



تأثیر پیش تیمار مایکروویو بر زمان هیدرولیز پروتئین قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*) به وسیله آنزیم تریپسین جهت تولید

پپتیدهای آنتی اکسیدان

آیسان ایزانلو^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۹

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۱۰

کلمات کلیدی:

قارچ خوراکی دکمه‌ای،

هیدرولیز آنزیمی،

ویژگی‌های آنتی اکسیدانی،

پیش تیمار مایکروویو

پپتیدهای زیست فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری بر سلامتی می‌شود. استفاده ترکیبی از پیش تیمار و هیدرولیز آنزیمی باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌شود. پیش تیمار با مایکروویو یک رویکرد شناخته شده برای افزایش دسترسی به پیوندهای حساس به هیدرولیز است که مکان‌های برش آنزیم و قرار گرفتن در معرض پروتئازها را تسهیل می‌کند. هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تأثیر پیش تیمار مایکروویو بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به وسیله آنزیم تریپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌باشد. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ دکمه‌ای با استفاده از آنزیم تریپسین بدون پیش تیمار و با پیش تیمار مایکروویو در توان‌های مختلف ۱۲۰، ۲۰۰ و ۲۸۰ وات صورت گرفت. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی نمونه‌ها (فعالیت مهار رادیکال ^۱DPPH، قدرت شلاته‌کنندگی آهن، قدرت احیاءکنندگی یون آهن، فعالیت آنتی اکسیدانی کل) ارزیابی شدند. نتایج نشان داد که در غالب آزمون‌های صورت گرفته، پیش تیمار با مایکروویو موجب کاهش زمان دستیابی و افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی نمونه‌ها گردید به طوری که نمونه‌های پیش تیمار شده مایکروویو با توان ۱۲۰ وات نسبت به نمونه‌های تیمار شده با توان ۲۰۰ و ۲۸۰ وات و نمونه‌های بدون پیش تیمار از قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند. در کلیه آزمون‌های آنتی اکسیدانی نمونه پیش تیمار شده با مایکروویو با توان ۱۲۰ و در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه عملکرد بالاتری از خود نشان داد و بنابراین به عنوان تیمار مناسب در نظر گرفته شد. بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که استفاده از پیش تیمار مایکروویو با توان ۱۲۰ وات موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی اکسیدانی بالاتر می‌گردد و در نتیجه موجب افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد.

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.35

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.139.3.7

* مسئول مکاتبات:

sadeghiaz@gau.ac.ir

۱-مقدمه

ترکیبات آنتی اکسیدانی با جلوگیری از واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون و یا به دام اندازی رادیکال های آزاد، از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری یا باعث تاخیر آن می شوند [۱]. آنتی اکسیدان های سنتزی کاربرد زیادی در صنعت مواد غذایی دارند، اما افزایش آگاهی مصرف کنندگان و نگرانی ها در رابطه با اثرات نامطلوب آنتی اکسیدان های سنتزی باعث افزایش توجه محققین به آنتی اکسیدان های طبیعی شده است [۲]. پپتیدهای زیست فعال توالی هایی با ۲۰-۳ اسید آمینه هستند که از شکسته شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می شوند [۳]. پپتیدهای زیست فعال در واقع بخش های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری بر سلامتی می شود. البته پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین والد به شکل غیرفعال هستند و زمانی که به صورت توالی پپتیدی آزاد می شوند، می توانند اثرات سلامتی بخش خود را بروز دهند [۴]. این ترکیبات به صورت درون زیست توسط آنزیم های دستگاه گوارش و به صورت برون زیست، از طریق هیدرولیز و با استفاده از آنزیم های پروتئولیتیک در شرایط آزمایشگاهی و همچنین در طول فراوری مواد غذایی (پختن، رسیدن و تخمیر) تولید می گردند. رایج ترین روش تولید پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین ها است. اکثر پپتیدهای زیست فعال شناخته شده با استفاده از آنزیم های دستگاه گوارش، معمولاً پپسین و تریپسین تولید شده اند. همچنین آنزیم های دیگری نظیر آلکالاز، کیموتریپسین، پانکراتین و پپسین و آنزیم های حاصل از منابع قارچی و باکتریایی برای تولید پپتیدهای زیست فعال به کار رفته اند [۵]. ویژگی های آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از منابع پروتئینی مختلف مانند پروتئین

سویا [۶]، پروتئین آب پنیر [۷]، سفیده تخم مرغ [۸]، تخم کتان [۹]، بادام زمینی [۱۰]، و شاه دانه [۱۱]، قبلا مورد بررسی قرار گرفته است. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده به عوامل زیادی از جمله نوع سوبسترا، شرایط هیدرولیز (دما، زمان، pH)، نوع آنزیم و نوع فرآیند پیش تیمار پروتئین بستگی دارد. فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می باشد [۱۲]. در نتیجه امروزه از روش های مختلف نظیر امواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا و غیره برای پیش تیمار پروتئین و رفع مشکلات فوق استفاده می شود [۱۳]. علاوه بر این کاربرد پیش تیمار باعث بهبود دسترسی آنزیم به نقاط شکست سوبسترا و افزایش درجه هیدرولیز می گردد [۱۴]. استفاده ترکیبی از پیش تیمار و هیدرولیز آنزیمی باعث ایجاد تغییراتی در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی پروتئین های هیدرولیز شده می شود [۱۵]. هیدرولیز آنزیمی پروتئین ها بعد از پیش تیمار با امواج مایکروویو، تکنیک جدیدی است که به دلیل تأثیرگذاری بر پروتئین ها در زمان کوتاه برای تسریع هیدرولیز پروتئین و بهبود خواص عملکردی آنها استفاده می شود. استفاده از فناوری مایکروویو در صنایع غذایی اخیرا مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. پیش تیمار مایکروویو روشی تمیز، سریع، راحت و مقرون به صرفه برای گرم کردن می باشد، که می تواند با قطبی کردن درشت مولکول ها، اثر گرمایی ایجاد کند و در نتیجه با قطب های میدان الکترومغناطیسی همسو شده، که ممکن است باعث شکسته شدن پیوندهای هیدروژنی شود [۱۶]. امواج مایکروویو باعث نوسان مولکول های دو قطبی نظیر مولکول های آب شده و نوسان مولکول های آب در ماده غذایی، باعث اصطکاک بین مولکول ها و ایجاد گرما شده، در نتیجه تمام قسمت های ماده غذایی به طور یکنواخت، انرژی مایکروویو را جذب کرده و گرم می شوند و باعث کاهش رطوبت اولیه ماده در مدت

زمان متوالی می‌گردد [۱۷]. همچنین پیش تیمار مایکروویو اخیراً به عنوان یک فناوری مناسب شناخته شده است که می‌تواند با روش‌های هیدرولیز بیوشیمیایی تلفیق شده و منجر به تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی با عملکرد و فعالیت زیستی بهتر در زمان کوتاه‌تر و هزینه کمتر نسبت به روش‌های بیوشیمیایی گردد. گرمایش مایکروویو عامل تغییرات ساختاری پروتئین‌ها می‌باشد به طوری که پس از جذب انرژی مایکروویو منجر به تغییر در ساختار ثانویه و سوم پروتئین‌ها می‌شود [۱۸].

براساس داده‌های ارائه شده توسط انستیتو مهندسين الكتريكي و الكترونیک (IEEE)^۱ مشخص شده که پروتئین‌ها و پپتیدها ثابت‌دی‌الکتریک بالایی دارند در نتیجه امواج مایکروویو می‌توانند تاثیر قابل توجهی بر روی ساختار آن‌ها داشته باشند [۱۹]. اسیدهای آمینه، پروتئین‌ها و پپتیدها مولکول‌های باردار هستند که دارای ویژگی دو قطبی می‌باشند. یک پروتئین مرکب از تعداد زیادی بخش‌های دو قطبی است که همگی آن‌ها در ویژگی کلی دو قطبی پروتئین مشارکت می‌کنند. علاوه بر این، این ویژگی تحت تاثیر پوشش هیدراته مولکول قرار می‌گیرد. در نتیجه این امر قابل توجه است که انرژی الکترومغناطیسی باعث افزایش نیروی چرخشی بر روی اتصالاتی که بخش‌های دو قطبی را به اتم‌های مجاور متصل می‌کنند، می‌گردد. در نتیجه این امر باعث کاهش انرژی مورد نیاز برای شکستن پیوندها و افزایش کاربرد این فرآیندها جهت هیدرولیز می‌گردد [۲۰]. 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 به باز شدن ساختارهای پروتئینی می‌شود [۲۱]. در پروتئین‌های غذایی، حرارت دادن با مایکروویو می‌تواند برای کمک به پروتئولیز آنزیمی، کوتاه کردن زمان

هیدرولیز و در عین حال حفظ کیفیت اسید آمینه، مفید باشد. گزارشات مختلفی در زمینه استفاده از اشعه مایکروویو همراه با هیدرولیز آنزیمی جهت کاهش حساسیت‌زایی و بهبود زیست‌فعالی پپتیدها وجود دارد [۲۲]. پیش تیمار با مایکروویو نیز یک رویکرد 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 امر منجر به تولید هیدرولیزات با فعالیت‌های زیستی مناسب می‌شود [۲۳]. آلکو و همکاران (۲۰۱۴) مطالعه‌ای جهت تعیین اثرات پیش تیمارهای مایکروویو، فراصوت و حرارت‌دهی معمولی بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کنسانتره پروتئینی شیر هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های گوارشی (پسین + تریپسین) صورت دادند. اغلب پیش تیمارها به مقدار قابل توجهی ظرفیت مهار رادیکال آزاد و همچنین ظرفیت احیا یون آهن هیدرولیز شده تولیدی را افزایش دادند. از پیش تیمار مایکروویو برای بهبود فعالیت زیستی پروتئین‌های آب‌پنیر نیز استفاده شده است. به طور معمول پیش تیمارها باعث افزایش نرخ هیدرولیز پروتئین می‌شوند که این امر به دلیل باز شدن ساختار پروتئین در ارتباط با پیش تیمار است، از این رو انتظار می‌رود درجه هیدرولیز بالا در نمونه‌های پیش تیمار شده منجر به ایجاد ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا در محصول نهایی گردد [۲۴]. قارچ به عنوان یکی از قدیمی‌ترین مواد غذایی با ارزش غذایی مناسب در نظر گرفته می‌شود، و ارزش غذایی آن‌ها قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می‌باشد. قارچ منبع مناسبی از اسیدهای آمینه ضروری متعدد، پروتئین‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و غیره است و به همین دلیل مصرف آن رو به افزایش است. یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم قارچ پروتئین است، در نتیجه منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشد [۲۵]. هدف از این

۲-۴- تولید پروتئین هیدرولیز شده

جهت انجام هیدرولیز با پپسین از روش پایسانساک و همکاران [۲۶] استفاده شد. ۵۰ گرم پودر قارچ در بالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۸) مخلوط گردید. سپس به منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه با نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ درصد (برمبنای آزمون‌های اولیه) و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در چهار وضعیت صورت گرفت. حالت اول نمونه بدون پیش‌ تیمار میکروویو، حالت دوم همراه با پیش‌ تیمار میکروویو با توان ۲۸۰ وات و حالت سوم همراه با پیش‌ تیمار میکروویو با توان ۲۰۰ وات و حالت چهارم همراه با پیش‌ تیمار میکروویو با توان ۱۲۰ وات توسط میکروویو (MODEL NO: GMO1894-20LN) به ترتیب در زمان‌های ۳۸، ۵۴ و ۹۰ ثانیه قبل از افزودن آنزیم انجام گرفت (لازم به ذکر است که انتخاب توان و زمان میکروویو بر مبنای آزمون‌های اولیه و برمبنای رسیدن به دمای ثابت ۸۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفت). پس از اتمام زمان هیدرولیز به منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد تا آنزیم غیرفعال شود. هریمار به طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و محلول رویی حاصل با خشک‌کن انجمادی برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده خشک گردید. سپس پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. در مرحله بعد قابلیت آنتی-اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف توسط روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، شلاته کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل اندازه‌گیری گردید.

پژوهش بررسی اثر و همچنین تاثیر پیش‌ تیمار میکروویو بر زمان هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به وسیله آنزیم تریپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

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

۲-۲-آماده‌سازی قارچ خوراکی

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 درجه سانتی‌گراد در آن 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 پلی-پروپیلنی بسته‌بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند [۲۶].

۲-۳-اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی با استفاده از روش AOAC انجام شد (Methods 934.01, 988.05, 920.39, 942.05). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، با استفاده از دستگاه کلدال (ساخت آلمان، بهر، S3)، میزان چربی با استفاده از دستگاه سوکسله، میزان خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (ساخت آلمان، نابرت، FX118-30) و میزان رطوبت با قرار دادن در آن ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت، تعیین شد [۲۷].

تهیه‌ی نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی است [۲۹].

۱-۴-۲- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) حل شدند. سپس، ۱/۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی لیتر از محلول اتانول (۰/۱۵ میکرومول) DPPH مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد [۲۸]. درصد مهار رادیکال DPPH با استفاده از معادله ۱ محاسبه گردید: (۱)

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

A_{blank} جذب نمونه کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می شود) و A_{sample} جذب نمونه می باشد.

۲-۴-۲- قدرت احیاکنندگی آهن

ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) حل شدند. سپس ۱ میلی لیتر از هر نمونه با ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. پس از آن، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به مخلوط اضافه و ۱۰ دقیقه با سرعت ۲۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر 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 آب مقطر به جای نمونه برای

۳-۴-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ابتدا ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار و آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار) در لوله پلاستیکی کوچک (اپندورف) ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. جذب بیشتر نشان دهنده ی ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل بیشتر است [۳۰].

۴-۴-۲- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

ابتدا، ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر در غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر با ۰/۰۵ میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (۲ میلی مولار) و ۱/۸۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵ میلی مولار) افزوده و مخلوط به شدت هم زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد [۳۱]. فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با استفاده از معادله ۲ محاسبه شد: (۲)

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی یون آهن} (\%) = \left[\frac{A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}}}{A_{\text{blank}}} \right] \times 100$$

A_{blank} جذب نمونه کنترل (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول مخلوط می شود) و A_{sample} جذب نمونه می باشد.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

Excel 2013 و رسم نمودارها نیز با نرم افزار $P < 0.05$ انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ در جدول ۱ آورده شده است.

در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) بر ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی قارچ خوراکی و همچنین تاثیر پیش‌تیمار مایکروویو بر ویژگی‌های آنتی-اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه آزمون‌ها در ۳ تکرار و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن جهت بررسی معنی‌دار بودن متغیر در

Table 1 Chemical composition of mushroom powder

Chemical compounds	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 Diff.	55.92 ± 0.15

*Data reported as dry basis

*Mena ± three replications

DPPH، رادیکال آزاد محلول در چربی است که دارای ماکزیمم جذب در ۵۱۷ نانومتر است و پس از دریافت هیدروژن از یک ترکیب آنتی‌اکسیدان به ترکیبی پایدار تبدیل می‌شود و جذب آن کاهش می‌یابد [۳۴ و ۳۵]. رادیکال آزاد DPPH، به‌طور گسترده‌ای برای ارزیابی ترکیبات احیاکننده مورد استفاده قرار گرفته است. وجود یک ماده اهداکننده پروتون به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان منجر به مهار رادیکال‌ها و کاهش جذب می‌شود [۳۶].

در شکل ۱ قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار مایکروویو (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۸۰ وات (ب) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۰۰ وات (ج) پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با

۳-۲- تاثیر زمان هیدرولیز و پیش‌تیمار مایکروویو بر روی

مهار رادیکال آزاد DPPH

وجود بیش از حد رادیکال‌های آزاد در بدن می‌تواند اسیدهای نوکلئیک، پروتئین‌ها و سایر ماکرومولکول‌ها را به‌صورت اکسیداتیو تحت تاثیر قرار داده و ساختار و عملکرد سلولی را تغییر دهد. همچنین استرس ناشی از رادیکال‌های آزاد یکی از عوامل اصلی مرگ سلولی و آسیب بافتی است. اگر رادیکال‌های آزاد به‌موقع حذف نشوند می‌تواند در موجودات زنده باعث پیری، بیماری‌های قلبی عروقی و سرطان شوند [۳۲]. مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌توانند رادیکال‌های آزاد را در بدن مهار یا از بین ببرند، آسیب اکسیداتیو را در بدن انسان کاهش داده و نقش مهمی در پیشگیری از بیماری‌ها و حفظ سلامتی ایفا می‌کنند [۳۳].

توان ۱۲۰ وات (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

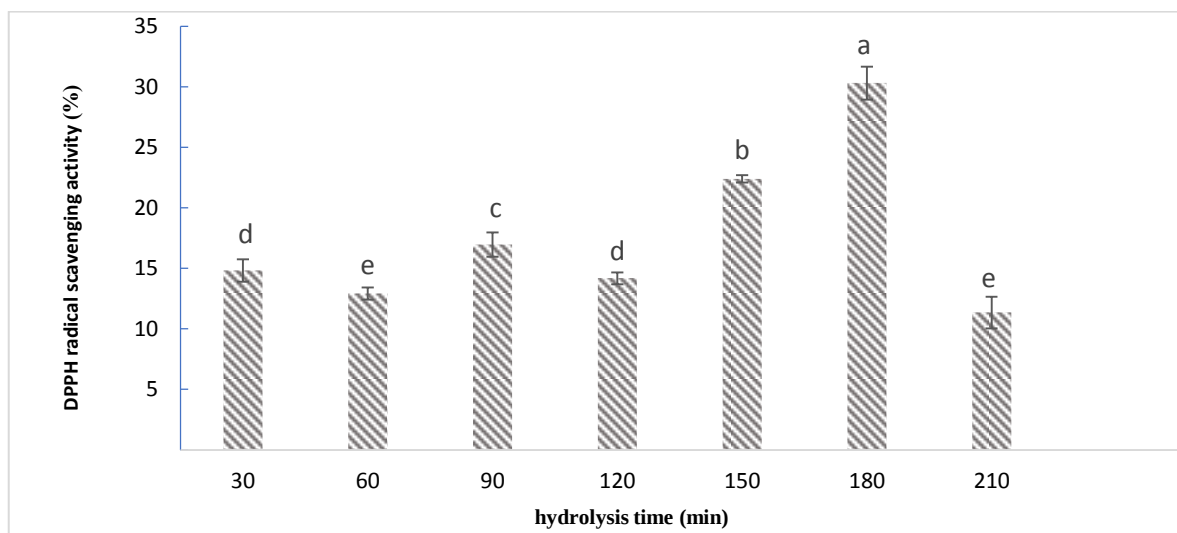


Figure 1(a)

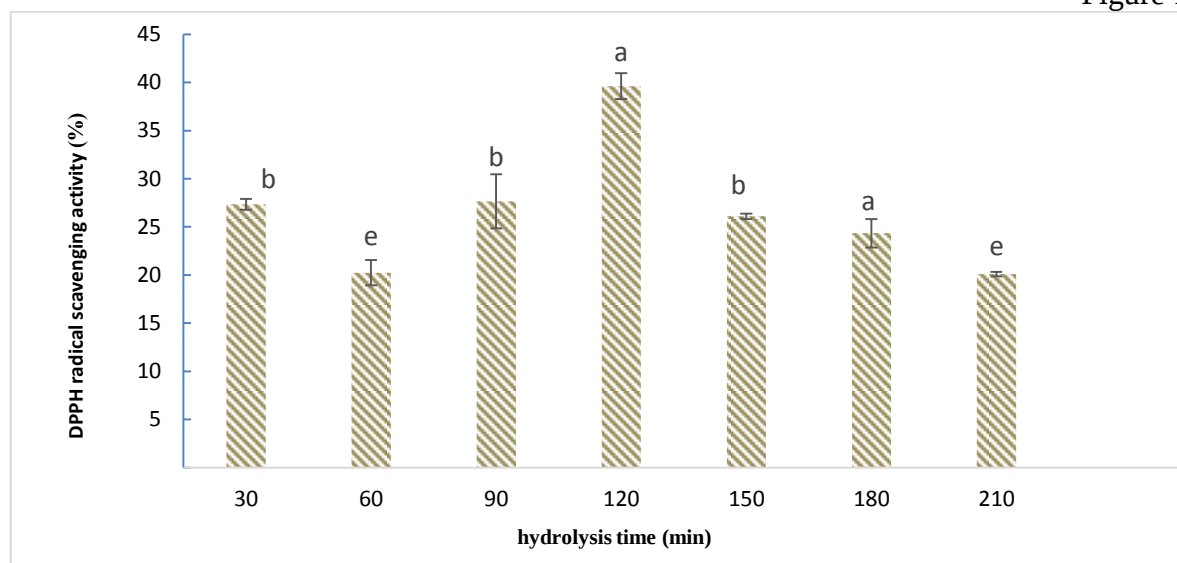


Figure 1(b)

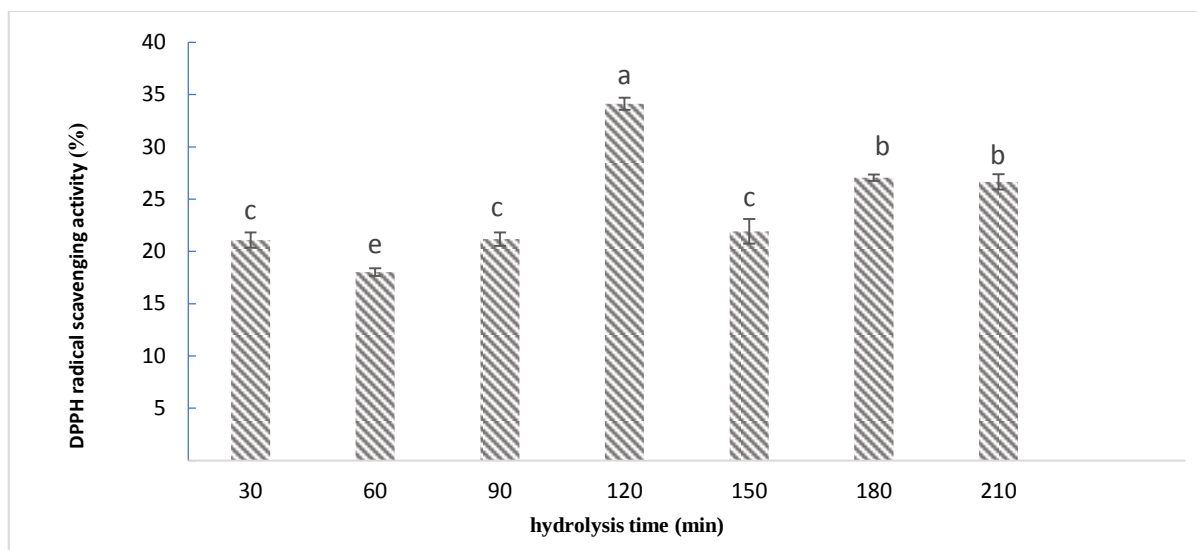


Figure 1(c)

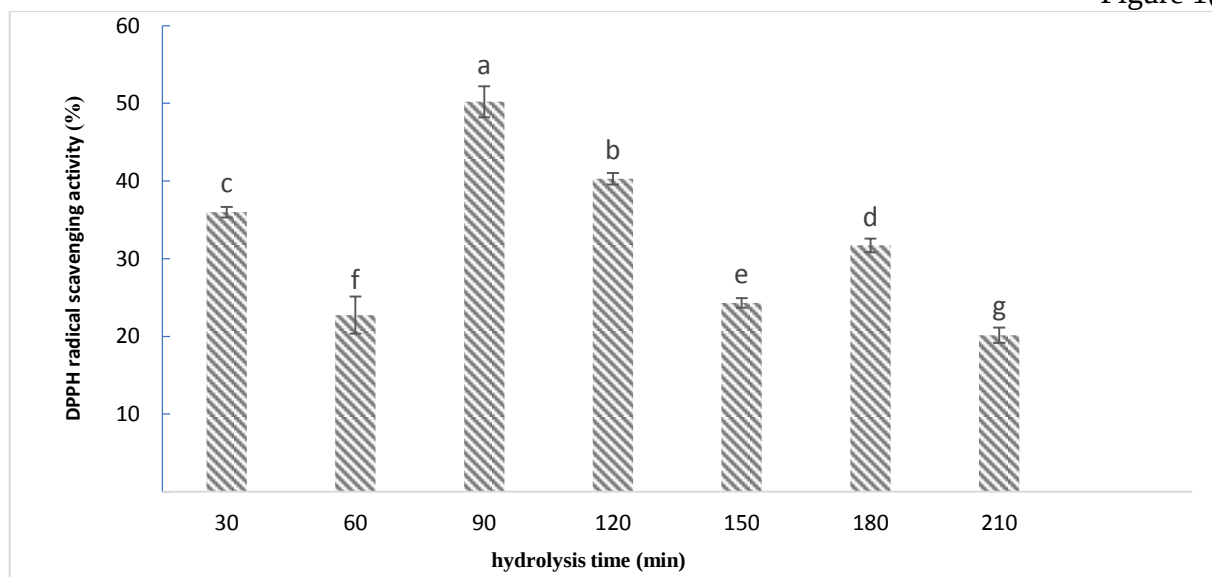


Figure 1(d)

Figure 1- DPPH free radical scavenging activity of hydrolyzed protein samples without microwave pretreatment (1a), hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power of 280 W (1b), protein hydrolyzed with microwave pretreatment at power of 200 W (1c) and protein hydrolyzed by microwave pretreatment at power of 120 W (1d) using different hydrolysis times. The same letters statistically indicate no significant difference ($P < 0.05$).

پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می باشد.

بسیاری از محققین گزارش نمودند که با پیشرفت هیدرولیز پپتیدهای با وزن مولکولی پایین به وجود می آیند که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی هستند [۳۷]. مشکین فر و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که فرایند هیدرولیز باعث آزاد شدن پپتیدهای آنتی اکسیدان از پروتئین می شود اما

باتوجه به شکل الف بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار نشده در زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه به میزان ۳۰/۳۱ درصد مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قابلیت مهار رادیکال DPPH افزایش و سپس کاهش و مجدداً افزایش یافت که دلیل این افزایش

افزایش زمان هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم منجر به شکستن تعدادی از پپتیدهای آنتی اکسیدان تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می گردد در نتیجه از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می شود. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تاثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا شده است در نتیجه قابلیت آنتی اکسیدانی تولیدی در مراحل بعدی کاهش یافته است [۳۸].

در شکل ۱ ب، ج و د به ترتیب قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار شده با میکروویو با توان های ۲۸۰، ۲۰۰، و ۱۲۰ وات تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار شده با میکروویو با توان ۲۸۰ وات در زمان ۱۲۰ دقیقه به میزان ۳۹/۶۱ درصد مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه های تیمار نشده مشخص می شود که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان های ابتدایی هیدرولیز در نمونه های تیمار شده با میکروویو با توان ۲۸۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه های بدون پیش تیمار میکروویو و نمونه های تیمار شده با میکروویو ۲۸۰ وات در زمان های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب (۱۲/۹۱ و ۱۶/۹۵ درصد) و (۲۰/۲۳ و ۲۷/۶۵ درصد) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی نمونه های تیمار شده توسط میکروویو در زمان های ابتدایی هیدرولیز بود. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار نشده و تیمار شده توسط میکروویو ۲۸۰ وات به ترتیب ۳۰/۳۰ و ۳۹/۶۱ مشاهده شد که نشان از افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تحت تاثیر تیمار میکروویو بود. با توجه به شکل ۱ ج بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار شده با میکروویو با توان ۲۰۰ وات در زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به میزان ۳۴/۱۲ درصد مشاهده شد. در اغلب زمان های هیدرولیز، قابلیت مهار

رادیکال آزاد DPPH در تیمار میکروویو با توان ۲۰۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده و پایین تر از تیمار شده با میکروویو با توان های ۲۸۰ وات و ۱۲۰ وات بود. با توجه به شکل ۱ د بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه های تیمار شده با میکروویو با توان ۱۲۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۵۰/۲۱ درصد مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با نتایج مربوط به نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار میکروویو مشخص می شود که استفاده از پیش تیمار میکروویو باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تمامی زمان های هیدرولیز گردید. در اغلب زمان های هیدرولیز، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار میکروویو با توان ۱۲۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده و تیمار شده با میکروویو با توان های ۲۸۰ وات و ۲۰۰ وات بود. پژوهشگران نشان داده اند که پیش تیمار با میکروویو می تواند هیدرولیز پروتئین را تقویت کند و فعالیت بیولوژیکی پروتئین را بهبود ببخشد. پس از تیمار میکروویو، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS^۱ دانه چیا در مقایسه با شاهد به ترتیب ۳۵/۱۳ و ۸/۶۱ درصد افزایش یافته است [۳۹]. در تحقیق اولکو و همکاران (۲۰۱۴)، فعالیت ممانعت کنندگی آنزیم ACE در نمونه های پیش تیمار شده با میکروویو کمتر از نمونه های تیمار شده با فراصوت گزارش شد [۴۰]. وانگ و همکاران گزارش کردند که با پیش تیمار میکروویو، ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش و توانایی پروتئین باکویت تارتاری جوانه زده جهت از بین بردن رادیکال های آزاد به طور قابل توجهی بهبود یافت، که ممکن است، دلیل این باشد که تحریک برونزا می تواند هیدرولیز پروتئین باکویت تارتاری جوانه زده را افزایش دهد و ثبات ساختار پروتئین کاهش می یابد که این امر منجر به انعطاف پذیری زنجیره ها می شود، زنجیره پلی-پپتیدی نیز گسترش می یابد، و به راحتی به پلی پپتیدهای با

1- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)

تبدیل کنند [۴۳]. ارزیابی فسفومولیدن یک روش کمی برای بررسی قدرت آنتی اکسیدانی محلول در آب و محلول در چربی (قدرت آنتی اکسیدانی کل) می باشد و بر مبنای احیاء مولیدن ۶ ظرفیتی به مولیدن ۵ ظرفیتی می باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیدن در محیط اسیدی همراه است [۴۴]. به طور کلی پژوهش های قبلی نشان داد که پتیدها نسبت به پروتئین های اصلی خود فعالیت های آنتی اکسیدانی بهتری دارند، احتمالاً دلیل آن افزایش دسترسی زنجیره عملکردی جانبی به گونه های فعال و پیوندهای پپتیدی غنی از الکترون تولید شده توسط هیدرولیز آنزیمی می باشد [۴۵].

در شکل ۲ ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار مایکروویو (۲الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۸۰ وات (۲ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۰۰ وات (۲ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۱۲۰ وات (۲د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

اندازه کوچکتر شکسته و جداشدن یا غنی سازی ترکیبات اهداکننده الکترون در هیدرولیز آنزیمی حاصل می تواند به اتمام الکترون در واکنش زنجیره ای رادیکال آزاد کمک نماید [۴۱]. تحقیقات نشان داده اند که زمان هیدرولیز و ویژگی آنزیم ها ممکن است بر فعالیت مهار DPPH هیدرولیزها تأثیر بگذارد و همچنین، هیدرولیزهای با وزن مولکولی کم (۱۰۰۰-۳۰۰۰ دالتون) فعالیت مهار بالاتری نسبت به هیدرولیزهای با وزن مولکولی بالا دارند. مطالعه دیگری نشان داده است که پیش تیمار با مایکروویو می تواند هیدرولیز پروتئین را تقویت کند و فعالیت بیولوژیکی پروتئین را بهبود بخشد [۴۲].

۳-۳- تاثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار مایکروویو بر روی ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل روشی برای ارزیابی ظرفیت آنتی-اکسیدانی ترکیبات محلول در آب و محلول در چربی است. ترکیبات با فعالیت الکترون دهی می توانند زنجیره رادیکالی را پایان داده و رادیکال آزاد فعال را به محصولات پایدارتر

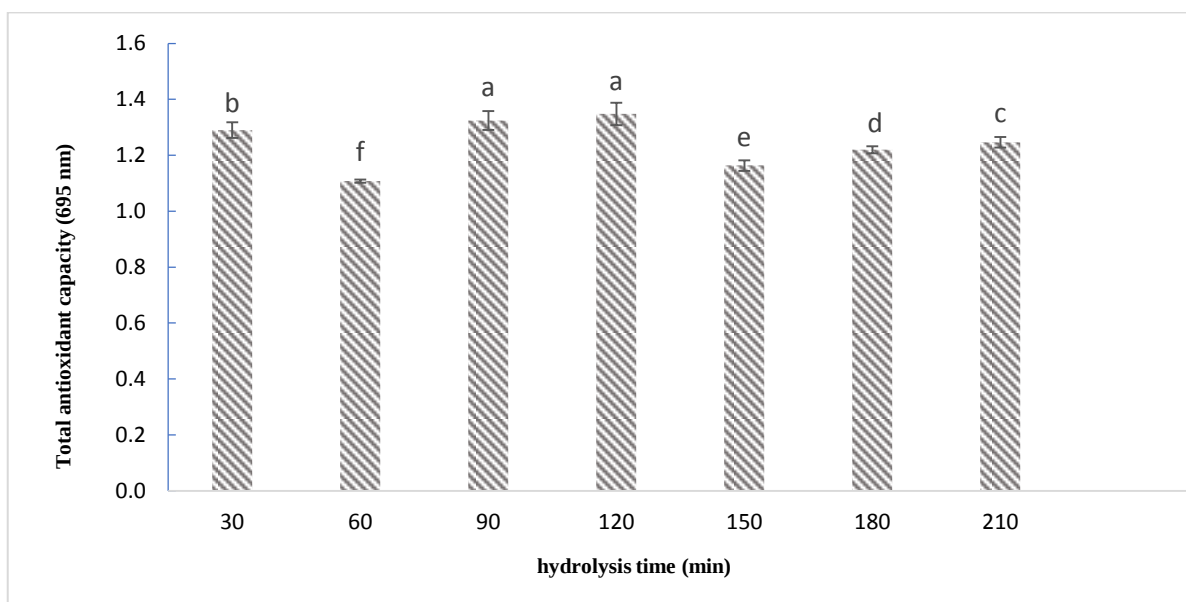


Figure 2(a)

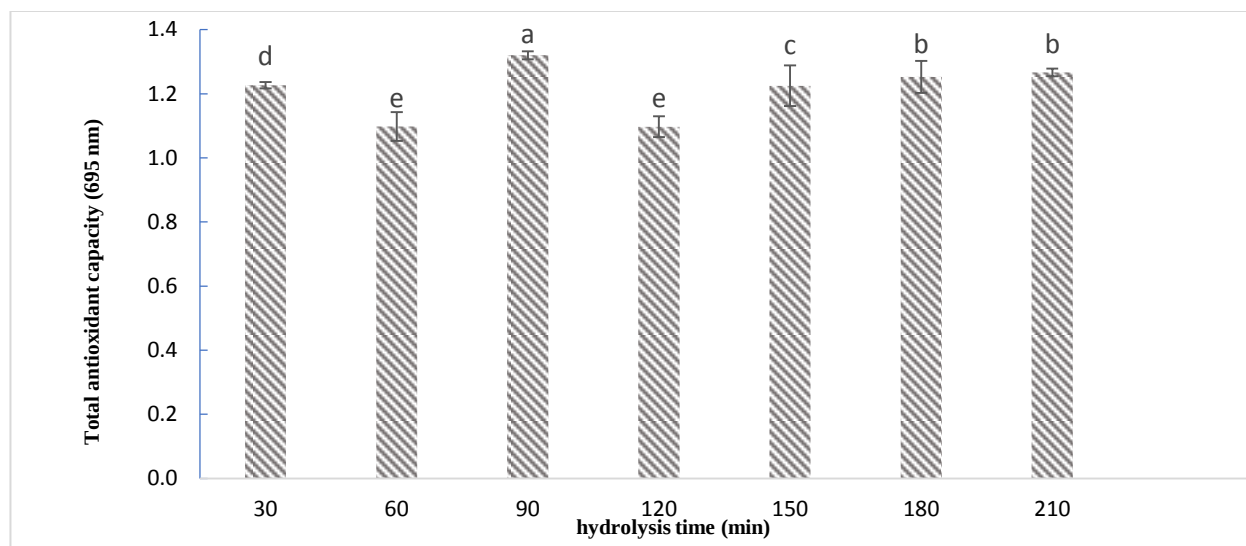


Figure 2(b)

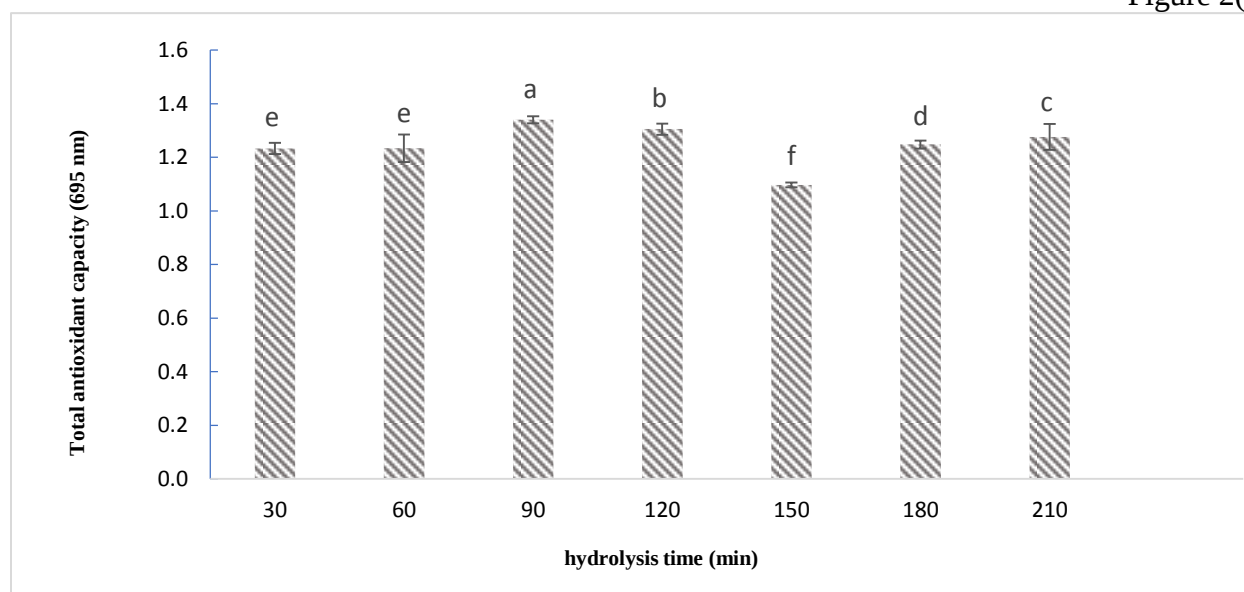


Figure 2(c)

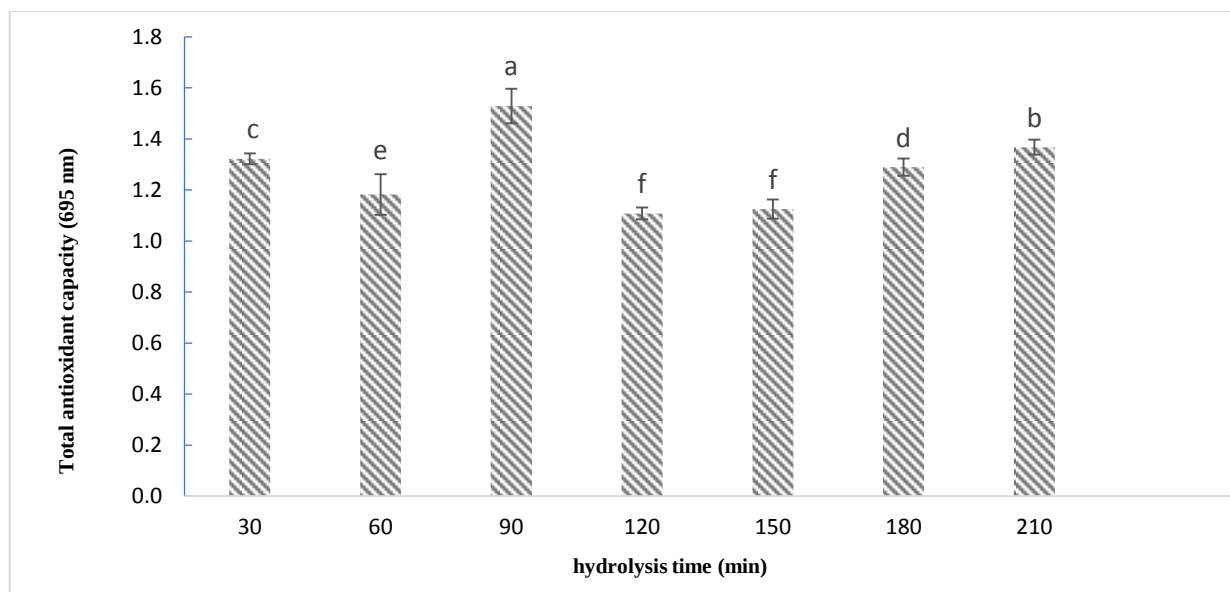


Figure 2(d)

Figure 2- Total antioxidant capacity in hydrolyzed protein samples without microwave pretreatment (2a), hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power 280 W (2b) hydrolyzed protein with microwave pretreatment at of power 200 W (2c) and hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power of 120 W (2c) using different hydrolysis times. The same letters statistically indicate no significant difference ($P < 0.05$).

میزان ۱/۳۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان‌های انتهایی هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به‌طوری که مقادیر آن برای نمونه‌های بدون پیش‌تیمار مایکروویو و نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو ۲۸۰ وات در زمان‌های ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه میزان جذب در ۶۹۵ نانومتر به ترتیب (۱/۲۲ و ۱/۲۴) و (۱/۲۵ و ۱/۲۶) بود. همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط مایکروویو با توان ۲۸۰ وات به ترتیب ۱/۳۴ و ۱/۳۲ مشاهده شد که نشان از کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بود. با توجه به شکل ۲ ج بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۰۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۱/۳۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در تیمار مایکروویو

با توجه به شکل ۲ الف بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار نشده در زمان‌های هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به میزان ۱/۳۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز در زمان ۶۰ دقیقه ابتدا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل کاهش و سپس افزایش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد. گزارش شده است که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، باعث افزایش آزادسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهی می‌شود، که این پپتیدها می‌توانند رادیکال‌های آزاد را به ترکیباتی پایدار تبدیل کنند، در نتیجه با افزایش مدت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌ها افزایش یافته است [۴۳، ۴۴].

در شکل ۲ ب، ج و د به ترتیب ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو با توان‌های ۲۸۰، ۲۰۰ و ۱۲۰ وات تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات در زمان ۹۰ دقیقه به

ژانگ و وانگ (۲۰۰۸) گزارش کردند که استفاده از انرژی مایکروویو در توان ۶۰۰ وات برای ۲ دقیقه حلالیت، امولسیون شدن و پایداری کنسانتره پروتئین سویا را به- ترتیب ۳۲/۱۵، ۵۸/۸۷ و ۵۶/۵۴ درصد افزایش داد.

۳-۴- تاثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار مایکروویو بر روی قدرت احیاء کنندگی یون آهن

آزمون قدرت احیاء کنندگی آهن برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات بر اساس توانایی آنها در اهدای الکترون و در نتیجه احیای یون Fe^{3+} به Fe^{2+} و همچنین در جهت سنجش قابلیت الکترون دهنده گی ترکیبات آنتی- اکسیدانی به کار می رود. مطالعات مختلفی نشان دادند که ارتباط مستقیمی بین قدرت احیاء کنندگی و فعالیت آنتی- اکسیدانی ترکیبات زیست فعال وجود دارد [۴۸].

در شکل ۳ قدرت احیاء کنندگی یون آهن نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار مایکروویو (۳الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۸۰ وات (۳ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۲۰۰ وات (۳ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار مایکروویو با توان ۱۲۰ وات (۳د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

باتوان ۲۰۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده و تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات و پایین تر از نمونه های تیمار شده با مایکروویو با توان ۱۲۰ وات بود. با توجه به شکل ۲ بالاترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه- های تیمار شده با مایکروویو با توان ۱۲۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۱/۵۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، استفاده از توان تیمار مایکروویو کمتر باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در زمان های هیدرولیز کوتاه تر گردید. در اغلب زمان های هیدرولیز، ظرفیت آنتی اکسیدانی- کل در تیمار مایکروویو با توان ۱۲۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده و تیمار شده با مایکروویو با توان های ۲۸۰ وات و ۲۰۰ وات بود. اثرات مایکروویو شامل شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و در نتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین ها است [۴۶]. گیزی کالوویک و همکاران (۲۰۲۱) گزارش کردند که بسته به شرایط فراوری و پیش تیمار مایکروویو هیدرولیز آنزیمی می تواند ویژگی های آنتی اکسیدانی و عملکردی گلوتن را بهبود بخشد. فعالیت به دام اندازی رادیکال آزاد با روش ABTS بررسی شد و نتایج نشان داد که گلوتن هیدرولیز شده در مقایسه با پروتئین تیمار نشده دارای قابلیت مهار کنندگی بالایی هستند [۴۷]. وانگ و همکاران (۲۰۲۲) گزارش کردند، افزایش بیشتر در FRAP^۱ از پروتئین باکویت تارتاری جوانه زده پس از تیمار مایکروویو نشان می دهد که تیمار با مایکروویو ممکن است، باعث گسترش ساختار مولکولی پروتئین باکویت تارتاری جوانه زده شده، پپتیدهای کوتاه بیشتری تشکیل داده و موجب افزایش در معرض قرارگیری گروه های سولفیدریل و هیدروکسیل فنولی با توانایی احیاء قوی در داخل مولکول ها می گردد در نتیجه ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین باکویت تارتاری جوانه زده افزایش یافت [۴۱].

¹ ferric-reducing antioxidant power

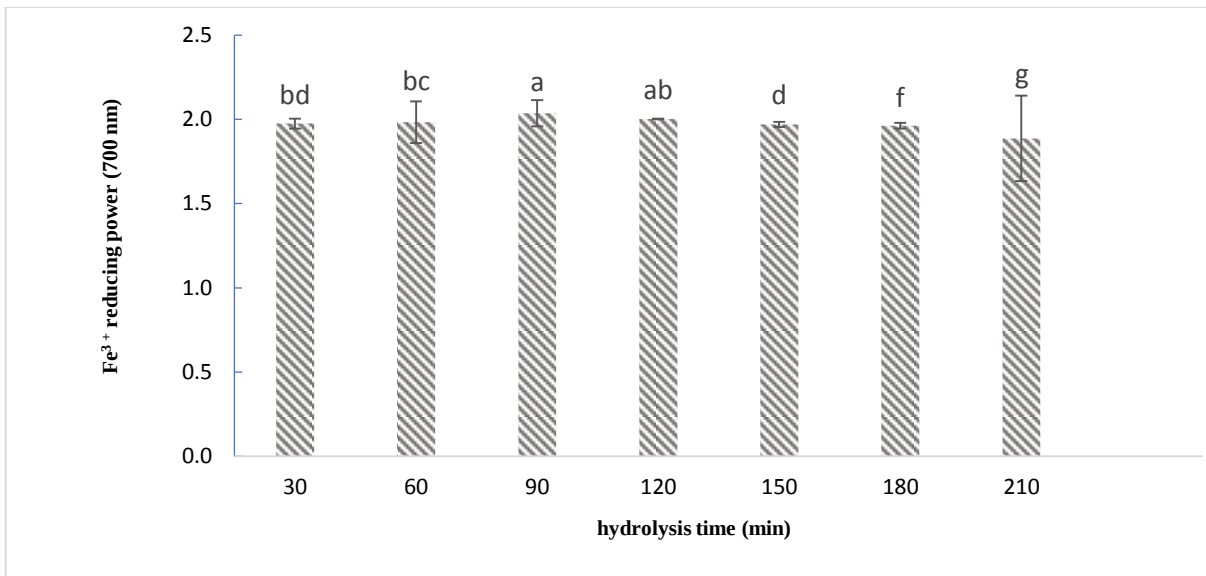


Figure 3(a)

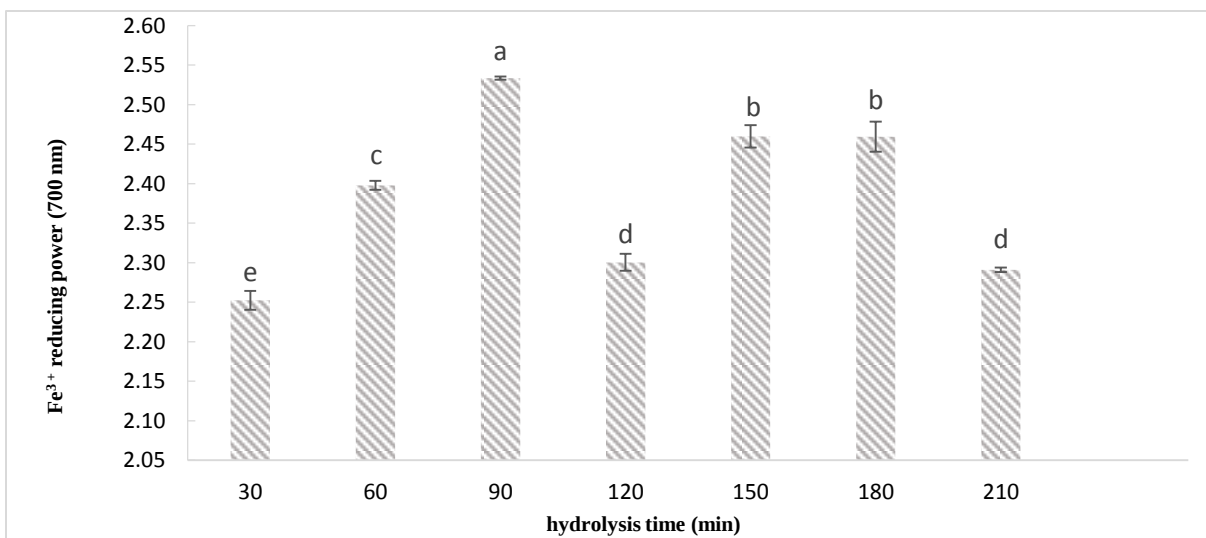


Figure 3(b)

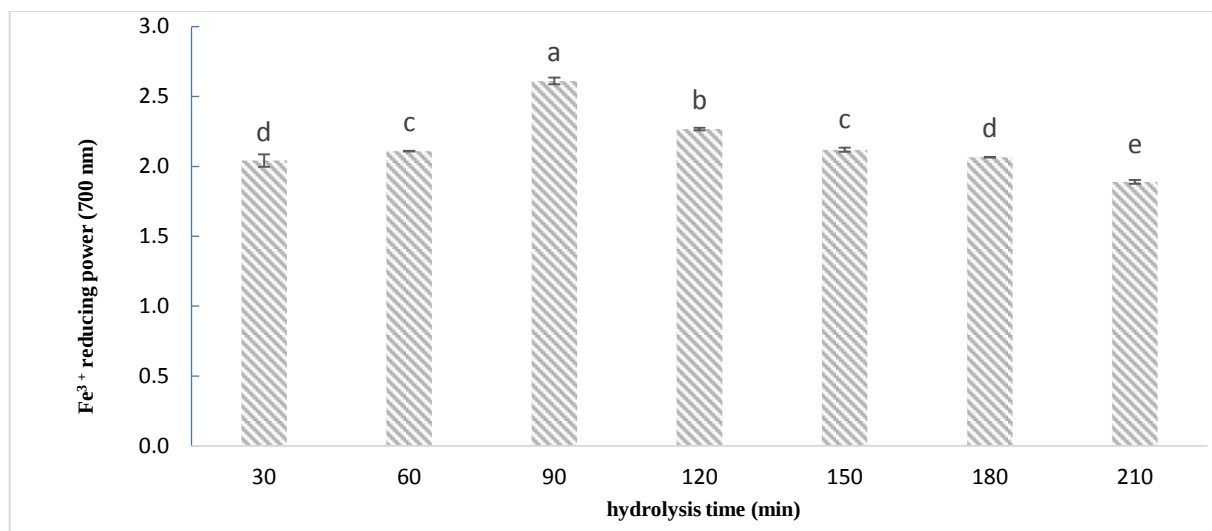


Figure 3(c)

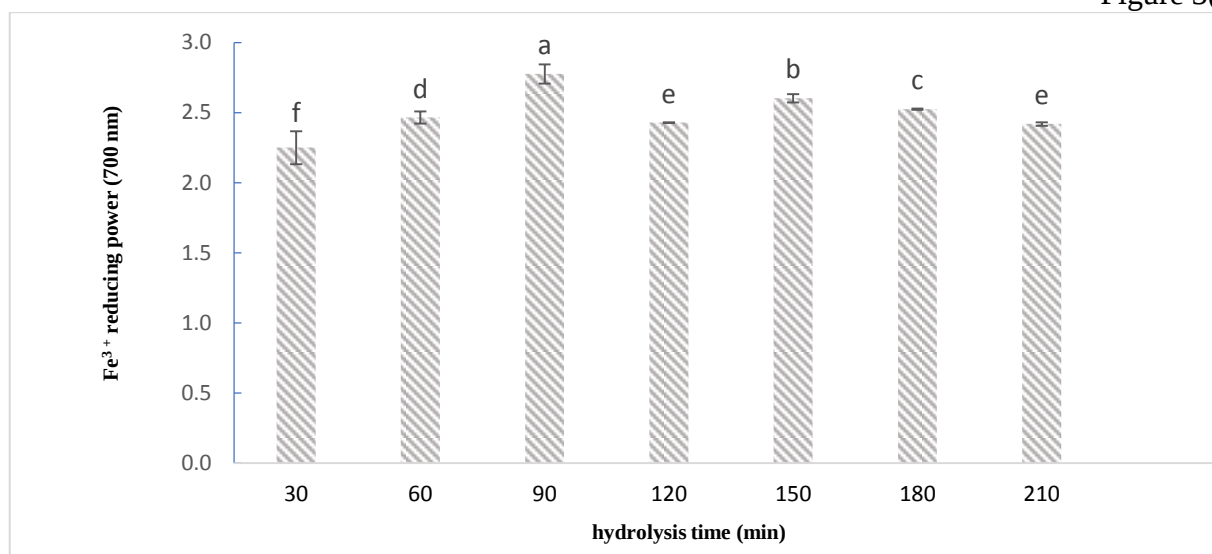


Figure 3(d)

Figure 3- The reducing power of iron ions in hydrolyzed protein samples without microwave pretreatment (3a), hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power of 280 W (3b), protein hydrolyzed with microwave pretreatment at power 200 W (3c) and protein hydrolyzed by microwave pretreatment with a power of 120 W (3d) using different hydrolysis times. The same letters statistically indicate no significant difference ($P < 0.05$).

ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم تریپسین بر افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن پروتئین اولیه می باشد. به طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی شد، این امر می تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می گردد که به عنوان منبع

با توجه به شکل ۳ الف بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه های تیمار نشده در زمان های هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۲/۰۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می باشد. این یافته-

با توان ۱۲۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۲/۷۷ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، کاهش توان تیمار مایکروویو باعث افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن در زمانهای هیدرولیز کوتاهتر گردید. در اغلب زمانهای هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تیمار مایکروویو باتوان ۱۲۰ وات بالاتر از نمونههای تیمارنشده و تیمار شده با مایکروویو با توانهای ۲۸۰ و ۲۰۰ وات بود. تیمار مایکروویو تحت شرایط کنترل شده باعث تخریب شبکه پیوندهای هیدروژنی، تغییر در چرخش دوقطبی مولکول های پروتئین و مهاجرت یونها در محیطهای آبی می شود [۵۰]. گیزی کالوویک و همکاران (۲۰۲۱) در مورد تاثیر هیدرولیز آنزیمی در پیش تیمار گلو تن جهت تسریع هیدرولیز آنزیمی و کاهش حساسیت زایی آن گزارش کردند که افزایش ابتدایی حساسیت به هیدرولیز آنزیمی در توان های پایین تر مربوط به تغییرات ساختاری مولکول های گلو تن در نتیجه حرارت دهی مایکروویو است که منجر به باز شدن کلی یا جزئی پلی پپتیدها در نتیجه در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مدفون شده در داخل ساختار می شود، در نتیجه این پیوندها دسترسی بیشتری برای حمله آنزیمی پیدا می کنند. به هر حال تیمار توان ۸۰۰ وات موجب کاهش قابل توجه در حساسیت گلو تن نسبت به هیدرولیز آنزیمی با تیمار ۲۰۰ وات می گردد که احتمالاً این امر ناشی از تجمع گلو تن و در نتیجه محافظت پیوندهای پروتئین در برابر هیدرولیز آنزیمی می باشد [۴۷]. به علاوه کاهش در حساسیت پروتئین به هیدرولیز و افزایش ممانعت کنندگی سوپسترا در توانهای بالاتر از ۶۰۰ وات ملاحظه شد که این امر به حضور پیوندهای دی سولفیدی بین مولکولی نسبت داده شد که این پیوندها منجر به تشکیل تجمعات پروتئینی می شود. پژوهشگران نشان دادند، پیش تیمار مایکروویو باعث کاهش ظرفیت به دام اندازی در هیدرولیز شده ها گردید، به طوری که پیش تیمار مایکروویو فعالیت به دام اندازی رادیکال

اضافی از الکترون ها و پروتون ها عمل می کنند [۴۹]. از طرف دیگر افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر اسید آمینه های الکترون دهنده مانند لیزین، تربیتوفان و هیستیدین می گردد در نتیجه قدرت احیاء کنندگی افزایش می یابد. افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده را به رها شدن اسیدهای آمینه با قابلیت آنتی اکسیدانی مانند لیزین و تربیتوفان نسبت داده اند [۱۰]. در شکل ۳ ب، ج و د به ترتیب قدرت احیاء کنندگی یون آهن در نمونه های تیمار شده با مایکروویو با توان های ۲۸۰، ۲۰۰ و ۱۲۰ وات تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن در نمونه های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات در زمان ۹۰ دقیقه به میزان ۲/۵۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه های تیمار نشده مشخص می شود که قدرت احیاء کنندگی یون آهن در زمان های ابتدایی هیدرولیز در نمونه های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه های بدون پیش تیمار مایکروویو و نمونه های تیمار شده با مایکروویو ۲۸۰ وات در زمان های ۳۰ و ۶۰ دقیقه جذب در ۷۰۰ نانومتر به ترتیب (۱/۹۷ و ۱/۹۸) و (۲/۲۵ و ۲/۳۹) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی نمونه های تیمار شده توسط مایکروویو در زمان های ابتدایی هیدرولیز بود. با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن در نمونه های تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۰۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۲/۶۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. در اغلب زمان های هیدرولیز، قدرت احیاء کنندگی یون آهن در تیمار مایکروویو باتوان ۲۰۰ وات بالاتر از نمونه های تیمار نشده و تیمار شده با مایکروویو با توان ۲۸۰ وات و پایین تر از تیمار شده با مایکروویو با توان ۱۲۰ وات بود. با توجه به شکل ۳ د بالاترین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن در نمونه های تیمار شده با مایکروویو

۳-۵- تاثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار میکروویو بر روی قدرت شلاته کنندگی یون آهن

یون Fe^{2+} به عنوان کاتالیزور واکنش های اکسیداسیون عمل می کند و منجر به تولید رادیکال های خطرناک برای بدن می شود. فروزین حتی در مقادیر کم می تواند با یون Fe^{2+} ترکیب شود اما در حضور عوامل شلاته کننده این کمپلکس از هم گسیخته شده و منجر به کاهش رنگ بنفش می گردد، بنابراین با اندازه گیری میزان کاهش رنگ می توان میزان فعالیت شلاته کنندگی ترکیب را تخمین زد [۵۲]. گزارش شده است که مهار رادیکال های هیدروکسیل از طریق آنتی اکسیدان ها عمدتاً از طریق شلاته کردن یون های فلزی صورت می گیرد. جامدار و همکاران (۲۰۱۰) و کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز به ترتیب افزایش فعالیت شلاته- کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده ی بادام زمینی و نوعی ماهی^۱ را با افزایش درجه هیدرولیز گزارش کردند [۵۳ و ۱۰].

در شکل ۴ قدرت شلاته کنندگی یون آهن نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار میکروویو (۴ الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار میکروویو با توان ۲۸۰ وات (۴ ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار میکروویو با توان ۲۰۰ وات (۴ ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار میکروویو با توان ۱۲۰ وات (۴ د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

پایین تری نسبت به نمونه کنترل داشت این محققین پیشنهاد کردند که پیش تیمار میکروویو باعث تغییراتی در ساختار پروتئین می شود که این تغییرات موجب جلوگیری از تشکیل پپتیدهای آنتی اکسیدان می گردد. مشخص شد که توان میکروویو و دماهای ایجاد شده توسط این پیش تیمار باعث ایجاد تغییر در مولکول پروتئین می گردند که این تغییرات با باز شدن و تجمع مولکول پروتئین در ارتباط می باشند [۴۷]. ژو و همکاران (۲۰۰۸) گزارش دادند، که قدرت احیا زئین هیدرولیز شده پس از تیمار با میکروویو توسط پیسین به مدت ۱ ساعت و پانکراتین به مدت ۲ ساعت افزایش یافت [۳۵]. در تحقیق اولوکو و همکاران (۲۰۱۵) استفاده از پیش تیمار میکروویو و حرارتی باعث ایجاد هیدرولیز شده هایی گردید که دارای قابلیت احیا یون آهن بالاتری نسبت به نمونه های کنترل بودند. آن ها بیان کردند که پیش تیمار پروتئین ها قبل از هیدرولیز باعث افزایش تعداد پپتیدهای تولیدی می شود. تعداد زیاد پپتیدها در نمونه های پیش تیمار شده عامل ایجاد نتایج FRAP بالا در این محصولات می باشد.

اولوکو و همکاران (۲۰۱۵) گزارش کردند که، پیش- تیمارهای حرارتی، میکروویو و فراصوت به طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، ظرفیت آنتی اکسیدانی، محتوای اسید آمینه آبگریز گوگردار موجود در هیدرولیز شده های کنسانتره پروتئین شیر تولیدی توسط آنزیم های گوارشی را بهبود می بخشند [۲۴]. کتناوا و همکاران (۲۰۱۷) نیز گزارش کردند که پیش تیمار با میکروویو به طور قابل توجهی باعث بهبود درجه هیدرولیز و فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH هیدرولیزهای پروتئین ماهی شد [۲۲]. لین و همکاران (۲۰۱۰) اثربخشی پیش تیمار اسیدی با کمک میکروویو را برای تهیه پپتیدهای آنتی اکسیدانی مشتق شده از هیدرولیز آنزیمی کلاژن استخوان گزارش کردند [۵۱].

¹ *Selaroides leptolepis*

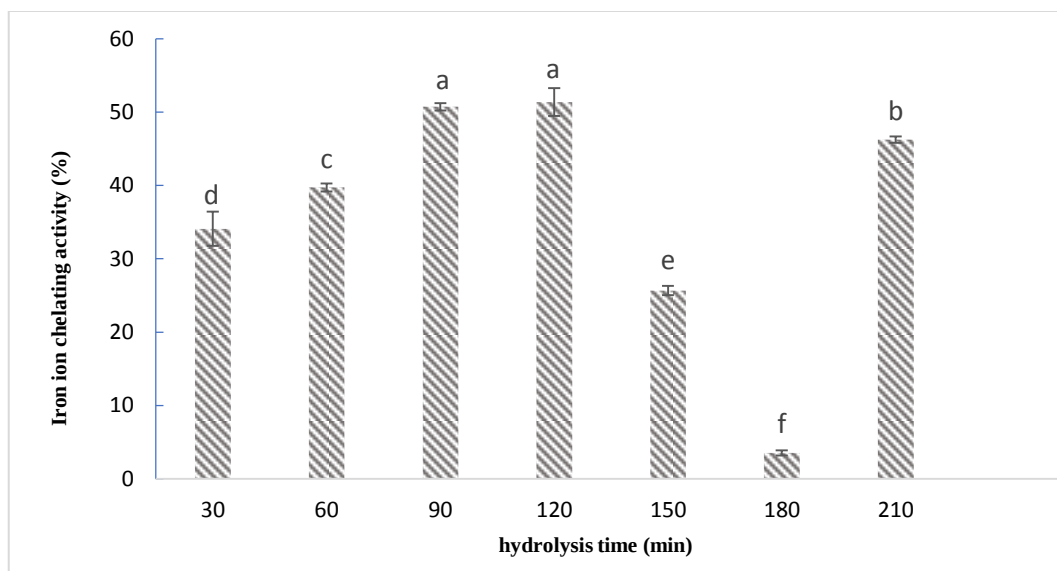


Figure 4(a)

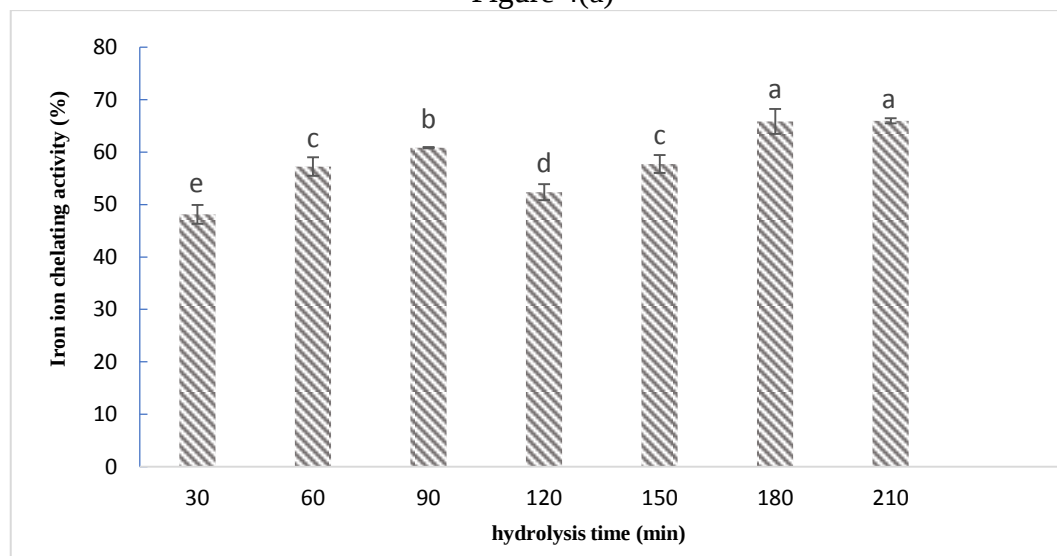


Figure 4(b)

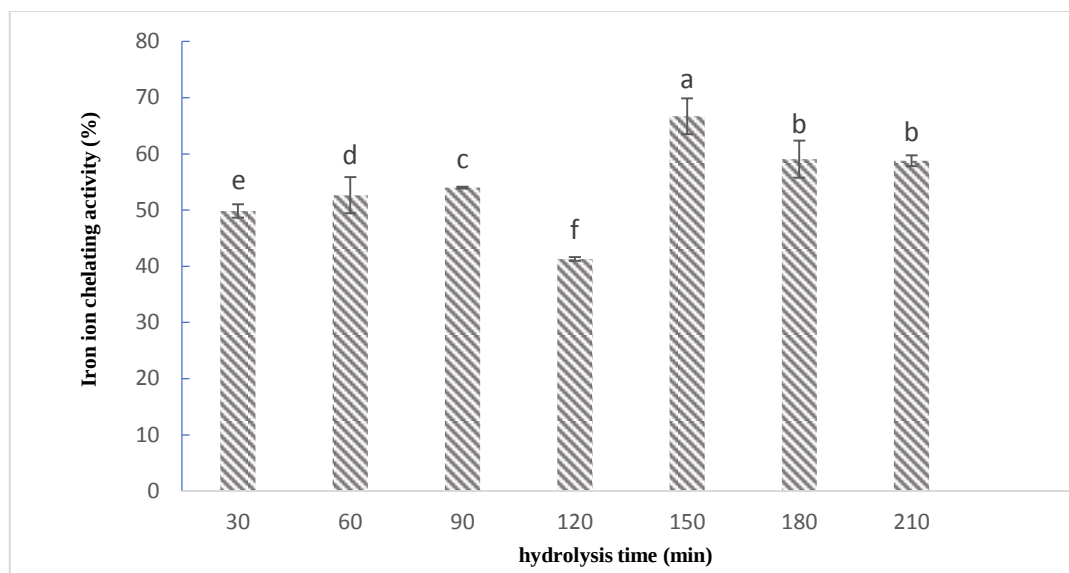


Figure 4(c)

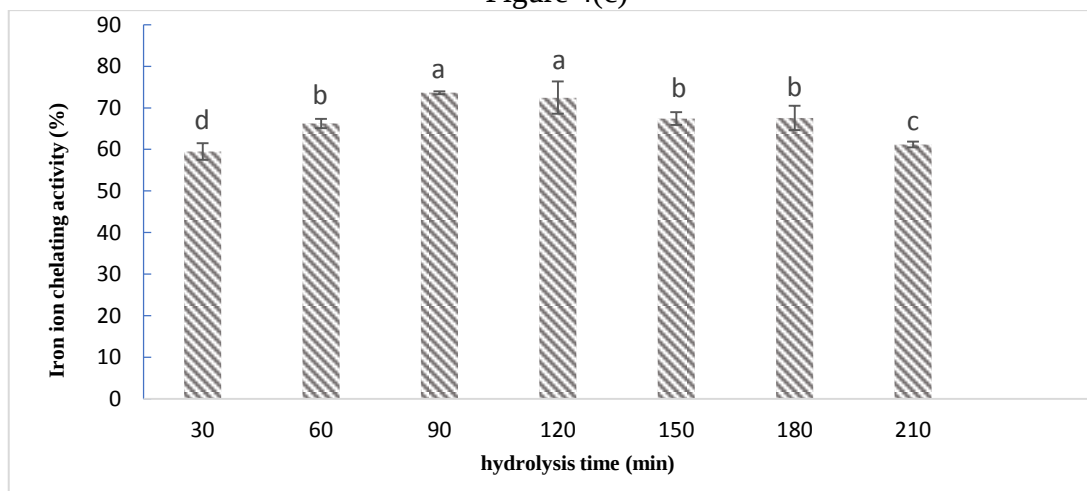


Figure 4(d)

Figure 4- Iron ion chelating power in hydrolyzed protein samples without microwave pretreatment (4a), hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power of 280 W (4b), hydrolyzed protein with microwave pretreatment at power of 200 W (4c) and protein hydrolyzed by microwave pretreatment at power of 120 W (4d) using different hydrolysis times. The same letters statistically indicate no significant difference ($P < 0.05$).

با آنزیم تریپسین بر افزایش قدرت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین اولیه می باشد. ارزیابی درصد شلاته کنندگی نمونه ها نشان دهنده تاثیر قابل توجه زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده بود. به طور کلی قابلیت شلاته کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده تحت تاثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد [۵۴]. بنابراین، آنزیم تریپسین توانسته

با توجه به شکل ۴ الف بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه های تیمار شده در زمان های هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه به میزان ۵۱/۳۵ درصد مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ابتدا قدرت شلاته کنندگی یون آهن افزایش و سپس کاهش و در نهایت افزایش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی-اکسیدان می باشد. این یافته ها حاکی از تاثیر مثبت هیدرولیز

پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی مناسب و با قابلیت به دام اندازی یون آهن تولید کند. علاوه بر این موارد، پروتئین قارچ خوراکی غنی از لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می باشد، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به دلیل دارا بودن حلقه ی ایمیدازول، توانایی شلاته کنندگی و به دام-اندازی رادیکال های آزاد را دارند بنابراین احتمالاً افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته کنندگی یون آهن توسط آن ها افزایش یافته است [۵۶ و ۵۵]. جامدار و همکاران (۲۰۱۰) و کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز به-ترتیب افزایش فعالیت شلاته کنندگی پروتئین های هیدرولیز شده ی بادام زمینی و نوعی ماهی^۱ را با افزایش درجه-هیدرولیز گزارش کردند [۵۳ و ۱۰].

در شکل ۴ ب، ج و د به ترتیب قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه های تیمارشده با میکروویو با توان های ۲۸۰، ۲۰۰، و ۱۲۰ وات تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه های تیمارشده با میکروویو با توان ۲۸۰ وات در زمان ۲۱۰ دقیقه به میزان ۶۶/۰۰ درصد مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه های تیمارشده مشخص می شود که قدرت شلاته کنندگی یون آهن در زمان های ابتدایی هیدرولیز در نمونه های تیمارشده با میکروویو با توان ۲۸۰ وات بالاتر از نمونه های تیمارشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه های بدون پیش تیمار میکروویو و نمونه های تیمارشده با میکروویو ۲۸۰ وات در زمان های ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب (۳۴/۰۹ و ۳۹/۷۲ درصد) و (۴۸/۱۳ و ۵۷/۲۴ درصد) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی نمونه های تیمارشده توسط میکروویو در زمان های ابتدایی هیدرولیز بود. با توجه به شکل ۴ ج بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه های

تیمارشده با میکروویو با توان ۲۰۰ وات در زمان هیدرولیز ۱۵۰ دقیقه به میزان ۶۶/۶۹ درصد مشاهده شد. در اغلب زمان های هیدرولیز، قدرت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار میکروویو با توان ۲۰۰ وات بالاتر از نمونه های تیمارشده و پایین تر از تیمارشده با میکروویو با توان ۲۸۰ وات و ۱۲۰ وات بود. با توجه به شکل ۴ د بالاترین میزان قدرت شلاته کنندگی یون آهن در نمونه های تیمارشده با میکروویو با توان ۱۲۰ وات در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۷۳/۶۲ درصد مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، استفاده از تیمار میکروویو با توان پایین تر باعث افزایش قدرت شلاته کنندگی یون آهن در زمان های هیدرولیز کوتاه تر گردید. در اغلب زمان های هیدرولیز، قدرت شلاته کنندگی یون آهن در تیمار میکروویو با توان ۱۲۰ وات بالاتر از نمونه های تیمارشده و تیمارشده با میکروویو با توان های ۲۸۰ و ۲۰۰ وات بود. نتایج تحقیق یان و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که حرارت دهی میکروویو در زمان کوتاه (۵ دقیقه) با انرژی ورودی کمتر می تواند ارزش غذایی و کارایی پروتئین خام در جو را افزایش دهد [۵۷]. کاربرد تابش مایکروویو در ترکیب با هیدرولیز آنزیمی جهت کاهش حساسیت زایی و بهبود فعالیت زیستی پپتیدها قبلاً به اثبات رسیده است [۲۲]. مشخص شده است که این اثرات ناشی از ترکیبی از برهمکنش های حرارتی و غیرحرارتی با مواد آلی هستند که به طور معمول در طی روش های حرارت دهی مرسوم در دسترس نمی باشند [۵۸]. مطالعات مختلف اثر کاربرد تابش مایکروویو در کاهش زمان هیدرولیز در نتیجه افزایش سرعت واکنش و افزایش بازدهی کلی محصول را به اثبات رساندند [۳۹]. در تحقیق هال و لسیگا (۲۰۱۹) در هیدرولیز پروتئین جیرجیرک نتایج نشان از برتری پروتئولیز به کمک مایکروویو در بهبود واکنش هیدرولیز و به دست آوردن پپتیدهایی با ظرفیت مهار ACE^2 و $DPP-IV^1$ بود [۳۹].

2 -Angiotensin-Converting Enzyme

1 -*Scleroides leptolepis*

۴- نتیجه گیری

امروزه با توجه به خاصیت آنتی اکسیدان های طبیعی در جلوگیری از عمل رادیکال های آزاد، کاربرد آن ها در پزشکی و صنایع غذایی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و منجر به تحقیقاتی در زمینه ی بررسی قابلیت آنتی-اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین های غذایی مختلف شده است. روش معمول تولید این ترکیبات استفاده از هیدرولیز آنزیمی است اما فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می باشند. امروزه از روش های مختلف نظیر امواج فراصوت، میکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش تیمار پروتئین و رفع معایب فوق استفاده می شود. امروزه کاربرد میکروویو در خانه و صنعت به منظور تهیه مواد خوراکی در مقایسه با روش های سنتی معمول همچون جوشاندن، سرخ کردن، برشته کردن در حال افزایش است که این مسئله با سرعت و مزایای اقتصادی این روش در ارتباط است. مزیت مهم حرارت دهی با میکروویو سرعت و کارایی بالای این روش بوده که این امر خود از قدرت نفوذ انرژی میکروویو نشأت می گیرد. انرژی میکروویو به ماده غذایی نفوذ کرده و حرارت داخلی تولید می کند، که این مسئله منجر به نرخ حرارتی بیشتر و کوتاه تر شدن زمان فرایند می گردد. به هر حال تغییرات بیولوژیکی که بر روی پروتئین ها پس از پیش تیمار با میکروویو ایجاد می شود، تابعی از شدت پیش تیمار است. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ دکمه ای با استفاده از آنزیم تریپسین بدون پیش تیمار و با پیش تیمار میکروویو در توان های مختلف ۱۲۰، ۲۰۰ و ۲۸۰ وات صورت گرفت. نتایج نشان داد که در غالب آزمون های صورت گرفته، پیش تیمار با میکروویو موجب کاهش زمان دستیابی و افزایش قابلیت آنتی اکسیدانی نمونه ها گردید به طوری که نمونه های پیش

پژوهشگران گزارش کردند، پیش تیمار میکروویو می تواند حلالیت پروتئین باکویت تارتاری را در عرض ۷ روز پس از جوانه زنی بیشتر بهبود بخشد، که دلیل آن این بود که تیمار میکروویو می تواند فعالیت پروتئاز درون زا پروتئین باکویت تارتاری را در طول جوانه زنی افزایش دهد، و همچنین گروه های آمینه آزاد و کربوکسیل و برهمکنش یونی را افزایش داده و منجر به افزایش قابل توجهی در حلالیت پروتئین باکویت تارتاری شد. به گزارش ایزکویدر و همکاران (۲۰۰۷) ثابت مکالئیس-متن (KM) برای آنزیم تحت تیمار میکروویو کاهش می یابد که این امر از نشان از تمایل بالاتر سوبسترا-آنزیم تحت این شرایط دارد [۵۹]. پژوهشگران گزارش کردند که تیمار میکروویو می تواند پروتئین های گیاهی را به مولکول های کوچک تر هیدرولیز کند و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین ها به طور قابل توجهی افزایش می یابد [۶۰]. در برخی تحقیقات انجام گرفته ارتباط خاصی بین آزمون های آنتی اکسیدانی انجام گرفته وجود نداشته است این امر چندان تعجب آور نیست به دلیل این که این آزمون ها دارای مکانیسم های واکنش متفاوتی هستند [۲۴]. مشخص شده است که آزمون های FRAP و DPPH جهت احیاء رادیکال ها از مکانیسم انتقال الکترون استفاده می کنند، در حالی که آزمون FRAP توانایی آنتی اکسیدان برای احیاء یون فریک (Fe^{3+}) به یون فرو (Fe^{2+}) را اندازه گیری می نماید در حالی که آزمون DPPH توانایی آنتی اکسیدان جهت احیاء رادیکال آزاد DPPH را تعیین می نماید. این امر دلیل این مسئله است که چرا نتایج آزمون های مختلف با یکدیگر متفاوت هستند [۲۴]. روش مورد استفاده برای تعیین قابلیت آنتی اکسیدانی موجب به دست آمدن نتایج متفاوت می شود که این امر قابل انتظار است به دلیل اینکه مکانیسم های درگیر در فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوت هستند [۲۴].

تیمار شده با توان ۲۰۰ و ۲۸۰ وات و نمونه‌های بدون قابلیت آنتی‌اکسیدانی در توان‌های بالاتر را می‌توان به تجمع پروتئین‌ها و در نتیجه محافظت پیوندهای پروتئین در برابر هیدرولیز آنزیمی نسبت داد. بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که استفاده از پیش‌تیمار مایکروویو با توان ۱۲۰ وات موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر می‌گردد و در نتیجه موجب افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد.

۵- منابع

[1] Othman, A., Ismail, A., Ghani, N. A., &

[7] 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.

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

[9] 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.

[10] 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.

[11] Girgih, A. T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., & Aluko, R. E. (2014). Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and

تیمار شده مایکروویو با توان ۱۲۰ وات نسبت به نمونه‌های پیش‌تیمار از قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری برخوردار بودند. در کلیه آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی نمونه پیش‌تیمار شده با مایکروویو با توان ۱۲۰ و در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه عملکرد بالاتری از خود نشان داد و بنابراین به‌عنوان تیمار مناسب در نظر گرفته می‌شود. احتمالاً افزایش حساسیت به هیدرولیز آنزیمی در توان‌های پایین‌تر مربوط به تغییرات ساختاری مولکول‌های پروتئینی در نتیجه حرارت‌دهی مایکروویو است که منجر به باز شدن کلی یا جزئی پلی پپتیدها در نتیجه در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مدفون شده در داخل ساختار می‌شود، در نتیجه این پیوندها دسترسی بیشتری برای حمله آنزیمی پیدا می‌کنند. کاهش در

Adenan, I. (2007). Antioxidant capacity and phenolic content of cocoa beans. *Food Chemistry*, 100(4), 1523-1530.

[2] 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] Fitzgerald, R. J., & Murray, B. A. (2006). Bioactive peptides and lactic fermentations. *International Journal of Dairy Technology*, 59(2), 118-125.

[6] 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.

- Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*, 77, 488-496.
- [13] Li, X. R., Chi, C. F., Li, L., & Wang, B. (2017). Purification and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of scalloped hammerhead (*Sphyrna lewini*) cartilage. *Marine Drugs*, 15(3), 61.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] Azarpazhooh, E., & Ramaswamy, H. S. (2011). Optimization of microwave-osmotic pretreatment of apples with subsequent air-drying for preparing high-quality dried product. *International Journal of Microwave Science and Technology*, 2011, 678548.
- [18] 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*, 103, 253-259.
- [19] Plagemann, R., von Langermann, J., & Kragl, U. (2014). Microwave-assisted covalent immobilization of enzymes on inorganic surfaces. *Engineering in Life Sciences*, 14(5), 493-499.
- [20] Hall, F., & Liceaga, A. (2020). Effect of microwave-assisted enzymatic hydrolysis of cricket (*Gryllos sigillatus*) protein on ACE and DPP-IV inhibition and tropomyosin-IgG binding. *Journal of Functional Foods*, 64, 103634.
- antihypertensive peptides. *Journal of Functional Foods*, 6, 384-394.
- [12] Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A. E. A., Zhang, Y., Ma, H., Gao, X., & Otu, P. N.
- [21] Banik, S. B. A. S. G. S., Bandyopadhyay, S., & Ganguly, S. (2003). Bioeffects of microwave a brief review. *Bioresource Technology*, 87(2), 155-159.
- [22] He, S., Franco, C., & Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), 289-297.
- [23] 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.
- [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] Lavi, I., Nimri, L., Levinson, D., Peri, I., Hadar, Y., & Schwartz, B. (2012). Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. *Journal of Gastroenterology*, 47(5), 504-518.
- [26] Paisansak, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtung, O., Choowongkamon, 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.
- [27] Association of official analytical chemists (AOAC). (2000). Official methods of analysis of AOAC international Methods 934.01, 988.05, 920.39, 942.05. Arlington, VA, USA: AOAC International.
- [28] 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.

[29] 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.

[30] Prieto, P., Pineda, M., & 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.

[31] 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.

[32] Santos-Sánchez, N. F., Salas-Coronado, R., Villanueva-Cañongo, C., & Hernández-Carlos, B. (2019). Antioxidant compounds and their antioxidant mechanism. *Antioxidants*, 10, 1-29.

[33] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y., & Ma, H. (2020). Plant protein-derived antioxidant peptides: Isolation, identification, mechanism of action and application in food systems: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 105, 308-322.

[34] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & Yang, B. (2009). Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), 235-240.

[35] Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721.

[36] Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). In vitro antioxidant properties of hemp seed (*Cannabis sativa* L.)

protein hydrolysate fractions. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 88(3), 381-389.

[37] 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.

[38] Meshginfar, N., Sadeghi, M. A., Ziaifar, A. M., Ghorbani, M., & Kashaninejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology.

[39] 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, 105187.

[40] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Li, H., Cui, W., Xue, H., ... & Lv, J. (2014). Pilot-scale membrane fractionation of ACE inhibitory and antioxidative peptides from ultrasound pretreated milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 7, 350-361.

[41] Wang, S., Xu, X., Wang, S., Wang, J., & Peng, W. (2022). Effects of Microwave Treatment on Structure, Functional Properties and Antioxidant Activities of Germinated Tartary Buckwheat Protein. *Foods*, 11(10), 1373.

[42] Chang, C. Y., Wu, K. C., & Chiang, S. H. (2007). Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4), 1537-1543.

[43] Pan, X., Zhao, Y. Q., Hu, F. Y., & Wang, B. (2016). Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25, 220-230.

[44] Arabshahi-Delouee, S., & Urooj, A. (2007). Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica*

- L.) leaves. *Food Chemistry*, 102(4), 1233-1240.
- [45] Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2011). Chemometric analysis of the amino acid requirements of antioxidant food protein hydrolysates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(5), 3148-3161.
- [46] 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.
- [47] 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), 2214.
- [48] Yıldırım, A., Mavi, A., Oktay, M., Kara, A. A., Algur, Ö. F., & Bilaloğlu, V. (2000). Comparison of antioxidant and antimicrobial activities of Tilia (Tilia argentea Desf ex DC), sage (Salvia triloba L.), and Black tea (Camellia sinensis) extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(10), 5030-5034.
- [49] Zhu, L., Chen, J., Tang, X., & Xiong, Y. L. (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(8), 2714-2721.
- [50] 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, 124986.
- [51] Lin, Y. J., Le, G. W., Wang, J. Y., Li, Y. X., Shi, Y. H., & Sun, J. (2010). Antioxidative peptides derived from enzyme hydrolysis of bone collagen after microwave assisted acid pre-treatment and nitrogen protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(11), 4297-4308.
- [52] Yamaguchi, F., Ariga, T., Yoshimura, Y., & Nakazawa, H. (2000). Antioxidative and anti-glycation activity of garcinol from Garcinia indica fruit rind. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(2), 180-185.
- [53] 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.
- [54] Sadat, L., Cakir-Kiefer, C., N'Negue, M. A., Gaillard, J. L., Girardet, J. M., & Miclo, L. (2011). Isolation and identification of antioxidative peptides from bovine α -lactalbumin. *International Dairy Journal*, 21(4), 214-221.
- [55] Je, J. Y., Park, P. J., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate. *Food Research International*, 38(1), 45-50.
- [56] Uchida, K., & Kawakishi, S. (1992). Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper (II)/ascorbate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(1), 13-16.
- [57] Yan, X., Khan, N. A., Zhang, F., Yang, L. and Yu, P. (2014). Microwave irradiation induced changes in protein molecular structures of barley grains: relationship to changes in protein chemical profile, protein subfractions, and digestion in dairy cows. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:6546-6555.
- [58] de la Hoz, A., Diaz-Ortiz, A., & Moreno, A. (2005). Microwaves in organic synthesis. Thermal and non-thermal microwave effects. *Chemical Society Reviews*, 34(2), 164-178.
- [59] Izquierdo, F. J., Alli, I., Yaylayan, V., & Gomez, R. (2007). Microwave-assisted digestion of β -lactoglobulin by pronase, α -chymotrypsin and pepsin. *International Dairy Journal*, 17(5), 465-470.
- [60] 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.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsc.tmodares.ir

Scientific Research

The effect of microwave pretreatment on enzymatic hydrolysis time of edible mushroom protein by trypsin enzyme and production of antioxidant peptides (*Agaricus bisporus*)

Aisan Izanlou¹, Alireza Sadeghi Mahonek^{*2}

1- Master student, Department of Food Science and Industry, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2- Professor of the Department of Food Science and Industry, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ABSTRACT

Bioactive peptides are actually specific protein parts that, in addition to nutritional value, have positive effects on body function and conditions that lead to health effects. The combined use of pretreatment and enzymatic hydrolysis causes changes in the physical and chemical properties of hydrolyzed proteins. Microwave pretreatment is a well-known strategy to increase the accessibility of hydrolysis-sensitive bonds, facilitating enzyme cleavage sites and exposure to proteases. The aim of this research was to investigate the effect of hydrolysis time and also the effect of microwave pretreatment on enzymatic hydrolysis of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein by trypsin enzyme to produce antioxidant peptides. To conduct this research, first, edible mushrooms were turned into powder after purchase from the market and conducting related processes. In this research, hydrolyzed edible mushroom was produced using trypsin enzyme without pretreatment and with microwave pretreatment at different powers of 120, 200, and 280W and time intervals of 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes. The antioxidant properties of the hydrolysed samples (DPPH radical scavenging activity, iron chelating power, iron ion reduction power and total antioxidant activity) were evaluated and compared. The results showed that in most of the experiments, pretreatment with microwaves decreased the time of obtaining and increased the antioxidant capacity of the samples, so that the samples pretreated with microwave power of 120W showed higher antioxidant power compared to the other treated samples. In all antioxidant tests, the sample pre-treated with microwave with power 120W and hydrolysed at 90minutes showed higher antioxidant performance, and therefore it is considered as suitable treatment.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2022/8/31

Accepted: 2023/5/31

Keywords:

Edible Mushroom,

Enzymatic hydrolysis,

Antioxidant properties,

microwave pretreatment

DOI: 10.22034/FSC.T.20.139.35

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.139.3.7

*Corresponding Author E-Mail:

sadeghiaz@gau.ac