



بررسی تاثیر پیش تیمار مایکروویو بر ویژگی های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان

نادر سندگل^۱، سید حسین حسینی قابوس^{۲*}، علیرضا صادقی ماهونک^۳

- ۱- دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، واحد آزادشهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
 ۲- استادیار مرکز تحقیقات صنایع غذایی شرق گلستان، واحد آزاد شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، آزادشهر، ایران
 ۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۱</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۱۴</p>	<p>در این پژوهش تاثیر پیش تیمار مایکروویو در توان های ۵۰۰ و ۹۰۰ وات بر ویژگی های آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و آنتی اکسیدانی کل) پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان در بازه زمانی ۲۱۰۰-۳۰ دقیقه بررسی گردید. در مرحله بعد تاثیر غلظت های متفاوت (۲۰-۱۰۰ mg/ml) تیمار بهینه بر ویژگی های آنتی اکسیدانی (ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، فعالیت احیاء کنندگی یون آهن، مهار رادیکال DPPH و شلاته کنندگی یون آهن) بررسی و با خاصیت آنتی اکسیدانی ویتامین ث به عنوان یک آنتی اکسیدان سنتزی و پروتئین هیدرولیز نشده بذر کتان مقایسه شد. نتایج نشان داد که پیش تیمار مایکروویو در توان ۵۰۰ وات به طور معنی داری باعث افزایش خواص آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و آنتی اکسیدانی کل) پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان شد اما توان بیشتر مایکروویو (۹۰۰ وات) باعث کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی نسبت به نمونه بدون اعمال پیش تیمار و یا نمونه با اعمال پیش تیمار مایکروویو با توان ۵۰۰ وات شد. نمونه با اعمال پیش تیمار مایکروویو با توان ۵۰۰ وات و زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه به توان تیمار بهینه با بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به عنوان تیمار بهینه انتخاب شد. بررسی تاثیر غلظت بر خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که بیشترین مهار رادیکال آزاد DPPH (۵۲/۷ درصد)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۱/۳۵ جذب در ۶۹۵ نانومتر)، فعالیت احیاء کنندگی یون آهن (۰/۸۵۹ جذب در ۷۰۰ نانومتر) در غلظت (mg/ml) ۶۰ و بیشترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (۵۰/۸۳ درصد) در غلظت (mg/ml) ۸۰ حاصل شد. در نتیجه پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان با دارا بودن قابلیت آنتی اکسیدانی مناسب قابلیت کاربرد در تولید محصولات غذایی فراسودمند، مکمل های غذایی ورزشکاران و سالمندان را دارد.</p>
<p>کلمات کلیدی:</p> <p>آنتی اکسیدان، بذر کتان، پانکراتین، پروتئین هیدرولیز شده، مایکروویو</p> <p>DOI: 10.22034/FSCT.21.148.190.</p> <p>مسئول مکاتبات: * Hosseinighaboos@yahoo.com</p>	

۱-مقدمه

رادیکال‌های آزاد در بروز بیماری‌های خطرناک مانند سرطان، زخم معده و آلزایمر نقش مهمی دارند. تشکیل رادیکال‌های آزاد در اندام‌های هوایی در طول تنفس امری غیرممکن است. این رادیکال‌ها ناپایدار بوده و به سرعت با سایر ترکیبات موجود در بدن واکنش می‌دهند و باعث آسیب سلول‌ها می‌شوند (۱). اکسیداسیون لیپیدها از مهم‌ترین چالش‌های صنعت مواد غذایی نیز می‌باشد چرا که علاوه بر اثرات خطرناک بر سلامت انسان، باعث تشکیل ترکیبات خطرناک و هم چنین مواد بد بو و بدطعم می‌گردد که خسارات اقتصادی جبران ناپذیری به تولیدکنندگان وارد می‌کند (۲). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مثل BHA^1 ، BHT^2 ، PG^3 و $TBHQ^4$ خاصیت آنتی‌اکسیدانی بسیار قابل قبولی دارند و قیمت مناسبی دارند اما عوارض نامطلوب آنها بر سلامتی انسان باعث ایجاد نگرانی در بین پژوهشگران شده در نتیجه در بسیاری از کشورها کاربرد آنها در فرمولاسیون مواد غذایی محدود و یا متوقف گردیده است (۳). از این رو در سال‌های اخیر شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی از موضوعات بسیار مورد توجه پژوهشگران تبدیل شده است. در میان ترکیبات طبیعی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی، پیتیدهای زیست‌فعال حاوی ۲۰-۲۰۰ آمینو اسید بوده و دارای وزن مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون هستند و به وسیله هیدرولیز آنزیمی، سنتز شیمیایی و یا تخمیر میکروبی تولید می‌شوند (۴). در سال‌های اخیر پیتیدها و پروتئین هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی از منابع گیاهی مختلفی استخراج شده است از جمله بادام زمینی (۵)، هسته انگور (۶)، جوانه گندم (۷)، کدو (۸) و شنبلیله (۹). در میان منابع گیاهی مناسب جهت استخراج پیتیدهای زیست‌فعال بذر کتان گزینه مناسبی است. دانه‌های کتان قرن‌هاست که به عنوان ماده غذایی مصرف می‌شود. بیشتر پروفایل اسیدهای چرب آن را آلفالینولنیک اسید تشکیل می‌دهد و

دارای امگا۳ فراوان می‌باشد که باعث کاهش بیماری‌های قلبی و عروقی، فشارخون، افسردگی، پوکی استخوان، روماتیسم مفاصل، کاهش وزن، دیابت و بیماری‌های دستگاه گوارش می‌شود. دارای ۲۵٪ فیبر و ۱۹ تا ۲۹٪ پروتئین و ۸٪ ترکیبات موسیلاژی و ۳/۶۷٪ خاکستر است و به عنوان غنی کننده در ایالات متحده و کشورهای اروپایی استفاده می‌گردد (۱۰). کارایی فرایند هیدرولیز آنزیمی در بهبود خواص عملکردی و زیست‌فعالی پروتئین‌های غذایی در بسیاری از مطالعات اثبات شده است؛ با این وجود کاربرد پیش‌تیمارهایی که منجر به عملکرد بهتر آنزیم‌ها و تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتر شود از جایگاه ویژه‌ای برخوردار است. در میان پیش‌تیمارهای مناسب همچون مایکروویو، اولتراسوند، امپیک و گرما، مایکروویو تکنولوژی مناسبی است که در سال‌های اخیر کاربرد آن در بهبود ویژگی‌های سلامتی بخشی پروتئین‌های هیدرولیز شده گسترش یافته است (۱۱). مایکروویو یک روش سریع، راحت و مقرون به صرفه برای گرم کردن می‌باشد که با پلاریزه کردن درشت مولکول‌ها اثر حرارتی خود را ایجاد می‌کند، این امر منجر به همسویی قطب‌های میدان الکترومغناطیسی می‌شود که در نتیجه ممکن است باعث شکستن پیوندهای هیدروژنی و قرارگیری بهتر پروتئین‌ها در معرض آنزیم شود (۱۲). بنابراین با توجه به موارد گفته شده هدف از این پژوهش بررسی تاثیر پیش‌تیمار مایکروویو در توان‌های مختلف (۹۰۰ و ۵۰۰ وات) بر خواص آنتی-اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH^۵ و آنتی‌اکسیدانی کل) پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان با استفاده از آنزیم پانکراتین در بازه زمانی ۲۰-۲۱۰ دقیقه بود. در مرحله بعد تاثیر غلظت-های متفاوت (۲۰-۱۰۰ mg/ml) بر خواص آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH^۵، آنتی‌اکسیدانی کل، احیاء کنندگی یون آهن و شلاته کنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده بهینه بررسی شد.

4 -Tertiary butylhydroquinone

5 -2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

1 -butylated hydroxyanisole

2 -butylatedhydroxytoluene

3 -propyl gallate

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

آمونیم مولبیدات، پانکراتین، دی کلرید آهن، فریک کلرید، فروزین، آسکوربیک اسید و DPPH از شرکت مرک و اتانول، سدیم تری فسفات، اسید سولفوریک، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، دی پتاسیم هیدروژن فسفات از شرکت سیگما و بذر کتان از عطاری در مرکز شهر تهران خریداری شدند.

۲-۲- استخراج پروتئین

در ابتدا کنجاله بذر کتان با آسیاب الکتریکی پودر و به منظور چربی زدایی، آرد حاصل به نسبت ۴:۱ (وزنی/حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۳ ساعت در دمای اتاق همزده شد. سپس با استفاده از کیف بوختر هگزان جدا و پودر چربی گیری شده در دمای ۳۵ درجه سانتی گراد خشک گردید و سپس از الک با مش ۴۰ عبور داده شد. عملیات استخراج پروتئین از پودر چربی زدایی شده به اینصورت بود که پودر حاصل به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر با pH=۱۰ مخلوط و به مدت ۲ ساعت همزده شد، سپس محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در مرحله بعد pH سوپرناتانت در pH=۴ (pH ایزوالکتریک) تنظیم شد. سپس برای رسوب پروتئین‌ها، محلول حاصل در ۴۵۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد و رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شسته شده و در ۴۵۰۰×g، به مدت ۵ دقیقه مجدداً سانتریفوژ شد. سپس ایزوله پروتئین حاصل با خشک کن انجمادی خشک و تا انجام آزمون‌های بعدی در دمای ۴°C نگهداری گردید (۶).

۲-۳- پیش تیمار مایکروبیو

ابتدا محلول ۵ درصد پروتئین کتان در بافر فسفات (M ۰/۲، pH=۷) تهیه شد. محلول حاصل در دمای ۴ درجه سانتی-

گراد بمدت ۲۴ ساعت حل گردید. پیش تیمار مایکروبیو در توان‌های ۷۰۰ و ۵۰۰ وات به مدت ۱ دقیقه اعمال شد (۱۳).

۲-۴- تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی بذر کتان

ایزوله‌ی پروتئین بذر کتان (نمونه‌ی بدون اعمال مایکروبیو، نمونه‌های تیمار شده با مایکروبیو) در غلظت ۵٪ در بافر فسفات مخلوط و به مدت ۳۰ دقیقه برای هیدراته شدن کامل در دمای محیط همزده شد. سپس نمونه‌ها درون انکوباتور (دمای ۴۰ درجه سانتی گراد) قرار داده شده و پانکراتین به نسبت ۱/۵ درصد اضافه شد. واکنش در زمان ۲۱۰-۳۰ دقیقه انجام شد. در هر مرحله پس از سپری شدن زمان‌های لازم، جهت غیرفعال‌سازی آنزیم، نمونه‌ها درون حمام آب با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد منتقل و پس از ۱۰ دقیقه برای رسیدن به دمای محیط در ظرف یخ قرار داده شدند. در مرحله بعد نمونه‌ها سانتریفوژ (دور ۸۰۰۰×g به مدت ۲۰ دقیقه) و سوپرناتانت حاصل با استفاده از ه خشک‌کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در ظروف تیره به دور از نور و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۴).

۲-۴- ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی

۲-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

جهت ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان در غلظت ۴۰ mg/ml در آب مقطر تهیه شدند. سپس به نسبت ۱:۱، ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول اتانولی DPPH در غلظت ۰/۱۵mM به ۱/۵ میلی‌لیتر از هر نمونه اضافه و برای اختلاط کامل ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. سپس مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و در نهایت در ۲۵۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. جذب سوپرناتانت جدا شده در ۵۱۷ نانومتر خوانده شد (۱۵). درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول شماره ۱ محاسبه گردید:

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

(۱)

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

(۲)

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

۲-۵-۲- قدرت احیاء کنندگی یون آهن

برای بررسی قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده حاصل، ۰/۵ml نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت ۰/۲M با فرسفات ۰/۵ml با ۱۰۰-۲۰ (mg/ml) و pH=۶/۶) و ۰/۵ml پتاسیم فری سیانید (W/V) ۱٪ مخلوط و در ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس در مرحله بعد، ۰/۵ml محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مخلوط افزوده شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰rpm سانتریفوژ گردید. در نهایت، ۱ml از سوپرناتانت حاصل با ۱ml آب مقطر و ۰/۲ml فریک کلراید (W/V) ۰/۱٪ مخلوط گردید و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد. جذب نمونه‌ها در ۷۰۰nm خوانده شد. افزایش جذب مخلوط حاکی از افزایش قدرت احیاء کنندگی است (۱۷).

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 2013 نمودارها رسم گردید.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH، رادیکالی آزاد و محلول در چربی است که در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارای بیشترین جذب است و با دریافت هیدروژن از ترکیبی آنتی‌اکسیدان، پایدار گشته و جذب آن

A_{blank} جذب شاهد و A_{sample} جذب نمونه می‌باشند.

۲-۴-۲- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

جهت اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها، ۱ml از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰mg/ml) با معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ M، فسفات سدیم ۲۸ Mm و آمونیوم مولیبدات ۴ mM) مخلوط و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰°C قرار داده شد. در نهایت پس از سرد شدن نمونه‌ها و رسیدن به دمای محیط جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ nm قرائت شد. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بیشتر است (۱۶).

۲-۵- بررسی تاثیر غلظت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی

تیمار بهینه پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان

برای ارزیابی تاثیر غلظت (۱۰۰-۲۰mg/ml) بر مهار رادیکال آزاد DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تیمار بهینه به ترتیب از روش Kaveh و همکاران (۲۰۲۴) و Prieto و همکاران (۱۹۹۹) که در قسمت قبل ذکر گردید استفاده شد (۱۵ و ۱۶).

۲-۵-۱- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

جهت اندازه‌گیری توانایی نمونه‌ها در شلاته‌کنندگی یون آهن، ابتدا ۱ میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده حل شده در آب مقطر در غلظت (۱۰۰-۲۰mg/ml) با ۰/۰۵ml محلول دی کلرید آهن (۲mM) و ۱/۸۵ml آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس ۰/۱ml محلول فروزین (۵mM) اضافه و مخلوط هم‌زده شد. در مرحله آخر به مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب آن در ۵۶۲nm خوانده شد (۵). فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله (۲) محاسبه گردید:

پروتئین دانه شنبلیله بیان کردند که افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت پروتئین هیدرولیز شده در مهار رادیکال DPPH تا حدود ۴۸ درصد شد و افزایش بیشتر زمان تاثیر معنی داری نداشت (۱۸). از طرف دیگر اعمال پیش تیمار مایکروبیو با توان ۵۰۰ وات باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH نسبت به نمونه بدون اعمال پیش تیمار مایکروبیو شد اما تنها تیمار هیدرولیز شده در زمان ۳۰ دقیقه فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به نمونه با پیش تیمار ۵۰۰ وات داشت و در زمان‌های هیدرولیز تا ۱۲۰ دقیقه تفاوت معنی داری بین نمونه‌های با پیش تیمار ۵۰۰ و ۹۰۰ وات مشاهده نشد و در زمان‌های هیدرولیز بیشتر تا ۲۱۰ دقیقه نمونه‌های با پیش تیمار ۹۰۰ وات دارای فعالیت مهار رادیکال DPPH کمتری نسبت به نمونه‌های با پیش تیمار ۵۰۰ وات داشتند. بهبود توانایی پروتئین هیدرولیز شده در مهار رادیکال DPPH با استفاده از پیش تیمار مایکروبیو با توان ۵۰۰ وات می‌تواند به این دلیل باشد که امواج مایکروویو باعث تبخیر آب در سلول‌ها و افزایش فشار در محیط داخلی می‌شود که این امر منجر به تجزیه ترکیبات درون سلولی، از هم گسیختگی غشاء و در نتیجه تجزیه آن شده که باعث تسهیل در فرآیند آنزیمولیز پروتئین‌ها می‌شود (۲۱)، قابل ذکر است که مایکروبیو می‌تواند تاثیرات بیولوژیکی و شیمیایی مختلفی بر حسب قدرت و زمان اعمال پیش تیمار مایکروبیو ایجاد کند. اثر منفی پیش تیمار مایکروبیو در توان ۹۰۰ وات بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های تولیدی می‌تواند به دلیل تغییرات نامطلوب در ساختار دوم پروتئین و کاهش میزان ساختار مارپیچ^۷ و ورقه‌ی بتا^۸ باشد (۲۲). به طور کلی می‌توان گفت تغییر در اندازه، میزان و ترکیب آمینواسیدهای آزاد و پپتیدها به‌ویژه پپتیدهایی با وزن مولکولی کم تاثیر به‌سزایی بر خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی دارند (۲۳). در تطابق با این یافته‌ها Uluko و همکاران (۲۰۱۵) با بررسی تاثیر پیش تیمار مایکروبیو بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده کنسانتره شیر، افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی

کاهش می‌یابد (۱۸). نتایج حاصل از بررسی زمان هیدرولیز نشان داد (شکل ۳۱) که در نمونه‌های بدون پیش تیمار مایکروویو و نمونه با پیش تیمار مایکروبیو با توان ۵۰۰ وات، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH به ترتیب به میزان ۴۳/۷۵ و ۵۱/۴۳ درصد شد و با افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر معنی داری در پی نداشت ($p > 0.05$). از طرف دیگر در تیمار با اعمال پیش تیمار مایکروبیو با توان ۹۰۰ وات افزایش زمان هیدرولیز تا ۹۰ دقیقه باعث افزایش معنی دار فعالیت مهار رادیکال DPPH شد، هیدرولیز به میزان ۱۲۰ دقیقه تفاوت معنی داری با نمونه هیدرولیز شده در ۹۰ دقیقه نداشت و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز باعث کاهش معنی دار فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گشت. پیشرفت فرآیند هیدرولیز طی افزایش زمان منجر به تولید پپتیدهای دهنده پروتون می‌گردد که می‌توانند با رادیکال آزاد DPPH، واکنش دهند و ترکیباتی پایدار تولید کنند و باعث اتمام واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالی گردند. تاثیر نامطلوب افزایش بیش از اندازه زمان هیدرولیز آنزیمی ممکن است به دلیل تاثیر بیشتر آنزیم باشد که منجر به شکسته شدن و تجزیه تعدادی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌گردد که در مراحل اولیه هیدرولیز تولید شده‌اند، که این فرآیند باعث کاهش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH می‌شود (۱۹). در تطابق با این نتایج Batista و همکاران (۲۰۱۰) گزارش کردند که افزایش درجه هیدرولیز و زمان باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده ماهی خرچنگ سیاه^۶ گشت. آنها افزایش میزان پپتیدهای دهنده هیدروژن که توانایی واکنش با رادیکال‌های آزاد را دارند، علت این نتایج دانستند (۲۰). مشابه با این نتایج Kaveh و همکاران (۲۰۲۳)، Jamdar و همکاران (۲۰۱۰) و You و همکاران (۲۰۰۹) به ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های امعاء و احشاء هوور مسقطی و بادام زمینی تاثیر مثبت زمان هیدرولیز را بر قابلیت مهار رادیکال DPPH گزارش کردند (۳ و ۵). همچنین کاوه و همکاران (۱۳۹۸) نیز با هیدرولیز

را بر فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی
خاویار چینی^۹ گزارش کردند (۲۵).

هیدرولیز شده‌های حاصل را گزارش کردند (۲۴). در حالیکه
Noman و همکاران (۲۰۲۰) اثر منفی پیش تیمار مایکروویو

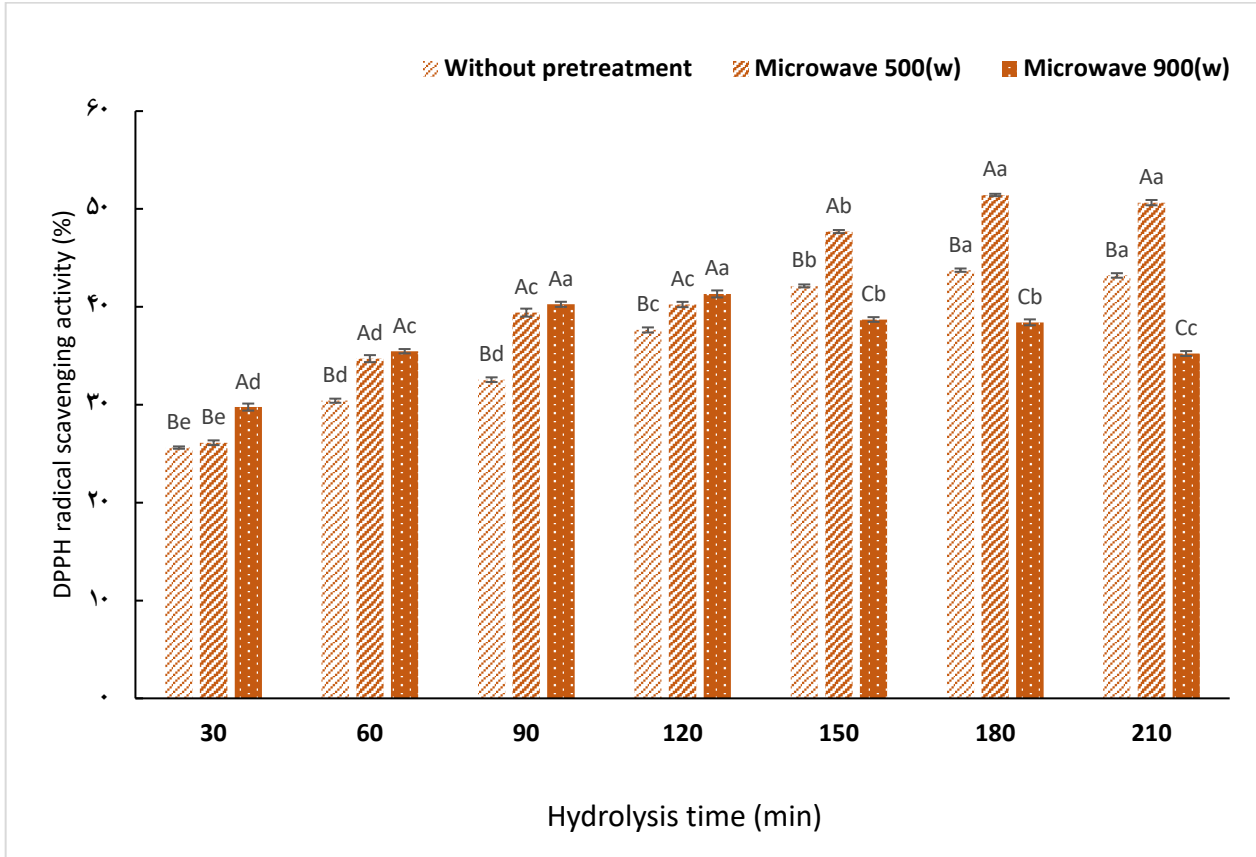


Figure 1- DPPH radical scavenging activity of flax seed protein hydrolysate

۲-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

تیمار مایکروویو با توان ۵۰۰ وات افزایش زمان هیدرولیز تا
۱۵۰ دقیقه باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل به میزان
۱/۲۴۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) شد، افزایش زمان تا ۱۸۰
دقیقه تاثیر معنی داری ایجاد نکرد، اما افزایش بیشتر زمان تا
۲۱۰ دقیقه باعث کاهش معنی دار ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
تا ۱/۰۴۱ شد ($p < 0/05$). در نمونه‌های با اعمال پیش تیمار
مایکروویو با توان ۹۰۰ وات با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰
دقیقه، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافت اما افزایش
بیشتر زمان هیدرولیز تاثیری منفی داشت. به طور کلی در زمان
هیدرولیز بیشتر از ۱۸۰ دقیقه ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
پروتئین هیدرولیز شده به ترتیب عبارت بودند از نمونه با
اعمال پیش تیمار مایکروویو ۵۰۰ وات < نمونه بدون اعمال
پیش تیمار < نمونه با اعمال پیش تیمار مایکروویو ۹۰۰ وات.

آزمون ارزیابی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل روشی کمی برای
بررسی قدرت آنتی اکسیدانی محلول در آب و محلول در
چربی (قدرت آنتی اکسیدانی کل) ترکیبات آنتی اکسیدان
است. این روش بر مبنای احیای یون مولیبدن ۶ ظرفیتی به
یون مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که همراه با تشکیل کمپلکس
سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی همراه است (۱۸).
همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده است، در نمونه‌های
بدون اعمال پیش تیمار مایکروویو افزایش زمان هیدرولیز تا
۱۸۰ دقیقه باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تا ۰/۹۶۳
(جذب در ۶۹۵ نانومتر) شد و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز
در نمونه کنترل تاثیر معنی داری بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل
نمونه‌ها نداشت ($p > 0/05$). از سوی دیگر در نمونه با پیش-

9 -Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*)

این امر افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده را در پی دارد (۲۶). مشابه این نتایج مظلومی و همکاران (۱۳۹۸) با هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با آلکالاز بیان کردند که افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده داشت و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پس از هیدرولیز به مدت ۴/۸ ساعت حاصل شد (۲۷). در این راستا، کاوه و همکاران (۱۳۹۸) نتایج مشابهی را در فرایند هیدرولیز پروتئین شبلیله گزارش کردند. آنها بیان کردند که افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه توسط آنزیم پانکراتین منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده تولیدی شد اما افزایش بیشتر هیدرولیز تاثیری معنی‌دار بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های تولیدی نداشت (۱۷). همچنین مشابه با این یافته‌ها Yang و همکاران (۲۰۱۳) تاثیر مثبت پیش تیمار مایکروویو را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سفیده تخم مرغ گزارش کردند (۲۸). Zhang و همکاران (۲۰۱۹) نیز تاثیر مثبت پیش تیمار مایکروویو را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سیب زمینی شیرین گزارش کردند (۲۹).

در زمان‌های هیدرولیز ۱۲۰ و ۶۰، ۳۰ دقیقه نیز بیشتر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به نمونه با اعمال پیش تیمار مایکروویو به میزان ۵۰۰ وات بود و بین نمونه با پیش تیمار مایکروویو ۹۰۰ وات و نمونه بدون اعمال پیش تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p > 0.05$). تاثیر مثبت پیش تیمار مایکروویو بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به دلیل توانایی آن بر تجزیه تجمعات مولکولی پروتئین بذر کتان باشد که این امر باعث افزایش حساسیت باندهای پپتیدی پروتئین به هیدرولیز توسط آنزیم پروتئاز (پانکراتین) گشته است. قابل ذکر است که پیامد این فرآیند به‌میزان زیادی به توان و طول در معرض قرار گرفتن امواج مایکروویو دارد (۲۲)، که همانطور که مشاهده شد توان ۹۰۰ وات مایکروویو نسبت به توان ۵۰۰ وات تاثیر منفی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشت. تاثیر منفی پیش تیمار مایکروویو در توان ۹۰۰ وات می‌تواند به دلیل تغییرات نامطلوب در ساختار پروتئین باشد که از رهائش پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی جلوگیری کرده است (۲۴). از سوی دیگر تاثیر مثبت افزایش زمان هیدرولیز ممکن است ناشی از رهائش پپتیدهایی با توانایی الکترون‌دهندگی باشد که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر می‌شوند که

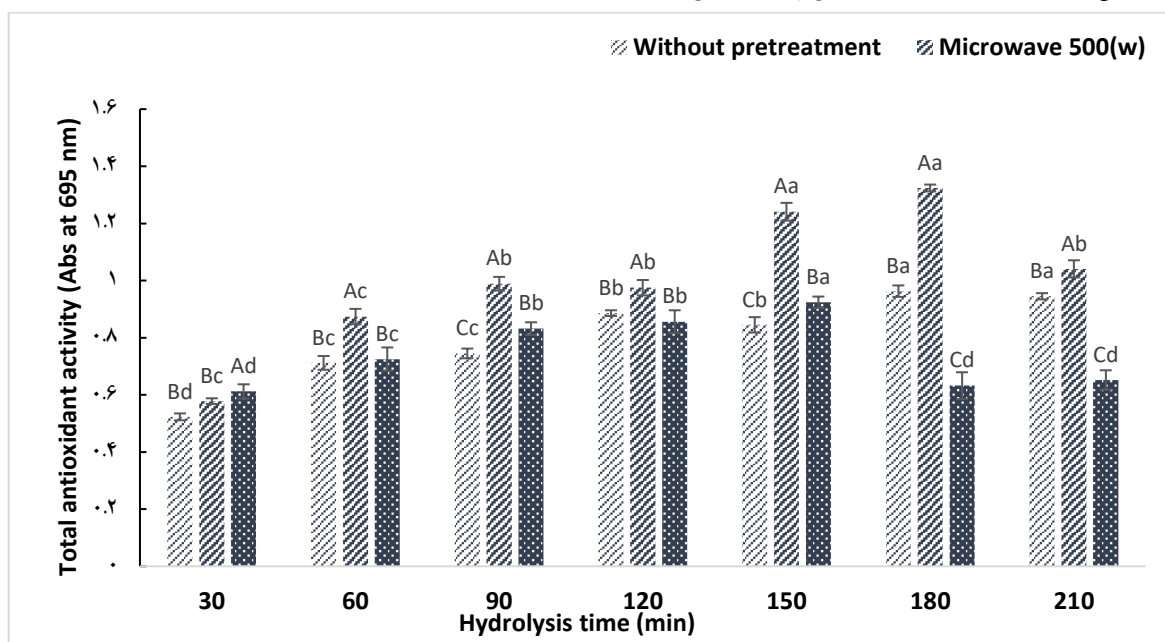


Figure 2- Total antioxidant activity of flax seed protein hydrolysate

۳-۳- انتخاب تیمار بهینه

پس از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده‌ی تولیدی، تیمار با اعمال پیش تیمار مایکروویو ۵۰۰ وات و زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. بنابراین برای بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن (فعالیت مهار رادیکال DPPH، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، فعالیت احیاء کنندگی یون آهن و فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن) در مرحله بعد انتخاب گردید.

۳-۴- بررسی تاثیر غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه بهینه

۳-۴-۱- فعالیت مهار رادیکال DPPH

شکل ۳، تاثیر غلظت را بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH تیمار بهینه پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان و مقایسه آن با پروتئین هیدرولیز نشده و ویتامین ث در غلظت (mg/mL) ۱۰۰ نشان می‌دهد. نتایج نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده وابسته به غلظت بود و با افزایش غلظت از (mg/mL) ۲۰ تا (mg/mL) ۶۰ به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH از ۳۵/۶۸ درصد به ۵۲/۷۰ درصد شد. افزایش غلظت تا (mg/mL) ۸۰ تاثیر معنی‌داری نداشت اما غلظت (mg/mL) ۱۰۰ باعث کاهش توانایی هیدرولیز شده حاصل در مهار رادیکال DPPH شد ($p < 0/05$). تیمار هیدرولیز شده در تمامی غلظت‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری

نسبت به پروتئین هیدرولیز نشده بذر کتان داشت. که نشان از موفقیت آمیز بودن فرآیند هیدرولیز در ره‌ایش پپتیدهای آنتی‌اکسیدان است ($p < 0/05$). با وجود فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان اما توانایی آن در مهار رادیکال آزاد DPPH در تمامی غلظت‌ها به‌طور معنی‌داری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث کمتر بود ($p < 0/05$). فعالیت قابل توجه پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان در مهار رادیکال آزاد DPPH می‌تواند به دلیل وجود آمینواسیدهای آروماتیک باشد که دارای گروه‌های هیدروکسیل با خاصیت پروتون دهنده‌گی می‌باشند، از طرف دیگر تاثیر منفی افزایش بیش از اندازه غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ممکن است به اشباع شدن نقاط فعال مربوط باشد (۳۰). مشابه با این نتایج Zhao و همکاران (۲۰۱۲) با هیدرولیز آنزیمی پروتئین برنج با آنزیم‌های پروتئازی تریپسین، آلکالاز، پروتامکس، فلاورزیم و نوترناز بیان کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های حاصل وابسته به غلظت بود و هیدرولیز شده‌های تولیدی با آنزیم پروتامکس دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بود (۳۱). در تطابق با این نتایج Umayaparvathi و همکاران (۲۰۱۴)، Chi و همکاران (۲۰۱۵) و Batista و همکاران (۲۰۱۰)، به ترتیب فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده صدف، نوعی ماهی ۱ و ماهی خرچنگی سیاه را وابسته به غلظت گزارش کردند (۳۲، ۳۳ و ۲۰).

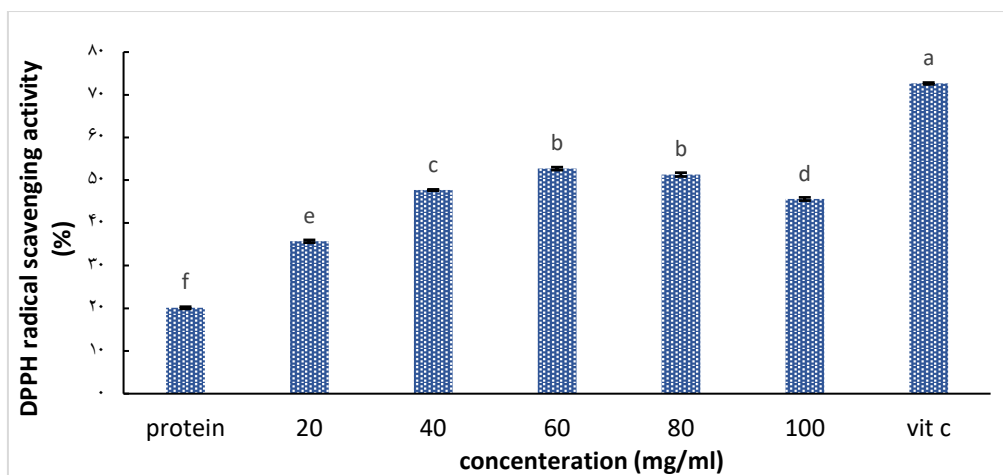


Figure 3- The effect of concentration on DPPH radical scavenging activity of flax seed protein hydrolysate

آمیز بودن فرآیند هیدرولیز با آنزیم پانکراتین در رهائش پپتیدهایی با توانایی الکترون دهنده‌گی بوده که قادرند به‌عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان طبیعی باعث مهار رادیکال‌های آزاد گردند (۲۶). در تطابق با این نتایج Bougategf و همکاران (۲۰۰۹) تاثیر مثبت غلظت را بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده حاصل از نوعی کوسه (کوسه صیقلی^(۱)) بیان کردند و گزارش کردند که علی‌رغم قابل توجه بودن ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده اما خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن از آنتی‌اکسیدان سنتزی BHA کمتر بود (۳۴). همچنین کاوه و همکاران (۱۳۹۸) با هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله بیان کردند که ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله به غلظت وابسته بود و افزایش غلظت آن از ۱۰ (mg/ml) به ۴۰ (mg/ml) باعث افزایش معنی‌دار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل گشت، اما افزایش بیشتر غلظت تاثیر معنی‌داری در پی نداشت؛ همچنین گزارش کردند که در تمامی غلظت‌ها ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده دانه شنبلیله کمتر از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ویتامین ث با غلظت ۵۰ (mg/ml) بود (۱۹).

۲-۴-۳- ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

با توجه به شکل ۴، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان وابسته به غلظت بود و افزایش غلظت هیدرولیز شده از ۲۰ (mg/ml) تا ۶۰ (mg/ml) به‌طور معنی‌داری باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی از ۰/۷۵۲ به ۱/۳۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) شد ($p < 0/05$) اما افزایش بیشتر غلظت تا ۱۰۰ (mg/ml) به‌طور معنی‌داری باعث کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی گشت. کمترین و بیشترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۲۰ (mg/ml) و ۶۰ (mg/ml) به میزان ۰/۷۵۲ و ۱/۳۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. از سوی دیگر در تمامی غلظت‌های مورد بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده به‌طور معنی‌داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز نشده بذر کتان بود که نشان از توانایی مناسب آنزیم پانکراتین در رهائش پپتیدهای آنتی‌اکسیدان دارد. از سوی دیگر در تمامی غلظت‌های مورد بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کمتر از ویتامین ث در غلظت ۱۰۰ (mg/ml) بود ($p < 0/05$). به‌طور کلی پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان از ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل قابل توجهی برخوردار بود که نشان از موفقیت

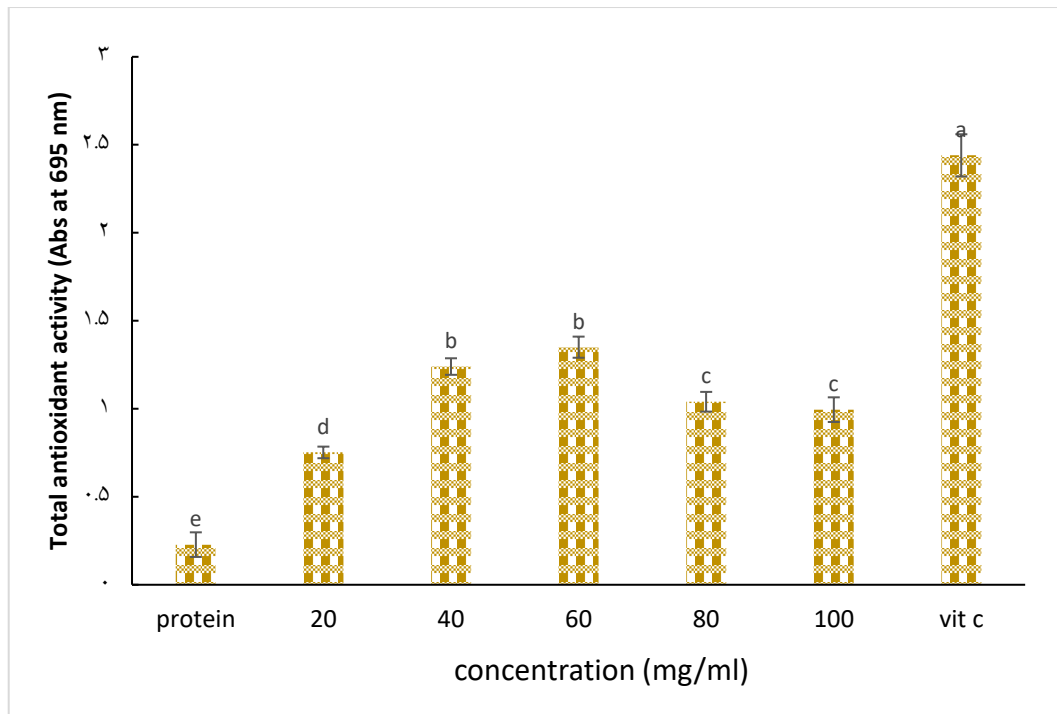


Figure 4- The effect of concentration on total antioxidant activity of flax seed protein hydrolysate

بیشتر غلظت تاثیر معنی داری در پی نداشت. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌های تولیدی با پروتئین هیدرولیز نشده نشان داد که هیدرولیز به‌طور معنی داری باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین بذر کتان شده اما در تمامی غلظت‌ها از توانایی شلاته‌کنندگی کمتری نسبت به ویتامین ث برخوردار بود. به‌طور کلی مطالعات نشان داده است که عوامل مختلفی بر توانایی شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده بستگی دارد از جمله: نوع پروتئین اولیه، ترکیب آمینواسیدی، نوع پروتئاز مورد استفاده و همچنین میزان درجه هیدرولیز (۳۶). در تطابق با این یافته‌ها Xie و همکاران (۲۰۰۸) و Klompong (۲۰۰۷) به ترتیب فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده‌یونجه و ماهی خط زرد^{۱۲} را وابسته به غلظت گزارش کردند (۳۷ و ۳۸).

۳-۴-۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

در واکنش‌های اکسیداسیون، یون‌های فلزی مانند یون Fe^{2+} نقش مهمی به‌عنوان کاتالیزور بر عهده دارند که تولید رادیکال‌های خطرناک هیدروکسیل را از سوپراکسید هیدروژن در پی دارد. این ترکیبات رادیکالی به سرعت با مولکول‌های زیستی مجاور واکنش داده و باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌های بدن می‌شوند (۳۵). بنابراین مهار و به‌دام اندازی یون‌های فلزی نقش بسیار مهمی در ممانعت از اکسیداسیون دارد. همانطور که در شکل ۵ نشان داده شده است، افزایش غلظت باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده‌ی بذر کتان شد؛ افزایش غلظت از ۲۰ (mg/ml) تا ۸۰ (mg/ml) به‌طور معنی داری باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده از ۳۴/۶۸ درصد به ۵۴/۸۳ درصد شد ($p < 0/05$) و افزایش

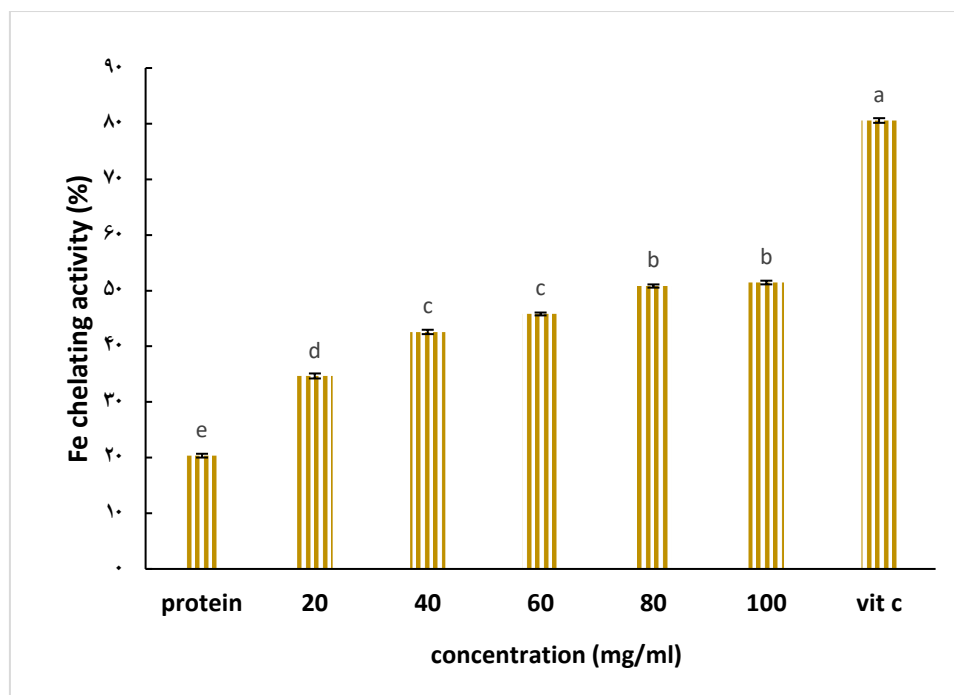


Figure 5- The effect of concentration on Fe chelating activity of flax seed protein hydrolysate

۸۰ تاثیر معنی داری نداشت و افزایش بیشتر غلظت تا ۱۰۰ (mg/ml)، باعث کاهش معنی دار قدرت احیاء کنندگی شد ($p < 0.05$). مقایسه قدرت احیاء کنندگی نمونه‌ها با قدرت آنتی‌اکسیدانی ویتامین ث نشان داد که در تمامی غلظت‌ها پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان قدرت احیاء کنندگی کمتری داشت. به‌طور کلی علت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بذر کتان را می‌توان به رهائش آمینواسیدهایی با قابلیت احیاء کنندگی مانند تریپتوفان، لیزین و متیونین دانست (۵). این نتایج در تطابق با یافته‌های Xie و همکاران (۲۰۰۸)، Cumby و همکاران (۲۰۰۸)، Zhao و همکاران (۲۰۱۲) و Umayaparvathi و همکاران (۲۰۱۴) بود که به ترتیب تاثیر غلظت را بر قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده یونجه، کانولا، برنج و صدف بررسی کردند می‌باشد (۳۷، ۳۹، ۳۱ و ۳۲).

۴-۳- قدرت احیاء کنندگی یون آهن

آزمون قدرت احیاء کنندگی توانایی آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب را بر اساس پتانسیل آن در تبدیل یون Fe^{3+} به Fe^{2+} با اهدای الکترون، بررسی می‌کند. با توجه به شکل ۶، قدرت احیاء کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بذر کتان به‌طور معنی داری بیشتر از قدرت پروتئین هیدرولیز نشده است که این نتیجه نشان از موفقیت آمیز بودن و تاثیر مثبت فرآیند هیدرولیز با آنزیم پانکراتین در رهائش پپتیدهای احیاء کننده و آمینواسیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند تریپتوفان و لیزین دانست (۵). از سوی دیگر افزایش غلظت از ۲۰ (mg/ml) تا ۶۰ (mg/ml)، باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های تولیدی از ۰/۴۵۷ به ۰/۸۵۹ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) شد؛ افزایش غلظت به (mg/ml)

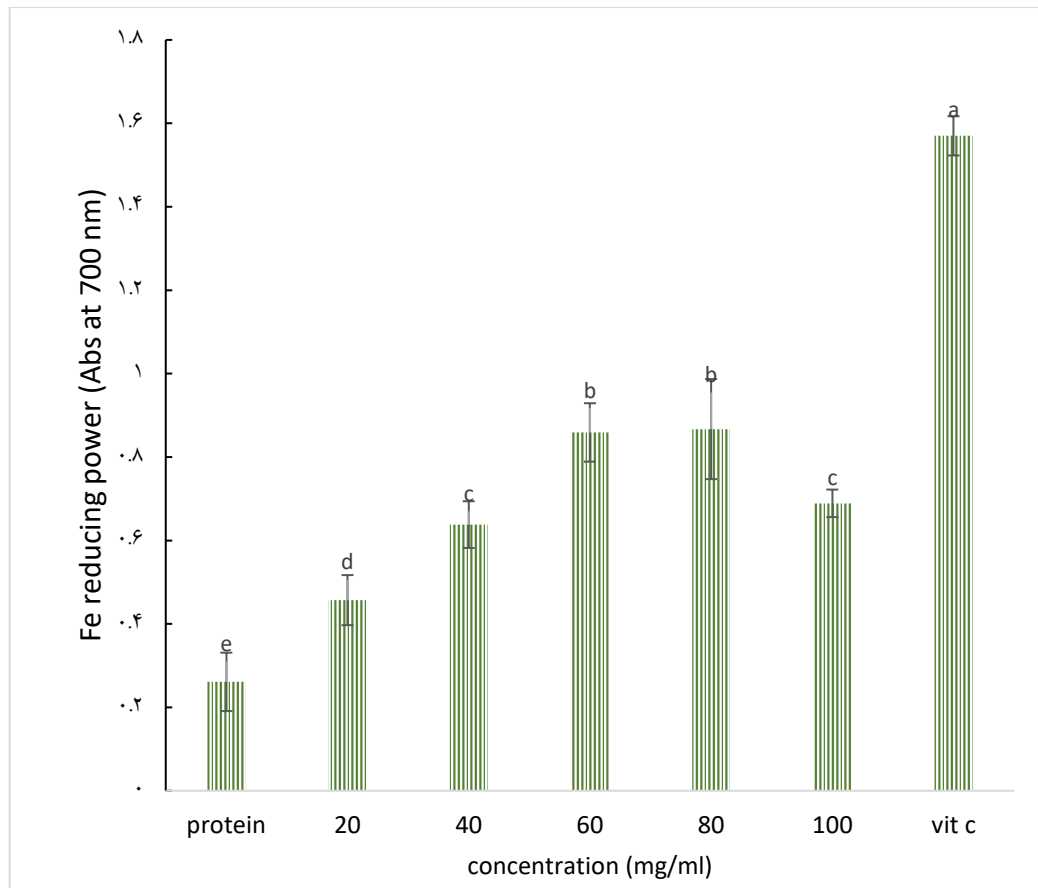


Figure 5- The effect of concentration on Fe reducing power of flax seed protein hydrolysate

به طوریکه با افزایش غلظت از ۲۰ (mg/mL) تا ۱۰۰ (mg/mL) به طوریکه با افزایش غلظت از ۲۰ (mg/mL) تا ۱۰۰ (mg/mL) ۶۰٪ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل و قدرت احیاء کنندگی یون آهن و با افزایش غلظت تا ۸۰ (mg/mL) فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به طور معنی داری افزایش یافت. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش، می توان بیان نمود که پیش تیمار مایکروویو با توان ۵۰۰ وات راهکار بسیار مناسبی برای افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ی بذر کتان است. پروتئین های هیدرولیز شده ی حاصل با توجه به قابلیت مناسب آنتی اکسیدانی پتانسیل کاربرد در فرمولاسیون های مواد غذایی در جهت تولید محصولات فراسودمند و رقابت با آنتی اکسیدان های سنتزی را دارند.

۴- منابع

- [1] Di Meo, S., & Venditti, P. (2020). Evolution of the knowledge of free radicals and other

۳-۵- نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که پیش تیمار مایکروویو با توان ۵۰۰ وات تاثیر مثبت و معنی داری بر فعالیت مهار رادیکال DPPH و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده بذر کتان داشت. به طور کلی خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هیدرولیز آنزیمی به فاکتورهای مختلفی از جمله: نوع و شدت پیش- تیمار اعمال شده، شرایط فرایند هیدرولیز (نوع آنزیم، دما، زمان هیدرولیز و درصد آنزیم)، نوع پروتئین اولیه و ترکیب آمینواسیدی پپتیدهای تولیدی بستگی دارد. در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، شلاته کنندگی یون آهن، احیاء کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل) پروتئین هیدرولیز شده ی بذر کتان وابسته به غلظت بود.

oxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020.

- [2] Villeneuve, P., Bourlieu-Lacanal, C., Durand, E., Lecomte, J., McClements, D. J., & Decker, E. A. (2023). Lipid oxidation in emulsions and bulk oils: A review of the importance of micelles. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(20), 4687-4727.
- [3] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Erfani Moghadam, V., Ghorbani, M., Gholamhosseinpour, A., Raeisi, M. (2023). Evaluation the antioxidant properties of purified bioactive peptides from the wastes of skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) processing, by pepsin and trypsin digestive enzymes. *Journal of Food Science and Technology*, 20 (141):200-222.
- [4] Kaveh, S., Mahoonak, A. S., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2022). Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 182, 114908.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] Karami, Z., Peighambaroust, S. H., Hesari, J., Akbari-Adergani, B., & Andreu, D. (2019). Antioxidant, anticancer and ACE-inhibitory activities of bioactive peptides from wheat germ protein hydrolysates. *Food Bioscience*, 32, 100450.
- [8] Sadeghi Mahoonak, A.R. and Kaveh, S. (2022). Assessment of ACE-inhibitory and Antioxidant Activities of the Peptide Fragments from Pumpkin Seeds. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 17(3), 45-56.
- [9] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K. (2019 a). Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(1).
- [10] Manafi, D.Y.M. and Mazaheri, T.M. (2014). Production of analogue UF white cheese by replacement of milk fat with margarine. *Journal of food research*. 23(4), 545-552.
- [11] Kaveh, S., Gholamhosseinpour, A., Hashemi, S. M. B., Jafarpour, D., Castagnini, J. M., Phimolsiripol, Y., & Barba, F. J. (2023). Recent advances in ultrasound application in fermented and non-fermented dairy products: Antibacterial and bioactive properties. *International Journal of Food Science & Technology*.
- [12] 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.
- [13] 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, 582-591.
- [14] Fadimu, G. J., Gill, H., Farahnaky, A., & Truong, T. (2021). Investigating the impact of ultrasound pretreatment on the physicochemical, structural, and antioxidant properties of lupin protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 14(11), 2004-2019.
- [15] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Erfanimoghaddam, V., Ghorbani, M., Gholamhossein pour, A A, Raeisi, M. (2024). Optimization of the effect of hydrolysis conditions and type of protease on the degree of hydrolysis and antioxidant properties of the protein hydrolysate from the skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) viscera by the response surface methodology. *Journal of Food Science and Technology*. 20 (144): 131-152.
- [16] Prieto, P., Pineda, M. and Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269(2), 337-341.
- [17] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K. (2019 b). Optimization of production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed. *Journal of Food Science and Technology*. 15 (84): 75-88.
- [18] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A. and Sarabandi, K. (2020). The Effect of Solvent Type, Time and Extraction Method on the

- Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Eggplant Peel Extract. *Karafan Quarterly Scientific Journal*, 17(2): 129-141
- [19] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K. (2019 c). Antioxidant properties of fenugreek bioactive peptides prepared with pancreatin enzyme. *Food Engineering Research*, 18(67): 103-122.
- [20] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45(1), 18-24.
- [21] Bakhshabadi, H., Mirzaei, H., Ghodsvali, A., Jafari, S. M., Ziaifar, A. M., & Farzaneh, V. (2017). The effect of microwave pretreatment on some physico-chemical properties and bioactivity of Black cumin seeds' oil. *Industrial crops and products*, 97, 1-9.
- [22] Gohi, B. F. C. A., Du, J., Zeng, H. Y., Cao, X. J., & Zou, K. M. (2019). Microwave pretreatment and enzymolysis optimization of the Lotus seed protein. *Bioengineering*, 6(2), 28.
- [23] Guo, Y., Zhang, T., Jiang, B., Miao, M., & Mu, W. (2014). The effects of an antioxidative pentapeptide derived from chickpea protein hydrolysates on oxidative stress in Caco-2 and HT-29 cell lines. *Journal of Functional Foods*, 7, 719-726.
- [24] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18, 1138-1146.
- [25] Noman, A., Qixing, J., Xu, Y., Abed, S. M., Obadi, M., Ali, A. H., ... & Xia, W. (2020). Effects of ultrasonic, microwave, and combined ultrasonic-microwave pretreatments on the enzymatic hydrolysis process and protein hydrolysate properties obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13292.
- [26] Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*, 102(4), 1233-1240.
- [27] Mazloomi, N., Sadeghi-mahonak, A.R., Ghorbani, M. and Hoshmand, Gh.R. (2019). Determination of optimal production conditions of antioxidant peptides resulting from hydrolysis of orange kernel protein with alkalase enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 16(88): 343-356.
- [28] Yang, T., Sun, S., Lin, Q., Ma, M., Luo, F., & Liu, J. (2013). Effects of Microwave Irradiation Pre-Treatment of Egg White Proteins on Ant Oxidative Activity of Their Hydrolysates Prepared with Pepsin. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 5(7), 936-940.
- [29] Zhang, M., Huang, T. S., & Mu, T. H. (2019). Improvement of thermal, microwave and ultrasonication pretreatment on the production of antioxidant peptides from sweet potato protein via in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Food Science & Technology*, 54(7), 2338-2345.
- [30] Saito, K., Jin, D. H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., & Nokihara, K. (2003). Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(12), 3668-3674.
- [31] Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X. D., Zhong, H., Wang, S., ... & Zhou, Q. (2012). Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chemistry*, 134(3), 1360-1367.
- [32] Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G., & Balasubramanian, T. (2014). Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), 343-353.
- [33] 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.
- [34] Bougateg, 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.
- [35] Afanas'ev, I. B., Derozhko, A. I., Brodskii, A. V., Kostyuk, V. A., & Potapovitch, A. I. (1989). Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochemical pharmacology*, 38(11), 1763-1769.
- [36] Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*, 16(11), 1306-1314.
- [37] Xie, Z., Huang, J., Xu, X., & Jin, Z. (2008). Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*, 111(2), 370-376.
- [38] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). 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*, 102(4), 1317-1327.
- [39] Cumby, N., Zhong, Y., Naczek, M., & Shahidi, F. (2008). Antioxidant activity and water-holding capacity of canola protein hydrolysates. *Food chemistry*, 109(1), 144-148.



Evaluation the effect of microwave pretreatment on the antioxidant properties of flaxseed protein hydrolysate

Nader sanadgol¹, Seyed Hossein Hosseini Qaboos^{2*}, Alireza Sadeghi Mahoonak³

1- M.Sc student, Department of Food Science and Engineering, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

2- Assistant Professor, Food Science and Technology Research Center of east Golestan, Azadshahr Branch, Islamic Azad University, Azadshahr, Iran

3- Professor, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2024/1/1

Accepted: 2024/2/3

Keywords:

antioxidant,

Flax seed protein,

pancreatin,

protein hydrolysate,

microwave.

DOI: 10.22034/FSCT.21.148.190.

*Corresponding Author E-Mail:

Hosseinighaboos@yahoo.com

ABSTRACT

In this study, the effect of microwave pretreatment at the power of 500 and 900 (W) on the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity) of flaxseed protein hydrolysate was investigated in the period of 30-210 minutes. In the next step, the effect of different concentrations (20-100 mg/ml) of the optimum treatment on the antioxidant properties (total antioxidant capacity, Fe reducing power, DPPH radical scavenging activity and Fe chelating activity) was investigated and was compared with the antioxidant capacity of vitamin C as a synthetic antioxidant and unhydrolyzed flaxseed protein. The results showed that microwave pretreatment at a power of 500 W significantly increased the antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity) of flaxseed protein hydrolysate, but higher microwave power (900 W) led to reduction of antioxidant activity in comparison to the sample without pretreatment or the sample with microwave pretreatment with a power of 500 W. The sample with microwave pretreatment with a power of 500 W and hydrolysis time of 180 minutes was selected as the optimum treatment with the highest total antioxidant capacity and DPPH radical scavenging activity. Investigating the effect of concentration on the antioxidant properties of hydrolyzed protein showed that the highest DPPH radical scavenging activity (52.7 %), total antioxidant capacity (1.35 absorbance at 695 nm), Fe reducing power (0.859 absorbance at 700 nm) were achieved at the concentration of 60 (mg/ml) and the highest Fe chelating activity (50.83%) was obtained at the concentration of 80 (mg/ml). As a result, the flaxseed protein hydrolysate with considerable antioxidant capacity, can be used in the production of functional food products, nutritional supplements for athletes and the elderly.