار فراصوت با شدت ۴۵ درصد، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH به ترتیب به میزان ۳۳/۱۶ و ۳۷/۶۶ درصد شد و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). از طرف دیگر در تیمار با اعمال فراصوت با شدت ۹۰ درصد افزایش زمان هیدرولیز تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH شد، هیدرولیز به میزان ۱۲۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری با نمونه هیدرولیز شده در ۹۰ دقیقه نداشت و افزایش زمان هیدرولیز بیشتر از ۱۲۰ دقیقه (هیدرولیز به مدت ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه) باعث کاهش معنی‌دار فعالیت آنتی‌اکسیدانی گلوتن هیدرولیز شده شد. پیشرفت هیدرولیز با افزایش زمان باعث تولید پپتیدهای دهنده‌ی پروتون می‌شود که قادرند با رادیکال DPPH، واکنش داده و ترکیباتی پایدار تولید کنند و منجر به خاتمه واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی شوند. تاثیر منفی افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز می‌تواند به دلیل اثر بیشتر آنزیم باشد که باعث شکسته شدن و تجزیه تعدادی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان شده که در نهایت از قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود (۳). مشابه با این نتایج Batista و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که افزایش زمان و درجه هیدرولیز باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ماهی خرچنگ سیاه^۱ شد (۱۰). آنها علت این امر را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، بیان کردند. همچنین You و همکاران (۲۰۰۹)، Li و همکاران (۲۰۰۷) و Jamdar و همکاران (۲۰۱۰)، نیز به ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های ماهی Loach، کلاژن و سویا تاثیر مثبت زمان و درجه هیدرولیز را بر مهار رادیکال DPPH گزارش کردند (۴۵ و ۲۴، ۱۷). کاوه و همکاران (۱۳۹۸) نیز با هیدرولیز پروتئین شنبلیله گزارش دادند که افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH تا حدود ۴۸ درصد شد و افزایش بیشتر زمان تاثیر معنی‌داری بر خاصیت آنتی

^۱ black scabbardfish

اکسیدانی نمونه‌ها نداشت (۱). از سوی دیگر اعمال اولتراسوند با شدت ۴۵٪ باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH نسبت به نمونه بدون پیش تیمار شد اما به جز تیمار هیدرولیز شده در زمان ۳۰ دقیقه، اعمال اولتراسوند با توان بیشتر (۹۰ درصد) تاثیر منفی در فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها داشت. بهبود فعالیت مهار رادیکال DPPH با استفاده از پیش تیمار فراصوت با توان ۴۵ درصد می‌تواند به دلیل پدیده کاویتاسیون باشد که به‌طور معنی‌داری منجر به کاهش اندازه پروتئین و تغییر در ساختار آن شده و با افزایش سطح تماس گروه‌های هیدروفوب باعث افزایش واکنش رادیکال‌های آزاد با پپتیدهای زیست فعال تولید شده می‌گردد (۳۹). از طرف دیگر تاثیر منفی توان ۹۰ درصد اولتراسوند ممکن است به دلیل تغییر در ساختار پروتئین و مدفون شدن گروه‌های هیدروفوبیک پروتئین از سطح به داخل مولکول باشد که این امر باعث کاهش برهمکنش بین پروتئاز مورد استفاده و گروه‌های هیدروفوبیک شده و در نتیجه فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش می‌یابد (۱۸). در تطابق با این یافته‌ها Wen و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که اعمال اولتراسوند با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و توان ۲۰۰ وات تاثیر مثبتی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده دانه هندوانه داشت (۴۰). همچنین Uluko و همکاران (۲۰۱۴) با اعمال پیش تیمار فراصوت با توان ۸۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز به مدت ۱۰ دقیقه بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده شیر گزارش کردند که نمونه‌های حاصل از پیش تیمار اولتراسوند به طور معنی‌داری فعالیت مهار رادیکال DPPH بیشتری نسبت به نمونه‌های شاهد (بدون اعمال اولتراسوند) داشت ($p < 0.05$) (۳۵). همچنین Wang و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی تاثیر پیش تیمار اولتراسوند بر خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سویا گزارش کردند که افزایش توان اولتراسوند باعث کاهش معنی‌دار در فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌های حاصل شد (۳۸). همچنین Zudaire و همکاران (۲۰۱۹) با بررسی تاثیر پیش تیمار اولتراسوند بر خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده Calçots گزارش کردند که اعمال بیش از حد اولتراسوند باعث کاهش توانایی هیدرولیز شده‌های حاصل در مهار رادیکال آزاد DPPH شد (۴۹).



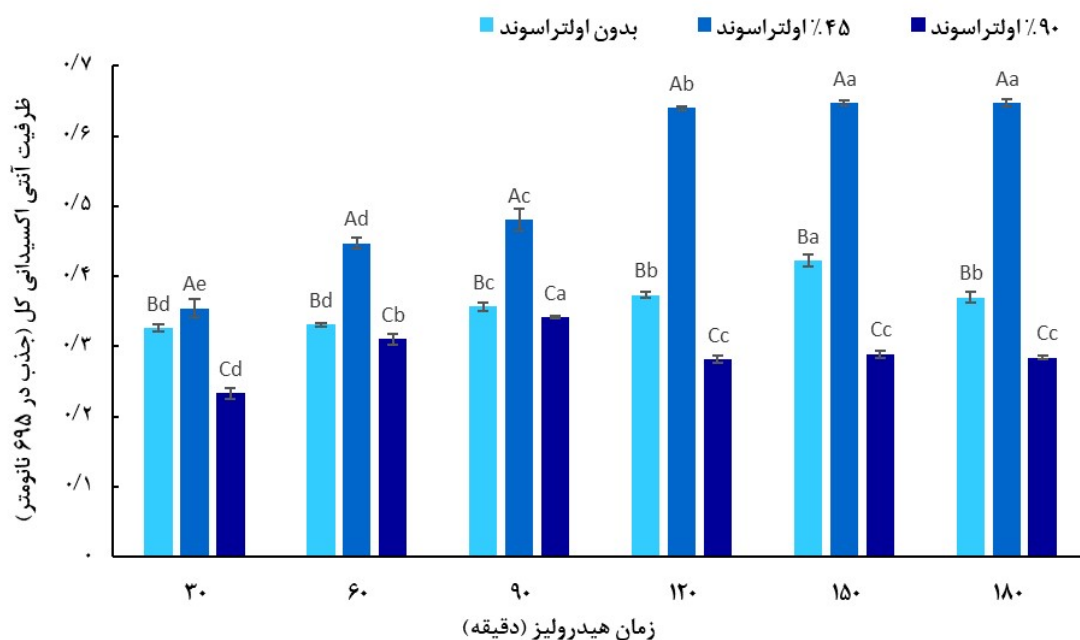
شکل ۱- تاثیر پیش تیمار فراصوت و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH گلوتن هیدرولیز شده

*حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار طی زمان‌های مختلف هیدرولیز است و حروف بزرگ نشان‌دهنده تفاوت معنی داری بین تیمارها در زمان‌های یکسان است.

۳-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

آزمون ظرفیت آنتی اکسیدانی کل روشی کمی برای ارزیابی قدرت آنتی اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی اکسیدانی کل) و بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی است و که باعث تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی می‌شود. با توجه به شکل ۲، در نمونه‌های بدون اعمال پیش تیمار فراصوت و نمونه با پیش تیمار فراصوت با شدت ۴۵ درصد، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه به ترتیب منجر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تا ۰/۴۲۲ و ۰/۶۴۷ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) شد و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز در نمونه کنترل منجر به کاهش و در نمونه با پیش تیمار تاثیر معنی داری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه‌ها نداشت ($p > 0.05$). از طرف دیگر در نمونه با پیش تیمار فراصوت با شدت ۹۰ درصد، افزایش زمان هیدرولیز تا ۹۰ دقیقه منجر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد و افزایش بیشتر زمان تاثیر منفی بر خاصیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها داشت. افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل گلوتن هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز می‌تواند به دلیل تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی باشد که باعث تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر می‌شوند که این امر باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شده است (۹). مشابه با این یافته‌ها مظلومی و همکاران (۱۳۹۸) با هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز تاثیر مثبتی بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین‌های

هیدرولیز شده داشت و بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پس از ۴/۸ ساعت هیدرولیز به دست آمد (۴). همچنین کاوه و همکاران (۱۳۹۸) به نتایج مشابهی دست یافتند و گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز پروتئین شنبلیله تا ۱۶۰ دقیقه با آنزیم پانکراتین باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل شد و افزایش بیشتر هیدرولیز تاثیر معنی داری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه‌ها نداشت (۱). از طرف دیگر تاثیر مثبت پیش تیمار اولتراسوند با شدت ۴۵ درصد بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه‌ها می‌تواند ناشی از مکانیسم عمل کاویتاسیون باشد که باعث ایجاد تنش در سوبسترای پروتئینی شده و از هم گسستن ساختار آن می‌شود در نتیجه پروتئین بهتر در معرض فعالیت آنزیم پروتئاز قرار می‌گیرد و در نهایت رهایش پپتیدهای آنتی اکسیدانی بیشتر می‌شود (۳۹). مشابه با این یافته‌ها Wen و همکاران (۲۰۱۸) و Fadimu و همکاران (۲۰۲۱) به ترتیب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گیاه Arrowhead و لوبیای Lupin را با اعمال پیش تیمار فراصوت گزارش کردند (۴۱ و ۱۵). اما از طرف دیگر کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل با افزایش توان اولتراسوند می‌تواند ناشی از تغییر در ساختار پروتئین و مدفون شدن گروه‌های هیدروفوب به درون مولکول باشد که از دسترس آنزیم خارج شده و در نتیجه بازده فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم و تولید پپتیدهایی با خاصیت آنتی اکسیدانی کم می‌شود (۱۳). در تطابق با این نتایج Wang و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی گلايسينين سويا را با افزایش بیش از حد توان اولتراسوند گزارش کردند (۳۸). همچنین Fadimu و همکاران (۲۰۲۱) نیز با بررسی تاثیر اعمال پیش تیمار اولتراسوند بر خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده لوبین گزارش کردند که اعمال بیش از حد اولتراسوند باعث کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌های تولیدی شد (۱۵).



شکل ۲- تاثیر پیش تیمار فراصوت و زمان هیدرولیز بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل گلو تن هیدرولیز شده

*حروف کوچک نشان دهنده تفاوت معنی دار طی زمان های مختلف هیدرولیز است و حروف بزرگ نشان دهنده تفاوت معنی داری بین تیمارها در زمان های یکسان است.

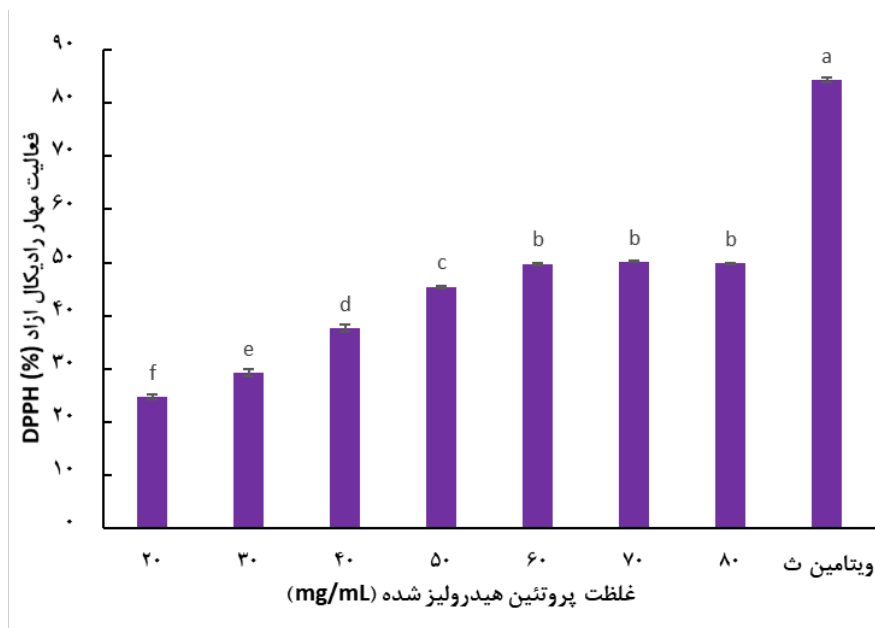
۳-۳- انتخاب تیمار بهینه

پس از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های پروتئین هیدرولیز شده ی تولیدی، تیمار با اعمال اولتراسوند با شدت ۴۵٪ و هیدرولیز در زمان ۱۵۰ دقیقه بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل را دارا بود، لذا برای بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی آن (فعالیت مهار رادیکال DPPH، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت شلاته-کندگی یون آهن) در مرحله بعد انتخاب شد.

۳-۴- بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه بهینه

۳-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

با توجه به شکل ۳، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار بهینه گلو تن هیدرولیز شده وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت از ۲۰ (mg/mL) تا ۶۰ (mg/mL) به طور معنی داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH از ۲۴/۷۴ درصد به ۴۹/۷۶ درصد شد اما افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی داری بر خاصیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده های حاصل نداشت ($p < 0.05$). با وجود فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجه هیدرولیز شده گلو تن اما در تمامی غلظت ها به طور معنی داری از فعالیت مهار رادیکال DPPH کمتری نسبت به ویتامین ث برخوردار بود ($p < 0.05$). فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیز شده گلو تن می تواند به حضور آمینواسیدهای آروماتیک ارتباط داشته باشد که گروه های هیدروکسیل آنها دارای خاصیت پروتون دهنده گی هستند، از سوی دیگر کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش زیاد از حد بهینه غلظت می تواند به دلیل اشباع شدن نقاط فعال باشد (۳۱). مشابه با این نتایج Chi و همکاران (۲۰۱۵)، Batista و همکاران (۲۰۱۰)، Umayaparvathi و همکاران (۲۰۱۴) به ترتیب فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین های هیدرولیز شده ماهی *Tegillarca granosa*، ماهی خرخنگ سیاه و صدف را وابسته به غلظت گزارش دادند (۳۶ و ۱۷، ۱۲). همچنین Zhao و همکاران (۲۰۱۲) با هیدرولیز آنزیمی پروتئین برنج با آنزیم های پروتئاز پروتامکس، تریپسین، آلکالاز، فلاورزیم و نوترناز گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های حاصل وابسته به غلظت بود و بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی مربوط به هیدرولیز شده های تولیدی با آنزیم پروتامکس بود (۴۸).



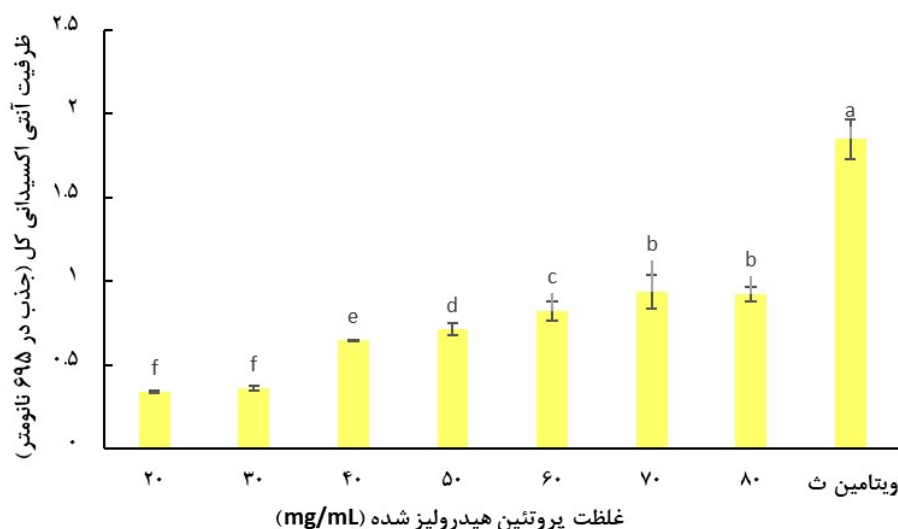
شکل ۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH گلوتن هیدرولیز شده در غلظت (mg/ml) ۲۰-۸۰ و ویتامین ث در غلظت

۸۰ (mg/ml)

۳-۴-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

همانطور که در شکل ۴ نشان داده شده است، افزایش غلظت هیدرولیز شده گلوتن تا ۷۰ (mg/ml) به طور معنی داری باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی شد ($p < 0.05$) اما افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی داری نداشت ($p > 0.05$). بیشترین و کمترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل مربوط به هیدرولیز شده با غلظت ۷۰ (mg/ml) و ۲۰ (mg/ml) به میزان ۰/۹۳۷ و ۰/۳۴۰ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. از طرف دیگر در تمامی غلظت‌ها ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده گلوتن به طور معنی داری کمتر از ویتامین ث در غلظت ۸۰ (mg/ml) بود ($p < 0.05$). قابل توجه بودن ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های گلوتن نشان می‌دهد که آنزیم تریپسین قادر به تولید هیدرولیز شده‌های با توانایی الکترون دهنده‌گی بوده که می‌توانند به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدان باعث مهار رادیکال‌های آزاد شوند (۹). مشابه با این نتایج کاوه و همکاران (۱۳۹۸) در هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله بود، آنها گزارش کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت هیدرولیز شده از ۱۰ (mg/ml) به ۴۰ (mg/ml) به طور معنی داری باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد و افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی داری نداشت؛ همچنین گزارش کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده تولیدی در تمامی غلظت‌ها کمتر از قدرت آنتی اکسیدانی کل ویتامین ث در غلظت ۵۰ (mg/ml) بود (۲). همچنین Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) ظرفیت آنتی

اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده ی نوعی کوسه (کوسه صیقلی)^۱ را وابسته به غلظت گزارش کردند و بیان کردند که ظرفیت آنتی اکسیدانی کل کمتر از آنتی اکسیدان سنتزی BHA بود (۱۱).



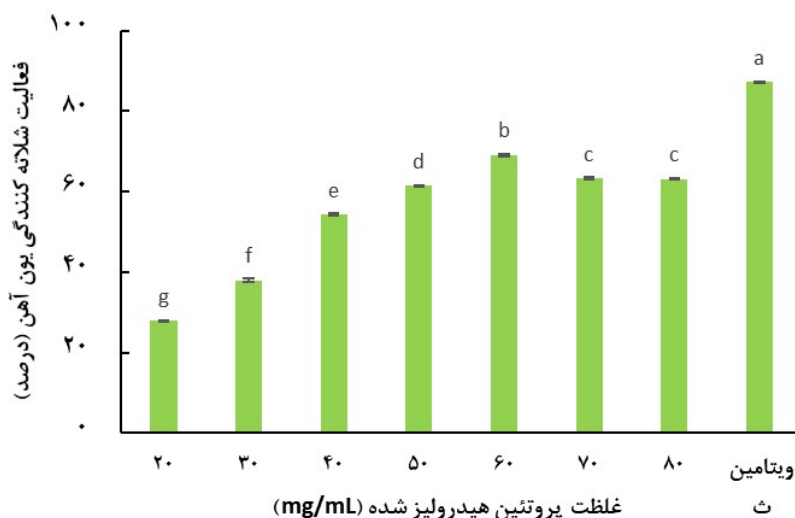
شکل ۴- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل گلوتن هیدرولیز شده در غلظت (۸۰-۲۰ mg/ml) و ویتامین ث در غلظت (۸۰ mg/ml)

۳-۴-۳- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

یون های فلزی از جمله یون Fe^{2+} ، در واکنش های اکسیداسیون به عنوان کاتالیزور نقش مهمی ایفا می کنند که باعث تولید رادیکال های هیدروکسیل از هیدروژن سوپراکسید می شوند. رادیکال های خطرناک هیدروکسیل به سرعت با دیگر مولکول های زیستی واکنش می دهند و باعث آسیب بافت ها و سلول ها می شوند (۷). بنابراین مهار یون های فلزی نقش مهمی در جلوگیری از اکسیداسیون دارد. با توجه به شکل ۵، افزایش غلظت تاثیر مثبتی بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن هیدرولیز شده های گلوتن داشت به طوریکه با افزایش غلظت از (۲۰ mg/ml) تا (۶۰ mg/ml) باعث افزایش معنی دار فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها از ۲۷/۸۵ درصد به ۶۹/۱۶ درصد شد ($p < 0.05$). از طرف دیگر افزایش بیشتر غلظت تاثیر منفی بر شلاته کنندگی نمونه ها داشت و باعث کاهش خاصیت شلاته کنندگی یون آهن هیدرولیز شده های گلوتن شد. گزارش شده است که توانایی شلاته کنندگی یون آهن پروتئین های هیدرولیز شده به نوع و ترکیب آمینواسیدی پروتئین اولیه، آنزیم مورد استفاده و درجه هیدرولیز وابسته است (۲۹). بنابراین می توان نتیجه گرفت که تریپسین مورد استفاده در این پژوهش منجر به

^۱ smooth hound

تولید پروتئین هیدرولیز شده با قابلیت به دام اندازی یون آهن شده است. مشابه با این نتایج، Klompong و همکاران (۲۰۰۷)، Xie و همکاران (۲۰۰۸) و مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶) به ترتیب تاثیر مثبت غلظت بر فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین های هیدرولیز شده ماهی خط زرد^۱، یونجه و گرده گل گزارش کردند (۴۳ و ۲۲، ۵).



شکل ۵- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن گلوتن هیدرولیز شده در غلظت (mg/ml) ۲۰-۸۰ و ویتامین ث در غلظت ۸۰ (mg/ml)

۴- نتیجه گیری

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش تیمار اولتراسوند با شدت ۴۵ درصد تاثیر مثبت و معنی داری بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده گلوتن داشت. به طور کلی ویژگی های آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی به عوامل مختلفی از جمله: نوع پیش تیمار، شرایط هیدرولیز (نوع پروتئاز، زمان هیدرولیز و درصد آنزیم)، ترکیب آمینواسیدی پروتئین اولیه و پپتیدهای تولیدی وابسته است. هیدرولیز شده ی حاصل رفتاری وابسته به غلظت را از خود نشان داد به- طوریکه با افزایش غلظت از (mg/mL) ۲۰ تا (mg/mL) ۶۰ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و با افزایش غلظت تا (mg/mL) ۷۰ فعالیت شلاته کنندگی یون آهن و آنتی اکسیدانی کل به طور معنی داری افزایش یافت. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، پیش تیمار اولتراسوند با شدت ۴۵ درصد راهکار مناسبی برای افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده های گلوتن است و

^۱ yellow stripedrevally

هیدرولیز شده‌های حاصل با توجه به خاصیت بالای آنتی اکسیدانی پتانسیل استفاده در فرمولاسیون‌های مواد غذایی برای تولید محصولات فراسودمند را دارند.

۵- منابع

۱. کاوه شیما، صادقی ماهونک علیرضا، قربانی محمد، سرابندی خشایار. مقایسه‌ی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبليله با آلکالاز و پانکراتین. *نواوری در علوم و فناوری غذایی*. ۱۳۹۸؛ ۱۱(۴): ۷۷-۸۸. doi: ۱۰.۳۰۴۹۵/JFST.۲۰۱۹.۵۴۵۹۰۷
۲. کاوه شیما، صادقی ماهونک علیرضا، قربانی محمد، جعفری سید مهدی، سرابندی خشایار. بهینه‌سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی دانه شنبليله با استفاده از روش سطح پاسخ. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۹۸؛ ۱۴(۱): ۷۷-۸۸.
۳. مشگین‌فر نسیم، صادقی ماهونک علیرضا، قربانی محمد، ضیایی فر امان محمد، کاشانی نژاد سید مهدی. بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده از محصولات جانبی صنایع گوشت به کمک روش سطح پاسخ. *پژوهش‌های صنایع غذایی*. ۱۳۹۳؛ ۲۴(۲): ۲۱۵-۲۲۵.
۴. مظلومی سیده نرگس، صادقی ماهونک علیرضا، قربانی محمد، هوشمند غلامرضا. تعیین شرایط بهینه تولید پپتیدهای ضد اکسایش حاصل از هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز. *مجله علوم و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۹۸؛ ۱۶(۸۸): ۳۴۳-۳۵۶.
۵. مقصودلو عاطفه، صادقی ماهونک علیرضا، محب‌الدینی حسین. بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گرده گل زنبور عسل. *نشریه علوم و صنایع غذایی ایران*. ۱۳۹۶؛ ۱۴(۷۳): ۲۴۰-۲۲۷.
۶. Adjonu R, Doran G, Torley P, Agboola S. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*. ۲۰۱۴ Feb ۱; ۱۲۲:۱۵-۲۷. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.jfoodeng.۲۰۱۳.۰۸.۰۳۴
۷. Afanas' ev IB, Dcrozko AI, Brodskii AV, Kostyuk VA, Potapovitch AI. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*. ۱۹۸۹ Jun ۱; ۳۸(۱۱): ۱۷۶۳-۹. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/۰۰۶-۲۹۵۲(۸۹)۹۰۴۱۰-۳
۸. Alzorqi I, Ketabchi MR, Sudheer S, Manickam S. Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*. ۲۰۱۶ Jul ۱; ۳۱:۷۱-۸۴. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.ultsonch.۲۰۱۵.۱۲.۰۰۴
۹. Arabshahi-Delouee S, Urooj A. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*. ۲۰۰۷ Jan ۱; ۱۰۲(۴): ۱۲۳۳-۴۰. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.foodchem.۲۰۰۶.۰۷.۰۱۳
۱۰. Batista I, Ramos C, Coutinho J, Bandarra NM, Nunes ML. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*. ۲۰۱۰ Jan ۱; ۴۵(۱): ۱۸-۲۴. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.procbio.۲۰۰۹.۰۷.۰۱۹
۱۱. Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*. ۲۰۰۹ Jun ۱۵; ۱۱۴(۴): ۱۱۹۸-۲۰۵. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.foodchem.۲۰۰۸.۱۰.۰۷۵
۱۲. Chi CF, Hu FY, Wang B, Li T, Ding GF. Antioxidant and anticancer peptides from the protein hydrolysate of blood clam (*Tegillarca granosa*) muscle. *Journal of Functional Foods*. ۲۰۱۵ May ۱; ۱۵:۳۰۱-۱۳. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.jff.۲۰۱۵.۰۳.۰۴۵
۱۳. Considine T, Patel HA, Anema SG, Singh H, Creamer LK. Interactions of milk proteins during heat and high hydrostatic pressure treatments—a review. *Innovative food science & emerging technologies*. ۲۰۰۷ Mar ۱; ۸(۱): ۱-۲۳. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.ifset.۲۰۰۶.۰۸.۰۰۳

14. Ding Q, Zhang T, Niu S, Cao F, Wu-Chen RA, Luo L, Ma H. Impact of ultrasound pretreatment on hydrolysate and digestion products of grape seed protein. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2018 Apr 1;42:74-83. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.027
15. Fadimu GJ, Gill H, Farahnaky A, Truong T. Investigating the impact of ultrasound pretreatment on the physicochemical, structural, and antioxidant properties of lupin protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*. 2021 Nov;14(11):2004-19. doi.org/10.1007/s11464-021-02700-4
16. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology*. 2012;2012(1):762820. doi.org/10.1155/2012/762820
17. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*. 2010 Jul 1;121(1):178-84. doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027
18. Jiang L, Wang J, Li Y, Wang Z, Liang J, Wang R, Chen Y, Ma W, Qi B, Zhang M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food research international*. 2014 Aug 1;62:590-601. doi.org/10.1016/j.foodres.2014.04.022
19. Jin J, Ma H, Wang K, Yagoub AE, Owusu J, Qu W, He R, Zhou C, Ye X. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics Sonochemistry*. 2010 May 1;17:500-6. doi.org/10.1016/j.ultsonch.2010.02.013
20. Karami Z, Peighambaroust SH, Hesari J, Akbari-Adergani B, Andreu D. Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*. 2019 Dec 1;32:100400. doi.org/10.1016/j.fbio.2019.100400
21. Kazemi M, Karim R, Mirhosseini H, Hamid AA. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food chemistry*. 2016 Sep 1;206:106-16. doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.017
22. Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative 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*. 2007 Jan 1;102(1):1317-27. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016
23. Kong X, Zhou H, Qian H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chemistry*. 2007 Jan 1;102(1):709-13. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.022
24. Li B, Chen F, Wang X, Ji B, Wu Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization–mass spectrometry. *Food chemistry*. 2007 Jan 1;102(1):130-43. doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.002
25. Li X, Da S, Li C, Xue F, Zang T. 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*. 2018 Jul;95(1):518-26. doi.org/10.1002/cche.10000
26. Li XX, Han LJ, Chen LJ. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2008 Jul;88(7):1660-6. doi.org/10.1002/jsfa.3264
27. Liu CC, Tellez-Garay AM, Castell-Perez ME. Physical and mechanical properties of peanut protein films. *LWT-Food science and technology*. 2004 Nov 1;37(7):731-8. doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.012
28. Liu P, Liao W, Qi X, Yu W, Wu J. Identification of immunomodulatory peptides from zein hydrolysates. *European Food Research and Technology*. 2020 May;246(5):931-7. doi.org/10.1007/s00137-020-03400-x

٢٩. Pihlanto A. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*. ٢٠٠٦ Nov ١;١٦(١):١٣٠-١٤. doi.org/١٠.١٠١٦/j.idairyj.٢٠٠٦.٠٦.٠٠٥
٣٠. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. ١٩٩٩ May ١;٢٦٩(٢):٣٣٧-٤١. doi.org/١٠.١٠٠٦/abio.١٩٩٩.٤٠١٩
٣١. Saito K, Jin DH, Ogawa T, Muramoto K, Hatakeyama E, Yasuhara T, Nokihara K. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of agricultural and food chemistry*. ٢٠٠٣ Jun ٤;٥١(١٢):٣٦٦٨-٧٤. doi.org/١٠.١٠٢١/jf.٢١١٩١n
٣٢. Shimizu M, Sawashita N, Morimatsu F, Ichikawa J, Taguchi Y, Ijiri Y, Yamamoto J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis research*. ٢٠٠٩ Mar ١;١٢٣(٥):٧٥٣-٧. doi.org/١٠.١٠١٦/j.thromres.٢٠٠٨.٠٧.٠٠٥
٣٣. Soria AC, Villamiel M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: a review. *Trends in food science & technology*. ٢٠١٠ Jul ١;٢١(٧):٣٢٣-٣١. doi.org/١٠.١٠١٦/j.tifs.٢٠١٠.٠٤.٠٠٣
٣٤. Tian R, Feng J, Huang G, Tian B, Zhang Y, Jiang L, Sui X. Ultrasound driven conformational and physicochemical changes of soy protein hydrolysates. *Ultrasonics sonochemistry*. ٢٠٢٠ Nov ١;٦٨:١٠٥٢٠٢. doi.org/١٠.١٠١٦/j.ultsonch.٢٠٢٠.١٠٥٢٠٢
٣٥. Uluko H, Zhang S, Liu L, Tsakama M, Lu J, Lv J. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*. ٢٠١٥ Oct ١;١٨:١١٣٨-٤٦. doi.org/١٠.١٠١٦/j.jff.٢٠١٤.١١.٠٢٤
٣٦. Umayaparvathi S, Meenakshi S, Vimalraj V, Arumugam M, Sivagami G, Balasubramanian T. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*. ٢٠١٤ Jul ١;٤(٣):٣٤٣-٥٣. doi.org/١٠.١٠١٦/j.bionut.٢٠١٤.٠٤.٠٠٦
٣٧. Biesiekierski JR. What is gluten?. *Journal of gastroenterology and hepatology*. ٢٠١٧ Mar;٣٢:٧٨-٨١. doi.org/١٠.١١١١/jgh.١٣٧٠٣
٣٨. Wang Y, Wang Z, Handa CL, Xu J. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chemistry*. ٢٠١٧ Mar ١;٢١٨:١٦٥-٧٢. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodchem.٢٠١٦.٠٩.٠٦٩
٣٩. Weiss J, Gulseren I, Kjartansson G. Physicochemical Effects of High-Intensity Ultrasonication on Food Proteins and Carbohydrates. *Nonthermal Processing Technologies for Food*. ٢٠١٠ Dec ٣١:١٠٩-٣٤. doi.org/١٠.١٠٠٢/٩٧٨٠٤٧٠٩٥٨٣٦٠.ch٩
٤٠. Wen C, Zhang J, Zhang H, Duan Y, Ma H. Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates. *Food chemistry*. ٢٠١٩ Nov ٣٠;٢٩٩:١٢٥١٦٥. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodchem.٢٠١٩.١٢٥١٦٥
٤١. Wen C, Zhang J, Zhou J, Duan Y, Zhang H, Ma H. Effects of slit divergent ultrasound and enzymatic treatment on the structure and antioxidant activity of arrowhead protein. *Ultrasonics sonochemistry*. ٢٠١٨ Dec ١;٤٩:٢٩٤-٣٠٢. doi.org/١٠.١٠١٦/S٠٩٦٣-٩٩٦٩(٠٣)٠٠١٠٤-٢
٤٢. Wu HC, Chen HM, Shiao CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*. ٢٠٠٣ Jan ١;٣٦(٩-١٠):٩٤٩-٥٧. doi.org/١٠.١٠١٦/S٠٩٦٣-٩٩٦٩(٠٣)٠٠١٠٤-٢
٤٣. Xie Z, Huang J, Xu X, Jin Z. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*. ٢٠٠٨ Nov ١٥;١١١(٢):٣٧٠-٦. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodchem.٢٠٠٨.٠٣.٠٧٨
٤٤. Xue F, Wu Z, Tong J, Zheng J, Li C. Effect of combination of high-intensity ultrasound treatment and dextran glycosylation on structural and interfacial properties of buckwheat protein isolates. *Bioscience*,

biotechnology, and biochemistry. ۲۰۱۷ Oct ۳;۸۱(۱۰):۱۸۹۱-۸.
doi.org/۱۰.۱۰۸۰/۰۹۱۶۸۴۵۱.۲۰۱۷.۱۳۶۱۸۰۵

۴۵. You L, Zhao M, Cui C, Zhao H, Yang B. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative food science & emerging technologies*. ۲۰۰۹ Apr ۱;۱۰(۲):۲۳۵-۴۰. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.ifset.۲۰۰۸.۰۸.۰۰۷
۴۶. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*. ۲۰۰۲ Mar ۱۳;۵۰(۶):۱۶۱۹-۲۴. doi.org/۱۰.۱۰۲۱/jf.۱۰۹۶۴p
۴۷. Zhang L, Sun X, Lu X, Wei S, Sun Q, Jin L, Song G, You J, Li F. Characterization of peanut protein hydrolysate and structural identification of umami-enhancing peptides. *Molecules*. ۲۰۲۲ Apr ۳۰;۲۷(۹):۲۸۵۳. doi.org/۱۰.۳۳۹۰/molecules۲۷۰۹۲۸۵۳
۴۸. Zhao Q, Xiong H, Selomulya C, Chen XD, Zhong H, Wang S, Sun W, Zhou Q. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chemistry*. ۲۰۱۲ Oct ۱;۱۳۴(۳):۱۳۶۰-۷. doi.org/۱۰.۱۰۱۶/j.foodchem.۲۰۱۲.۰۳.۰۳۳
۴۹. Zudaire L, Lafarga T, Viñas I, Abadias M, Brunton N, Aguiló-Aguayo I. Effect of ultrasound pretreatment on the physical, microbiological, and antioxidant properties of calçots. *Food and Bioprocess Technology*. ۲۰۱۹ Mar ۱۵;۱۲(۳):۳۸۷-۹۴. doi.org/۱۰.۱۰۰۷/s۱۱۹۴۷۰۰۱۸-۲۲۱۷-z

The Effect of Ultrasound Pretreatment on the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Gluten by Trypsin

Mohammad Latif^۱, Seyed Hossein Hosseini Ghaboos^{۲*}, Alireza Sadeghi Mahoonak^۳

۱- Department of Food Science and Technology, Az.C., Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

۲- Food Science and Technology Research Center of East Golestan, Az.C., Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

۳- Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

Abstract

In this research, the effect of ultrasound pretreatment at ۴۵ and ۹۰% intensities was investigated on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity) of hydrolyzed gluten using trypsin enzyme at time intervals of ۳۰-۱۸۰ minutes. In the next step, the effect of different concentrations (۲۰-۸۰ mg/ml) of the optimal

treatment on antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, total antioxidant capacity and Fe chelating activity) was investigated and compared with the antioxidant activity of vitamin C as a synthetic antioxidant. The results showed that ultrasound pretreatment with 45% intensity significantly increased the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity) of hydrolyzed gluten at all hydrolysis times. On the other hand, the higher intensity of ultrasound had a negative effect on the antioxidant properties of the hydrolyzed samples. Finally, the sample with ultrasound pretreatment of 45% intensity and hydrolysis time of 150 minutes, which had the highest DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity, was selected as the optimal treatment. Evaluation the effect of concentration on antioxidant properties showed that the highest Fe chelating activity (69.16 %) and DPPH radical scavenging activity (49.76 %) at a concentration of 60 (mg/ml) and the highest total antioxidant capacity 0.937, absorption at 695 nm) was obtained at a concentration of 70 (mg/ml). As a result, hydrolyzed gluten can be used in food formulations to produce functional foods, and it can also be used as a bioactive compound in the pharmaceutical industry.

Key words: Antioxidant, Ultrasound, Hydrolyzed Protein, Trypsin, Gluten.

Corresponding Email: SH.Hosseinihaboos@iaau.ac.ir

Introduction

Reactive oxygen species can cause biochemical and physiological damages, which result in dangerous diseases such as cancer and cardiovascular diseases (1). Antioxidant compounds can neutralize oxidative reactions and delay the occurrence of lipid oxidation by reducing the concentration of free radicals (2). Synthetic antioxidant compounds such as BHA, BHT, PG and TBHQ are effective and inexpensive, but their pathogenic potential has led to concerns among researchers (3). Therefore, in recent years, the identification of natural antioxidant compounds has gained a special place among researchers. Among natural compounds with antioxidant properties, bioactive peptides contain 2-20 amino acids and a molecular weight of less than 1000 daltons and are released by enzymatic hydrolysis or microbial fermentation of the primary protein (4). Wheat gluten is a storage protein, and due to its insolubility in water, it can be easily separated from other wheat components in an almost pure form, making it a suitable option for producing hydrolyzed protein. The effectiveness of the enzymatic hydrolysis process has been proven in many studies; however, the application of pretreatments that lead to better enzyme performance and the production of hydrolyzed protein with higher antioxidant properties has a special place. Ultrasound as a non-thermal technology has been widely used in the food industry, especially for the extraction of bioactive compounds (5), enzymatic hydrolysis (6) and emulsification (7). So, the aim of this study was to investigate the effect of ultrasound pretreatment at different intensities (90 and 120%) on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging and total antioxidant) of hydrolyzed gluten protein using trypsin enzyme in the time interval of 30-180 minutes. In the next step, the effect of different concentrations (20-100 mg/ml) on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging, total antioxidant and iron ion chelation) of the optimized hydrolyzed protein was investigated.

Materials and methods

Gluten with 87% protein was purchased from Çiçek Sunbele Company, and other chemicals were purchased from Merck and Sigma. In this research, the effect of ultrasound pretreatment at 40% and 60% intensities on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity (A) and total antioxidant capacity (q) of hydrolyzed gluten using trypsin enzyme was investigated at time intervals of 30-180 minutes. For ultrasound pretreatments, a 0% gluten solution was prepared in phosphate buffer (0.2 M, pH = 7). The resulting solution was dissolved at 40°C for 24 hours. An ultrasound probe with a fixed frequency of 30 KHz and a time of 0 minutes at intensities of 40 and 60% was used for ultrasound application. An ice bath was used to prevent temperature increase during ultrasound application. For enzymatic hydrolysis, a 0% gluten solution was prepared in phosphate buffer (0.2 M, pH = 7). The resulting solution was dissolved at 40°C for 24 hours. An ultrasound probe with a fixed frequency of 30 KHz and a time of 0 minutes at intensities of 60 and 40% was used for ultrasound application. An ice bath was used to prevent temperature increase during ultrasound application (10).

In the next step, the effect of different concentrations (30-80 mg/ml) of the optimal treatment on antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, total antioxidant capacity and Fe chelating activity (11)) was investigated and compared with the antioxidant activity of vitamin C as a synthetic antioxidant.

Results and discussion

The results showed that ultrasound pretreatment with 40% intensity significantly increased the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity) of hydrolyzed gluten at all hydrolysis times. The improvement of antioxidant activity using ultrasound pretreatment with 40% power can be due to the cavitation phenomenon, which significantly reduces the size of the protein and changes its structure, and by increasing the contact surface of hydrophobic groups, increases the reaction of free radicals with the

produced bioactive peptides (12). On the other hand, the higher intensity of ultrasound had a negative effect on the antioxidant properties of the hydrolyzed samples. The negative effect of 90% ultrasound power may be due to changes in protein structure and the burial of hydrophobic groups of the protein from the surface into the molecule, which reduces the interaction between the protease used and the hydrophobic groups, resulting in a decrease in antioxidant activity (13). Finally, the sample with ultrasound pretreatment at 40% intensity and a hydrolysis time of 100 minutes, which exhibited the highest antioxidant capacity, was selected as the optimal treatment. Evaluation of the effect of concentration on antioxidant properties showed that the highest Fe chelating activity (69.16 %) and DPPH radical scavenging activity (49.76 %) at a concentration of 60 (mg/ml), and the highest total antioxidant capacity 0.937, (absorption at 760 nm), was obtained at a concentration of 70 (mg/ml). In general, the antioxidant properties of peptides obtained from enzymatic hydrolysis depend on various factors, including the type of pretreatment, hydrolysis conditions (type of protease, hydrolysis time, and enzyme percentage), amino acid composition of the initial protein, and the peptides produced (14).

Conclusion

According to the results of this study, ultrasound pretreatment with an intensity of 40% is a suitable solution for increasing the antioxidant properties of gluten hydrolysates, and the resulting hydrolysates have the potential to be used in food formulations for the production of functional products due to their high antioxidant properties. Also, hydrolyzed gluten can serve as a bioactive compound in the pharmaceutical industry.

References

1. Fiaschi T, Chiarugi P. Oxidative stress, tumor microenvironment, and metabolic reprogramming: a diabolic liaison. *International journal of cell biology*. 2012;2012(1):762820. doi.org/10.1155/2012/762820
2. Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2002 Mar 13;50(6):1619-24. doi.org/10.1021/jf010964p

٣. Li XX, Han LJ, Chen LJ. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. ٢٠٠٨ Jul;٨٨(٩):١٦٦٠-٦. doi.org/١٠.١٠٠٢/jsfa.٣٢٦٤
٤. Shimizu M, Sawashita N, Morimatsu F, Ichikawa J, Taguchi Y, Ijiri Y, Yamamoto J. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. *Thrombosis research*. ٢٠٠٩ Mar ١;١٢٣(٥):٧٥٣-٧. doi.org/١٠.١٠١٦/j.thromres.٢٠٠٨.٠٧.٠٠٥
٥. Kazemi M, Karim R, Mirhosseini H, Hamid AA. Optimization of pulsed ultrasound-assisted technique for extraction of phenolics from pomegranate peel of Malas variety: Punicalagin and hydroxybenzoic acids. *Food chemistry*. ٢٠١٦ Sep ١;٢٠٦:١٥٦-٦٦. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodchem.٢٠١٦.٠٣.٠١٧
٦. Jin J, Ma H, Wang K, Yagoub AE, Owusu J, Qu W, He R, Zhou C, Ye X. Effects of multi-frequency power ultrasound on the enzymolysis and structural characteristics of corn gluten meal. *Ultrasonics Sonochemistry*. ٢٠١٥ May ١;٢٤:٥٥-٦٤. doi.org/١٠.١٠١٦/j.ultsonch.٢٠١٤.١٢.٠١٣
٧. Alzorqi I, Ketabchi MR, Sudheer S, Manickam S. Optimization of ultrasound induced emulsification on the formulation of palm-olein based nanoemulsions for the incorporation of antioxidant β -d-glucan polysaccharides. *Ultrasonics Sonochemistry*. ٢٠١٦ Jul ١;٣١:٧١-٨٤. doi.org/١٠.١٠١٦/j.ultsonch.٢٠١٥.١٢.٠٠٤
٨. Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*. ٢٠٠٣ Jan ١;٣٦(٩-١٠):٩٤٩-٥٧. doi.org/١٠.١٠١٦/S٠٩٦٣-٩٩٦٩(٠٣).٠١.٤-٢
٩. Prieto P, Pineda M, Aguilar M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*. ١٩٩٩ May ١;٢٦٩(٢):٣٣٧-٤١. doi.org/١٠.١٠٠٦/abio.١٩٩٩.٤.١٩
١٠. Li X, Da S, Li C, Xue F, Zang T. 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*. ٢٠١٨ Jul;٩٥(٤):٥١٨-٢٦. doi.org/١٠.١٠٠٢/cche.١٠٠٥٥
١١. Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*. ٢٠١٠ Jul ١;١٢١(١):١٧٨-٨٤. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodchem.٢٠٠٩.١٢.٠٢٧
١٢. Weiss J, Gulseren I, Kjartansson G. Physicochemical Effects of High-Intensity Ultrasonication on Food Proteins and Carbohydrates. *Nonthermal Processing Technologies for Food*. ٢٠١٠ Dec ٣١:١٠٩-٣٤. doi.org/١٠.١٠٠٢/٩٧٨٠.٤٧.٩٥٨٣٦.ch٩
١٣. Jiang L, Wang J, Li Y, Wang Z, Liang J, Wang R, Chen Y, Ma W, Qi B, Zhang M. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food research international*. ٢٠١٤ Aug ١;٦٢:٥٩٥-٦٠١. doi.org/١٠.١٠١٦/j.foodres.٢٠١٤.٠٤.٠٢٢
١٤. Marciniak A, Suwal S, Naderi N, Pouliot Y, Doyen A. Enhancing enzymatic hydrolysis of food proteins and production of bioactive peptides using high hydrostatic pressure technology. *Trends in Food Science & Technology*. ٢٠١٨ Oct ١;٨٠:١٨٧-٩٨.