



بررسی تاثیر پیش تیمار فراصوت بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از کنجاله بذر کتان با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین به روش سطح پاسخ

فائزه فرزانه^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، محمد قربانی^۳، سید حسین حسینی قابوس^۴، شیمیا کاوه^۵

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی مواد غذایی، 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

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

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر

۵- دانش‌آموخته دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۹/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲

کلمات کلیدی:

آنتی اکسیدان،

پپتید زیست فعال،

فراصوت،

کتان،

هیدرولیز آنزیمی،

سطح پاسخ

در سال‌های اخیر، محققان پپتیدهای فعال زیستی با خواص آنتی اکسیدانی قابل قبول را از منابع پروتئین حیوانی و گیاهی شناسایی و استخراج کرده‌اند. طبق تحقیقات، "کنجاله بذر کتان" که محصول فرعی اصلی فرآیند استخراج روغن بذر کتان است؛ حاوی مقدار زیادی پروتئین می‌باشد که به وسیله هیدرولیز آنزیمی آن، می‌توان به پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی دست یافت. در این پژوهش تاثیر شرایط هیدرولیز (غلظت آنزیم ۱-۲٪ درصد و زمان ۱۸۳/۶۴-۳۰ دقیقه)، نوع پروتئاز (پانکراتین و آلکالاز) و پیش تیمار فراصوت بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت آنتی اکسیدانی کل و شلاته‌کنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده حاصل از کنجاله بذر کتان با استفاده از روش سطح پاسخ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که، شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با بیشترین ویژگی‌های آنتی اکسیدانی با آنزیم آلکالاز با پیش تیمار و بدون پیش تیمار و همچنین آنزیم پانکراتین با پیش تیمار و بدون آن به ترتیب عبارت بودند از: زمان هیدرولیز ۷۹، ۱۴۶/۴، ۱۱۱/۷۷ و ۹۷/۲۱ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۲۹، ۱/۴۶، ۲/۲۶ و ۱/۳۸ درصد؛ طبق نتایج بدست آمده، با بررسی درجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده کنجاله بذر کتان، پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پانکراتین با اعمال پیش تیمار فراصوت به عنوان تیمار بهینه پیشنهاد شد. پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پانکراتین با پیش تیمار فراصوت دارای ۷۵/۶۶٪ مهار رادیکال آزاد DPPH، ۷۰/۳۹٪ فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، فعالیت آنتی اکسیدانی کل با جذب ۰/۸۶ نانومتر و درجه هیدرولیز ۸۰/۶۹٪ گزارش شد. بنابراین می‌توان بیان کرد که پروتئین هیدرولیز شده کنجاله بذر کتان با قابلیت آنتی اکسیدانی قوی، یک ترکیب زیست فعال برای استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی و تولید محصولات فراسودمند می‌باشد.

DOI: 10.22034/FSCT.21.147.187.

* مسئول مکاتبات:

Sadeghiaz@yahoo.com

۱- مقدمه

هیدرولیز پروتئینی، تحت تأثیر عوامل متعددی مانند زمان هیدرولیز، pH، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا است [7]. Silva و همکاران (۲۰۱۹) با انجام فرآیند هیدرولیز آنزیمی ذرت با استفاده از آنزیم آلکالاز نشان دادند؛ که بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر دارا بودند. و پپتید با توالی GFPGRDLHWCASE دارای فعالیت مهار رادیکال اکسیژن بیشتری نسبت به آنتی اکسیدان مصنوعی BHA بود [8].

فرآوری میوه‌ها و سبزیجات مقدار قابل توجهی مواد زائد تولید می‌کند؛ که میتواند مورد بازیافت و مصرف قرار گیرد. با این حال، اکثریت قریب به اتفاق نادیده گرفته می‌شوند [9]. "کنجاله بذر کتان" محصول فرعی اصلی فرآیند استخراج روغن بذر کتان است. تحقیقات نشان داده است که کنجاله بذر کتان حاوی مقدار زیادی پروتئین می‌باشد. کتان با نام علمی *Linum usitatissimum* قرن‌هاست که به عنوان غذا استفاده می‌شود. قسمت اعظم اسیدهای چرب آن آلفالینولنیک اسید است و امگا ۳ زیادی دارد که باعث کاهش بیماری‌های قلبی عروقی، فشار خون، افسردگی، پوکی استخوان، روماتیسم، کاهش وزن، دیابت و بیماری‌های گوارشی می‌شود. کتان، حاوی ۲۵ درصد فیبر، ۱۹-۲۹ درصد پروتئین، ۸ درصد ترکیبات موسیلاژ و ۳۶۷ درصد خاکستر است و به عنوان یک افزودنی غذایی در ایالات متحده و کشورهای اروپایی استفاده می‌شود [10]. پروتئین بذر کتان و پپتیدهای مشتق شده از پروتئین بذر کتان دارای خواص فیزیولوژیکی مانند فعالیت ضدباکتریایی، مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین (ACE)، فعالیت آنتی اکسیدانی و اثر ضد دیابتی هستند [11].

اخیراً، در تولید پپتیدهای فعال زیستی، توجه ویژه‌ای به استفاده از تیمارهای مختلف قبل از هیدرولیز آنزیمی شده است [12-13]. در سال‌های اخیر، استفاده از امواج اولتراسوند در بهبود خواص پروتئین‌ها گسترش یافته است.

گونه‌های فعال اکسیژن (ROS) یا رادیکال‌های آزاد، در طی متابولیسم طبیعی توسط واکنش‌های اکسیداسیون تولید می‌شوند. مقادیر بیش از حد ROS می‌تواند به DNA، لیپیدهای غشایی و پروتئین‌ها حمله کند و باعث اکسیداسیون و آسیب اکسیداتیو شود؛ که در بسیاری از بیماری‌ها مانند بیماری قلبی، سکتة مغزی، دیابت و سرطان نقش دارد [1]. بنابراین، استفاده از "ترکیبات آنتی اکسیدانی" برای مقابله با آسیب‌های اکسیداتیو ضروری است. اگرچه آنتی اکسیدان‌های مصنوعی به طور گسترده در صنایع غذایی برای نگهداری مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند، اما اثرات نامطلوب آنها بر سلامت مصرف کنندگان باعث افزایش توجه به شناسایی و استخراج ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی شده است [2]. از سوی دیگر افزایش آگاهی عموم مردم نسبت به سلامت رژیم غذایی بر سلامت بدن باعث افزایش تقاضا نسبت به غذاهای فراسودمند با ارزش تغذیه‌ای بالا و حاوی افزودنی‌های طبیعی شده است [3]. در میان ترکیبات طبیعی با خاصیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال از جایگاه ویژه‌ای برخوردارند که در سال‌های اخیر، محققان پپتیدهای فعال زیستی با خواص آنتی اکسیدانی قابل قبول را از منابع پروتئین حیوانی و گیاهی شناسایی و استخراج کرده‌اند [4]. پروتئین‌های غذایی به عنوان منابع مهم تامین انرژی و منابع اسیدهای آمینه ضروری برای رشد و تداوم عملکردهای مختلف بدن شناخته شده و مصرف می‌شوند. همچنین این پروتئین‌ها به بهبود خواص حسی و فیزیوشیمیایی غذاهای غنی از پروتئین کمک می‌کنند [5]. پروتئین‌ها به عنوان سوبسترا در تولید "پپتیدهای زیست فعال" استفاده می‌شوند. این پپتیدهای زیست فعال، توالی اسید آمینه کوتاهی هستند که در پروتئین پیش ساز خود غیرفعال هستند. با این حال، هنگامی که با ابزارهای تکنولوژیکی آزاد می‌شوند، ممکن است با گیرنده‌های انتخاب شده تعامل داشته باشند و عملکردهای فیزیولوژیکی را تنظیم کنند [6]. آزادسازی پپتیدهای زیست فعال از پروتئین‌های اصلی خود توسط

الک با مشخصه مش ۴۰ گذر داده شد. در ادامه برای استخراج پروتئین کنجاله بذر کتان، پودر کنجاله بذر کتان به تناسب ۱:۱۰ با محلول کلرید سدیم ۰/۳ مولار، مخلوط شد و pH را با افزودن سود ۱ نرمال به ۹/۲ می‌رسانیم و به فاصله زمانی ۱ ساعت هم‌زدیم، در مرحله بعد محلول تولیدی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در ۴۵۰۰×g به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس pH سوپرناتانت به pH=۴/۵ (pH ایزوالکتریک کنجاله بذر کتان) رسانده شد و برای رسوب دادن پروتئین‌ها، محلول حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در ۴۵۰۰×g سانتریفوژ گردید. در ادامه رسوب پروتئین با آب مقطر دو بار شستشو داده شد و به مدت زمان ۵ دقیقه در ۴۵۰۰×g سانتریفوژ شد. در ادامه کنسانتره پروتئینی کنجاله بذر کتان تولید شده با استفاده از خشک‌کن انجمادی خشک شد و تا زمان انجام‌گیری آزمون‌های مراحل بعد در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد [20].

۲-۲- اعمال پیش تیمار فراصوت

ابتدا محلول ۵ درصد پروتئین بذر کتان در بافر فسفات (M ۰/۲، pH=۷) تهیه گردید. محلول حاصل در دمای دمای ۰C ۴ به مدت ۲۴ ساعت حل شد. به جهت اعمال پیش تیمار فراصوت از پروب فراصوت با فرکانس ثابت ۲۰۰ KHz و زمان های ۳۰، ۶۰ و ۹۰ ثانیه در شدت های ۴۰، ۶۰ و ۹۰٪ درصد استفاده گردید. جهت جلوگیری از بالارفتن دما در طی اعمال فراصوت از حمام یخ استفاده شد [21]. در مرحله بعد به جهت انتخاب تیمار بهینه فراصوت از نمونه‌ها آزمون آنتی اکسیدانی کل گرفته شد و تیمار ۴۰٪ به مدت زمان ۶۰ ثانیه با بیشترین مقدار آنتی اکسیدانی کل انتخاب گردید.

۲-۳- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

هیدرولیز در نقاط تعریف شده در جدول ۱ با استفاده از آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز، در دو حالت عدم استفاده از پیش تیمار اولتراسوند و هیدرولیز با پیش تیمار اولتراسوند انجام گرفت و تأثیر متغیرهای زمان و غلظت آنزیم بر

امواج فراصوت به عنوان امواج صوتی با فرکانس‌های بالاتر از آستانه شنوایی انسان در محدوده ۲۰ تا ۱۰۰ کیلوهرتز تعریف می‌شوند [14]. مطالعات نشان داده اند که درمان اولتراسوند سبب تغییراتی در ساختار ثانویه و سوم پروتئین‌ها می‌شود که منجر به باز شدن جزئی ساختار آن‌ها و در ادامه باعث قرار گرفتن بهتر پروتئین‌ها در برابر آنزیم‌ها می‌شود [15]. تغییرات ساختاری مشاهده شده در پروتئین‌ها به دلیل پیش تیمار اولتراسوند اثراتی را بر هیدراتاسیون، آبگریزی، اندازه مولکولی و ساختار آن‌ها نشان داده است [16-17]. [18]. در پژوهشی که توسط Hasan و همکاران (۲۰۲۰) انجام گرفت؛ اثر پیش تیمار اولتراسوند با شدت‌های مختلف (۷۰ و ۳۵ درصد) را بر روی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین کنجاله بذر کتان هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پانکراتین در زمان‌های هیدرولیز ۲۱۰-۳۰ دقیقه بررسی کردند. نتایج نشان داد؛ که پیش تیمار اولتراسوند در افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده موثر است [19].

هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین بذر کتان با استفاده از آنزیم‌های پانکراتین و آلکالاز تحت تأثیر پیش تیمار اولتراسوند، برای دستیابی به بالاترین قدرت آنتی اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی یون آهن و مهار رادیکال آزاد DPPH می‌باشد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه کنسانتره پروتئین

برای استخراج پروتئین کنجاله بذر کتان در مرحله اول دانه‌ها را شسته و در دمای معمول اتاق خشک کرده و با کمک آسیاب الکتریکی پودر شدند؛ در ادامه به جهت حذف چربی، پودر حاصل به تناسب ۱:۴ (وزنی/ حجمی) با هگزان مخلوط شد و به فاصله زمانی ۳ ساعت در دمای محیط به وسیله شیکر با دور ۱۵۰ rpm هم‌زده شد. سپس با کمک قیف بوختر هگزان جدا شد و پودر فاقد چربی با دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به فاصله زمانی ۱ ساعت در آون قرار گرفت و از

۱-۳-۲-درجه هیدرولیز

محلول تری کلرواستیک اسید ($M/0.44$) و پروتئین هیدرولیز شده کنجاله بذر کتان در تناسب حجمی ۱:۱ مخلوط و در دمای $4^{\circ}C$ به فاصله زمانی ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. پس از آن، مخلوط به فاصله زمانی ۱۰ دقیقه در 10000rpm سانتریفوژ شد. میزان پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید $M/0.22$ با استفاده از روش برادفورد [23] تعیین و اندازه گیری شد. در آخر، درجه هیدرولیز با استفاده از معادله زیر تعیین شد:

$$DH (\%) = \frac{\text{Protein (TCA+Supernatant)}}{\text{Protein (flaxseed hydrolysate suspension)}} \times 100$$

۲-۳-۲-فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

برای تشخیص مقدار درصد مهار رادیکال آزاد DPPH، ابتدا پودر نمونه هیدرولیز شده در آب مقطر در غلظت (40 میلی گرم/میلی لیتر) حل شد. سپس، $1/5$ میلی لیتر از هر یک از نمونه ها با $1/5$ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH (0.15mM) مخلوط شد و به فاصله زمانی ۲۰ ثانیه ورتکس گردیدند. در ادامه، مخلوط حاصل به فاصله زمانی ۳۰ دقیقه در محیط تاریک نگهداری شد؛ و پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه در 2500rpm سانتریفوژ و جذب محلول سوپرناتانت در طول موج 517 نانومتر خوانده شد. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [24]:

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

A_{sample} جذب نمونه و A_{control} جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر را جایگزین نمونه با محلول DPPH مخلوط می شود) می باشد.

۳-۳-۲-فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

در اولین مرحله ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر) با $1/85$ میلی لیتر آب دوبار تقطیر و 0.05 میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (2Mm)

پاسخ های فعالیت آنتی اکسیدانی کل، مهار رادیکال آزاد DPPH، شلاته کنندگی یون Fe^{2+} و درجه هیدرولیز مورد بررسی قرار گرفت. کنسانتره ی پروتئین کنجاله بذر کتان (بدون اعمال پیش تیمار فراصوت و با اعمال پیش تیمار فراصوت) برای انجام هیدرولیز آنزیمی در غلظت ۵ درصد (وزنی/حجمی) در بافر فسفات 0.2M مولار ($pH=7.4$) برای آنزیم پانکراتین و $pH=8$ برای آنزیم آلکالاز) درون ارلن های ۱۰۰ میلی لیتری حل شد؛ و شرایط برای هیدراته شدن مناسب آن با همزدن مداوم در دمای محیط در فاصله زمانی ۳۰ دقیقه فراهم گردید. بعد از آن که دمای انکوباتور به دمای مورد نظر رسید، نمونه ها درون انکوباتور قرار داده شد و در ادامه بعد از ثابت ماندن دمای انکوباتور، آنزیم پانکراتین و آلکالاز به مقادیر بدست آمده توسط نرم افزار (جدول ۱)، به محلول اضافه گردید. پس از طی فاصله های زمانی مورد نظر (210 - 30 دقیقه)، برای غیرفعال کردن آنزیم ها، ارلن ها به مدت ۱۰ دقیقه درون حمام آب $90^{\circ}C$ درجه سانتی گراد قرار گرفت و تا رسیدن به دمای محیط با استفاده از ظرف حاوی یخ سرد گردید. سپس نمونه ها به فاصله زمانی ۲۰ دقیقه با دور $\times g$ ۸۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند و با بکارگیری از سمپلر، مایع رویی آن ها جدا شد و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید و تا زمان انجام آزمون های بعدی بر روی نمونه در دمای $20^{\circ}C$ - درجه سانتی گراد نگهداری شد [22].

Table 1- Determination points for protein hydrolysis of flaxseed meal

Hydrolysis points	time (minutes)	Enzyme concentration (%)
1	30	2
2	56.3604	2.70711
3	56.3604	1.29289
4	120	1
5	120	2
6	120	2
7	120	2
8	120	3
9	183.64	2.70711
10	183.64	1.29289
11	210	2

مخلوط و همزده شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵Mm) افزوده و مخلوط همزده شد. جذب پس از نگهداری مخلوط در دمای محیط (۲۴ درجه) ۱۰ دقیقه در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. به عنوان نمونه شاهد از آب دوبار تقطیر بکار برده شد. فعالیت شلاته کنندگی نمونه ها با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید [25].

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

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

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه هیدرولیز

کنترل پیشرفت هیدرولیز در طول فرآیند هیدرولیز بسیار مهم است، زیرا بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله اسیدهای آمینه آزاد، میزان حلالیت، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین تولید شده بستگی به شدت و درجه هیدرولیز دارد [27]. با توجه به شکل ۱، در هیدرولیز پروتئین کنجاله کتان با آنزیم پانکراتین بدون پیش تیمار، در غلظت های پایین آنزیم، با افزایش زمان، شاهد کاهش درجه هیدرولیز هستیم، اما در غلظت های بالاتر آنزیم (بیش از ۲ درصد) با افزایش زمان، درجه هیدرولیز را افزایش خواهد یافت. Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) دلیل این وضعیت را اینگونه بیان کردند که با افزایش زمان هیدرولیز، تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس برای آنزیم کاهش می یابد و همچنین فعالیت پروتئولیتیک آنزیم کاهش می یابد که در مجموع باعث کاهش شدت هیدرولیز می شود. از سوی دیگر، تشکیل ترکیباتی که فعالیت آنزیم را مهار می کنند نیز می تواند در این امر دخیل باشد [28].

اما در هیدرولیز پروتئین توسط پانکراتین همراه با اعمال پیش تیمار اولتراسوند با افزایش غلظت در زمان های اولیه هیدرولیز، شاهد افزایش درجه هیدرولیز بودیم. You و همکاران (۲۰۰۹) با هیدرولیز پروتئین امعاء و احشا ماهی کپور سرگنده بیان کردند که افزایش مدت زمان هیدرولیز تا

۴-۳-۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

این شیوه بر اساس احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می باشد که همیشه با تشکیل شدن فسفومولیبدن در محیط اسیدی که کمپلکس سبز رنگی می باشد، همراه است. در این روش ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۲۰ میلی گرم/میلی لیتر) با ۱ میلی لیتر از معرف (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، آمونیوم مولیبدات ۴ میلی مولار و فسفات سدیم ۲۸ میلی مولار) در لوله اپندورف ریخته شد و در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد به فاصله زمانی ۹۰ دقیقه سانتی گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن نمونه ها، جذب آن ها در ۶۹۵ نانومتر خوانده شد. به عنوان نمونه شاهد از آب مقطر دوبار تقطیر در برابر نمونه ها استفاده شد. جذب بیشتر تعیین کننده ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بالاتر است [26].

۴-۲- بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و انتخاب تیمار بهینه

شرایط بهینه هیدرولیز با نرم افزار آماری Design Expert 11 و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی تعیین شد. متغیر های مستقل زمان و غلظت آنزیم مورد آزمایش قرار گرفتند. و فعالیت آنتی اکسیدانی کل، مهار رادیکال آزاد DPPH، شلاته کنندگی یون آهن Fe^{2+} و درجه هیدرولیز به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. بهینه سازی شرایط هیدرولیز با نرم افزار Design expert نسخه ۱۱ و روش سطح پاسخ

بر روی هیدرولیز پروتئین ضایعات پس از پخت ماهی هوور گزارش کردند که مقدار درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد مدت زمان هیدرولیز کاهش یافت [33]. با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش می یابد و باعث تولید پپتیدهای کوچکتر با وزن مولکولی کمتر و زنجیره کوتاه تر می شود. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده، قدرت به دام انداختن رادیکال های آزاد نیز در آن ها افزایش می یابد [28]. بین میزان هیدرولیز و تولید پروتئین های هیدرولیز شده با غلظت آنزیم رابطه خطی وجود دارد. با افزایش غلظت آنزیم، تولید پروتئین های هیدرولیز شده با خواص آنتی اکسیدانی افزایش می یابد [32]. به طور کلی در مقایسه با برخی از پروتئازها، آنزیم آلکالاز کارایی بالاتری در پیشرفت هیدرولیز و تولید پروتئین های هیدرولیز شده با طول زنجیره کوتاه تر و خواص آنتی اکسیدانی بهتر دارد [28].

۲۰ ساعت سبب افزایش میزان درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۳۳ درصد شد [29]. مطالعات نشان داده اند که درمان اولتراسوند منجر به تغییراتی در ساختار ثانویه و سوم پروتئین ها می شود که منجر به باز شدن جزئی ساختار آن ها می شود که باعث قرار گرفتن بهتر پروتئین ها در برابر آنزیم ها می شود [30].

در هیدرولیز با آلکالاز بدون پیش تیمار، افزایش غلظت آنزیم در زمان های کم باعث افزایش درجه هیدرولیز شد، اما با افزایش زمان، غلظت های پایین آنزیم بالاترین درجه هیدرولیز را نشان داد. و در هیدرولیز با پیش تیمار اولتراسوند با افزایش دو متغیر زمان و غلظت آنزیم شاهد افزایش درجه هیدرولیز بودیم. مطالعات نشان داده است که ثابت شدن شیب نمودار افزایش مقدار درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد مدت زمان هیدرولیز پروتئین می تواند به سبب غیرفعال شدن آنزیم پروتئازی، هیدرولیز بیش از حد پروتئین و تاثیر بازدارندگی پپتیدهای تولیدی [31] و کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس برای هیدرولیز باشد [32]. همچنین Sherafat و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهشی مشابه

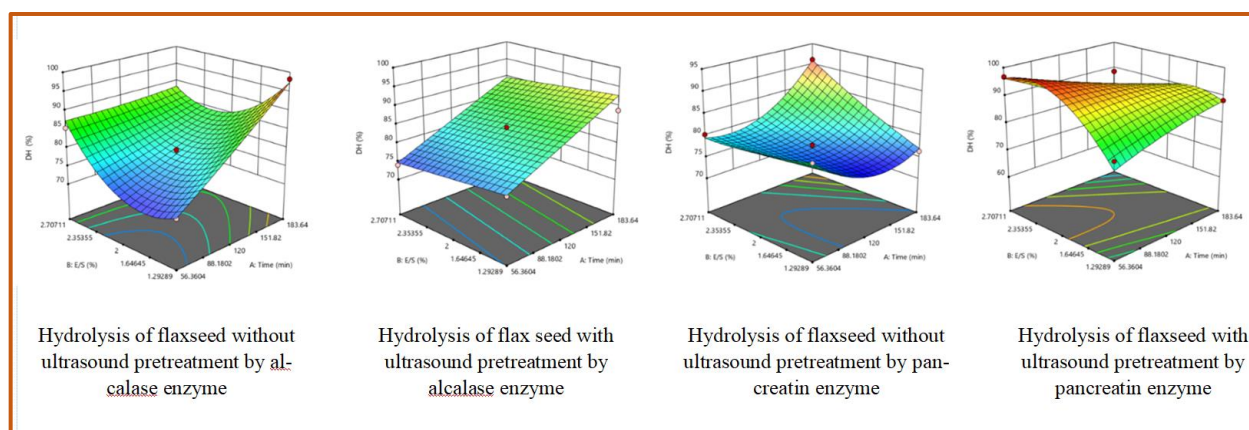


Figure 1- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on degree of hydrolysis of protein hydrolysate

آنتی اکسیدانی می باشند، پایدار شده و جذباتان در ۵۱۷ نانومتر کم می شود [34].

با توجه به شکل ۲، در هیدرولیز پروتئین کنجاله بذر کتان با آنزیم پانکراتین بدون پیش تیمار، با افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا تا ۲ درصد و افزایش زمان تا ۱۲۰ دقیقه، میزان مهار رادیکال آزاد DPPH کاهش یافت. علت کاهش یافتن میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH در نمونه پروتئین هیدرولیز شده

۲-۳- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

رادیکال آزاد DPPH، ترکیب محلول در چربی می باشد؛ این رادیکال دارای بیشینه جذب در ۵۱۷ نانومتر است. رادیکال آزاد DPPH با گرفتن هیدروژن از ترکیباتی که دارای خاصیت

می‌کند. تاثیر منفی اولتراسوند احتمالا به دلیل تغییر در ساختار پروتئین کنجاله کتان و مدفون شدن گروه‌های هیدروفوبیک از سطح به داخل مولکول پروتئین باشد که سبب کاهش برهمکنش بین آنزیم پروتئاز مورد استفاده و گروه‌های هیدروفوبیک شده و کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در پی دارد [40]. همچنین Wang و همکاران (۲۰۱۷) در پژوهشی که بر روی تاثیر پيش تیمار فراصوت بر خواص آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سویا انجام دادند، بیان کردند که افزایش توان فراصوت سبب کاهش معنی‌دار در فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های سویا شد [41]. همچنین Zudaire و همکاران (۲۰۱۹) در بررسی تاثیر پيش تیمار فراصوت بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پیاز سبز گزارش کردند که افزایش توان فراصوت سبب کاهش توانایی هیدرولیز شده‌های پیاز سبز در مهار رادیکال آزاد DPPH شد [42].

در هیدرولیز پروتئین بذر کتان با آنزیم آلکالاز، افزایش فعالیت بازدارندگی این رادیکال آزاد با افزایش زمان همراه با افزایش غلظت آنزیم مشاهده شد، اما با افزایش زمان از ۱۳۸ دقیقه، افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های پایین آنزیم دیده می‌شود. اما در هیدرولیز پروتئین همراه با پيش تیمار اولتراسوند توسط آنزیم آلکالاز، بیشترین مهار این رادیکال آزاد در دقایق اولیه هیدرولیز با غلظت آنزیم کم مشاهده شد. نتایج آزمایش‌ها نشان داده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند. مشابه با این پژوهش، Kaveh و همکاران (۲۰۲۰) نیز در پژوهشی که بر روی هیدرولیز پروتئین شنبلیله انجام دادند، گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH تا حدود ۴۸ درصد شد و افزایش بیشتر زمان تاثیر معنی‌داری بر خواص آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها نداشت [43]. همچنین Zhao و همکاران (۲۰۱۲) با هیدرولیز آنزیمی پروتئین برنج با آنزیم‌های پروتئازی تریپسین، پروتامکس، فلاورزیم، آلکالاز و نوترئاز گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های پروتئین برنج وابسته به

کنجاله بذر کتان با افزایش غلظت آنزیم، احتمالا هیدرولیز بیش از حد پروتئین بذر کتان توسط آنزیم پانکراتین می‌باشد که سبب رهایش کامل آمینواسیدهای آبدوست شده است این امر برهمکنش آمینواسیدهای فعال رها شده را با رادیکال DPPH مشکل می‌کند [35]. سپس با افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا و همچنین افزایش زمان برای بیش از ۱۲۰ دقیقه، شاهد افزایش مهار این رادیکال بودیم. Batista و همکاران (۲۰۱۰)، Umayaparvathi و همکاران (۲۰۱۴) به-ترتیب فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده صدف قرمز و ماهی خرچنگ سیاه را وابسته به غلظت گزارش دادند [36-37].

در هیدرولیز با آنزیم پانکراتین همراه با اعمال پيش تیمار، با افزایش زمان و همزمان با کاهش درصد غلظت آنزیم به سوبسترا، شاهد افزایش مهار رادیکال آزاد DPPH بودیم. مطالعات نشان داده است که احتمالاً پپتیدهای با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا با پیشرفت فرآیند هیدرولیز از بین می‌روند [38]. Xue و همکاران (۲۰۰۸) همچنین نشان دادند که با افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد، فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH افزایش و سپس کاهش می‌یابد و بیان کردند که این امر به دلیل هیدرولیز بیش از حد پروتئین و آزاد شدن کامل اسیدهای آمینه آبدوست و اختلال در اتصال اسیدهای آمینه فعال با رادیکال آزاد DPPH است [39]. مشابه با این نتایج Batista و همکاران (۲۰۱۰) بیان کردند که افزایش درجه هیدرولیز و زمان سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده ماهی خرچنگ سیاه شد. و علت این موضوع را افزایش پپتیدهای دهنده‌ی هیدروژن که دارای قابلیت واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌باشند، بیان کردند [36]. همچنین You و همکاران (۲۰۰۹)، Li و همکاران (۲۰۰۷) و Jamdar و همکاران (۲۰۱۰)، نیز به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین‌های ماهی لوک، کلاژن و سویا تاثیر مثبت درجه هیدرولیز و زمان را بر مهار رادیکال DPPH گزارش کردند [21-25-29]. بنابراین در این هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم و همچنین افزایش زمان که باعث افزایش هیدرولیز می‌شود از فعالیت این رادیکال آزاد جلوگیری

گزارش کردند که در هیدرولیز پروتئین دانه هندوانه، اعمال پیش تیمار فراصوت با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و توان ۲۰۰ وات تاثیر مثبتی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشت [46]. همچنین Uluko و همکاران (۲۰۱۵) در پژوهشی بر روی هیدرولیز پروتئین شیر پزارش کردند که، با اعمال پیش تیمار فراصوت به مدت ۱۰ دقیقه و با توان ۸۰۰ وات و فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های با اعمال پیش تیمار به طور معنی‌داری نسبت به نمونه‌های شاهد (بدون اعمال فراصوت) افزایش یافت ($p < 0.05$) [47].

غلظت بود و بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پروتامکس بود [44].

نتایج هیدرولیز پروتئین بادام توسط آنزیم آلکالاز نیز نشان داده است که با افزایش درجه هیدرولیز از ۱۰ درصد به ۲۰ درصد، فعالیت بازدارندگی رادیکال‌های DPPH نیز افزایش می‌یابد [25]. بهبود فعالیت مهار رادیکال DPPH با استفاده از پیش تیمار فراصوت احتمالاً به سبب پدیده کاویتاسیون می‌باشد که به‌طور معنی‌دار و قابل توجهی سبب کاهش اندازه در پروتئین و تغییر ساختار آن شده و با افزایش سطح تماس در میان گروه‌های هیدروفوب منجر به افزایش واکنش رادیکال‌های آزاد با پپتیدهای زیست فعال تولید شده می‌گردد [45]. در تطابق با این یافته‌ها Wen و همکاران (۲۰۱۹)

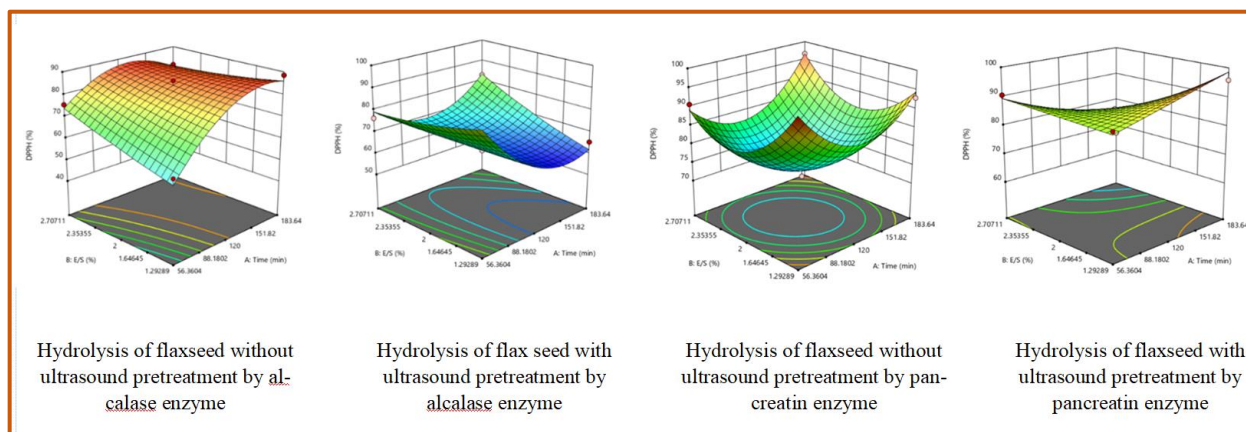


Figure 2- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysate

افزایشی قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن هستیم. تاثیر مثبت و موثر افزایش غلظت آنزیم پانکراتین بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده کنجاله کتان می‌تواند به علت افزایش جایگاه‌های فعال آنزیم در دسترس در محیط برای هیدرولیز پروتئین و در نتیجه آن، شکستن و فروپاشی بیشتر پیوندهای پپتیدی و افزایش حلالیت پپتیدهای تولید شده باشد که تاثیر مثبتی بر فعالیت شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز دارند [49]. مشابه با این نتایج، Klompong و همکاران (۲۰۰۷)، Xie و همکاران (۲۰۰۸) و مقصودلو و همکاران (۲۰۱۶) به ترتیب تاثیر مثبت و بهبوددهنده غلظت را بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده

۳-۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

یون Fe^{2+} کاتالیزور واکنش هابرویس است که باعث تولید رادیکال‌های هیدروکسیل می‌شود. این رادیکال‌ها بسیار خطرناک هستند، زیرا به سرعت با مولکول‌های بیولوژیکی اطراف خود واکنش نشان می‌دهند و باعث ایجاد اختلال می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌ها با شلاته‌کردن یون‌های فلزی، رادیکال‌های هیدروکسیل را مهار می‌کنند. شلاته‌کردن یون آهن یکی از این نوع واکنش‌ها است [48]. با توجه به شکل ۳، در هیدرولیز بدون پیش تیمار با آنزیم پانکراتین، با افزایش زمان و همچنین افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا، شاهد روند

از حد زمان هیدرولیز پروتئین بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن می‌تواند به علت کاهش کارایی و بازده آنزیم در تولید پپتیدهایی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مناسب به سبب رهاش ترکیبات بازدارنده آنزیم در مدت زمان هیدرولیز طولانی است؛ همچنین تولید پپتیدهایی با خاصیت مناسب و کافی شلاته‌کنندگی یون آهن در اوایل فرآیند هیدرولیز، احتمالاً دلیل دیگری بر تاثیر منفی هیدرولیز پروتئین در مدت زمان‌های طولانی بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن باشد [28]. تحقیق Wang و همکاران (۲۰۱۷) نشان داد که پپتیدهای به دست آمده از هیدرولیز پروتئین سویا با استفاده از آنزیم پروتئاز *Bacillus altitudinis* دارای فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بسیار بالایی هستند [41]. پروتئین هیدرولیز شده نخود با استفاده از ترمولیزین نیز ۹۵ درصد از فعالیت شلاته‌کنندگی یونی را نشان داد [53]. این نتایج مشابه یافته‌های Kaveh و همکاران (۲۰۲۲) در هیدرولیز پروتئین دانه‌های شنبلیله با آنزیم تریپسین و پپسین بود که بیان کردند، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه اول سبب افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده گردید؛ اما افزایش بیشتر مدت زمان هیدرولیز پروتئین تاثیر معنی‌داری بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن نداشت [54].

ماهی خط زرد، یونجه و گرده گل گزارش کردند [50-51-52]. مشاهده شده است که توانایی شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین‌های هیدرولیز شده به آنزیم مورد استفاده، ترکیب و نوع آمینواسیدی پروتئین اولیه و درجه هیدرولیز وابسته است [28]. قدرت شلاته‌کردن یون آهن به درجه هیدرولیز، نوع آنزیم و ماهیت پروتئین اولیه بستگی دارد [19]. بنابراین آنزیم پانکراتین عملکرد خوبی در تولید پپتیدهایی دارد که یون‌های آهن را به دام می‌اندازند. در هیدرولیز با استفاده از پیش‌تیمار اولتراسوند، این فرآیند به این صورت است که با افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا تا زمانی که زمان به ۱۴۹ دقیقه افزایش یابد، شاهد افزایش قدرت کیلیت یون آهن هستیم و از دقیقه ۱۴۹، با وجود افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا، شاهد کاهش قدرت کیلیت یون هستیم.

در هیدرولیز پروتئین بدون پیش‌تیمار با آنزیم آلکالاز، شاهد افزایش شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش زمان تا ۱۴۶ دقیقه و افزایش غلظت تا ۲/۲ درصد بودیم و پس از آن، شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش زمان و غلظت کاهش یافت. در هیدرولیز با پیش‌تیمار اولتراسوند، مشاهده شد که فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش غلظت در دقایق اولیه هیدرولیز افزایش می‌یابد. و ما افزایش شلاته‌کنندگی را در غلظت‌های پایین آنزیم آلکالاز در بهترین زمان تعیین شده برای این هیدرولیز مشاهده کردیم. تاثیر منفی افزایش بیش

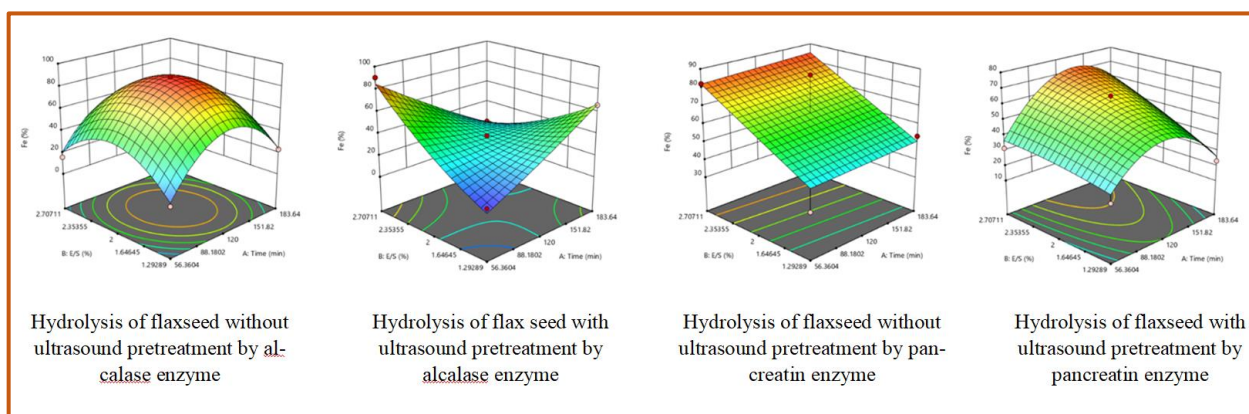


Figure 3- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on Fe^{2+} chelating activity activity of protein hydrolysate

۴-۳-آنتی‌اکسیدان کل

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل بر اساس اندازه گیری قدرت کاهندگی مولیبدن (VI) به مولیبدن (V) و تشکیل کمپلکس فسفومولیبدن سبز در شرایط اسیدی انجام می شود. با توجه به شکل ۴، در هیدرولیز بذر کتان با آنزیم پانکراتین بدون اعمال پیش تیمار اولتراسوند، با افزایش زمان و همچنین افزایش مقدار غلظت آنزیم، فعالیت آنتی اکسیدانی کل پپتیدهای کنجاله بذر کتان افزایش می یابد. در هیدرولیز با پانکراتین و همراه با اعمال پیش تیمار اولتراسوند، با افزایش غلظت آنزیم در بستر و با کاهش زمان، فعالیت آنتی اکسیدانی کل افزایش می یابد. افزایش غلظت آنزیم نشان دهنده عملکرد مناسب آنزیم پانکراتین است که باعث تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهی و در نتیجه تبدیل رادیکال های آزاد به ترکیبات پایدارتر می شود [55]. اعمال فراصوت بر روی پروتئین باعث باز شدن بیشتر ساختارهای پروتئینی می شود و آنزیم در زمان کوتاه تری (در ابتدای هیدرولیز) پپتیدهای آنتی اکسیدانی آزاد می کند و پس از آن با افزایش زمان افزایش این پپتیدها و سپس افزایش جذب مشاهده می شود. همچنین Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده نوعی کوسه (کوسه صیقلی) را وابسته به غلظت گزارش کردند [56].

در هیدرولیز پروتئین بذر کتان با آنزیم آلکالاز، با افزایش زمان و همچنین افزایش غلظت آنزیم، شاهد افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل هستیم. و در هیدرولیز با پیش تیمار اولتراسوند توسط آنزیم آلکالاز مشاهده شد که فعالیت آنتی اکسیدانی کل با افزایش غلظت آنزیم در دقایق اولیه هیدرولیز افزایش می یابد. به طور کلی، آنزیم آلکالاز نوعی آنزیم اندوپپتیداز است که می تواند پیوندهای پپتیدی را از داخل زنجیره بشکند و منجر به آزاد شدن الیگوپپتیدها یا پلی پپتیدهایی با طول زنجیره متوسط تا کوتاه و همچنین پپتیدهای حاوی اسیدهای آمینه آبگریز شود. نتایج تحقیق نشان داد که وجود اسیدهای آمینه آبگریز مانند والین، فنیل

آلانین، ایزولوسین و لوسین در پروتئین های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز نقش بسیار مهمی در فعالیت آنتی اکسیدانی کل دارد [57]. افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز می تواند به سبب تولید پپتیدهای دارای خواص الکترون دهنده باشد که موجب تبدیل رادیکال های آزاد به ترکیباتی پایدارتر می شوند که این موضوع سبب باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شده است [58]. مشابه با این یافته ها مظلومی و همکاران (۲۰۱۸) در پژوهشی که بر روی هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با آنزیم آلکالاز داشتند، گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز تاثیر مثبتی بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین های هیدرولیز شده هسته پرتقال داشت و بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پس از ۴/۸ ساعت هیدرولیز به دست آمد [59]. همچنین Kaveh و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که در هیدرولیز پروتئین شنبلیله با آنزیم پانکراتین، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۰ دقیقه سبب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده های حاصل شد و هیدرولیز بیشتر پروتئین بر روی آنتی اکسیدانی کل این نمونه ها تاثیر معنی دار نداشت [43]. از طرف دیگر تاثیر مثبت پیش تیمار اولتراسوند بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل نمونه ها می تواند به علت مکانیسم کاویتاسیون باشد که سبب به وجود آمدن تنش در سوپسترای پروتئینی شده و سبب از هم گسستن و جداسازی در ساختار آن می شود، به همین علت پروتئین بیشتر در معرض فعالیت آنزیم پروتئاز قرار می گیرد و در نهایت رهایش و آزادسازی پپتیدهای آنتی-اکسیدانی بیشتر می شود [60]. مشابه با این یافته ها Wen و همکاران (۲۰۱۸) و Fadimu و همکاران (۲۰۲۱) به ترتیب افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی گیاه سینگونیوم و لوبیای لوبین را با اعمال پیش تیمار اولتراسوند گزارش کردند [61-62].

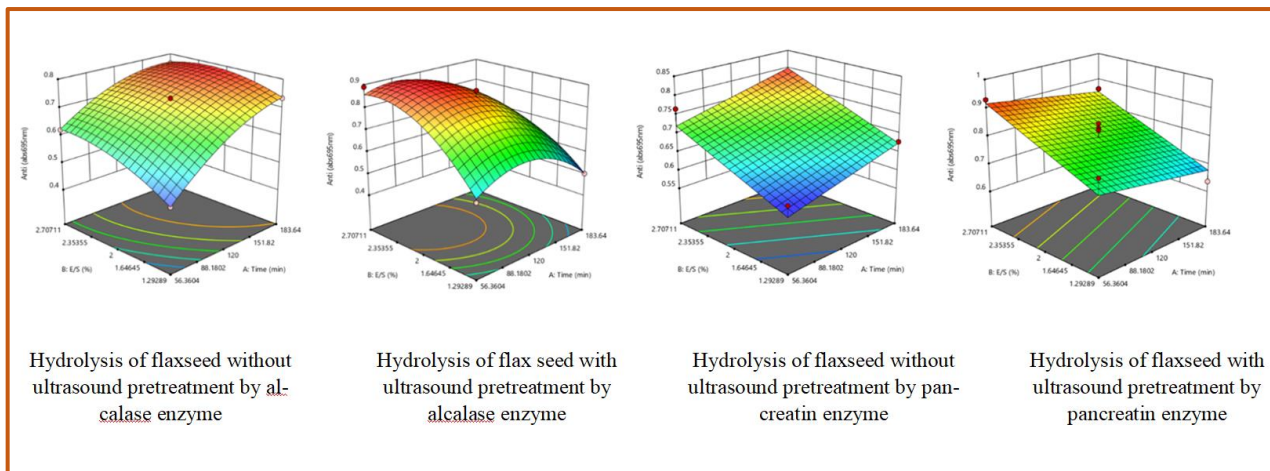


Figure 4- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on total antioxidant capacity of protein hydrolysate

هیدرولیز شده با پانکراتین همراه با پیش تیمار فراصوت و بدون اعمال آن اختلاف معنادار وجود داشت ($p < 0.05$)؛ نشان داده شد که پیش تیمار فراصوت دارای اثر بهبود دهنده بر درجه هیدرولیز پروتئین های هیدرولیز شده دارد. این روند در مورد هیدرولیز با آنزیم آلكالاز معکوس بود.

۳-۵- بهینه سازی فرآیند هیدرولیز

۳-۵-۱- درجه هیدرولیز

با توجه به نمودار ۵، بیشترین درصد درجه هیدرولیز (۸۰٪/۶۹) مربوط به بهینه پروتئین هیدرولیز شده با پانکراتین و همراه با پیش تیمار فراصوت بوده است. بین پروتئین

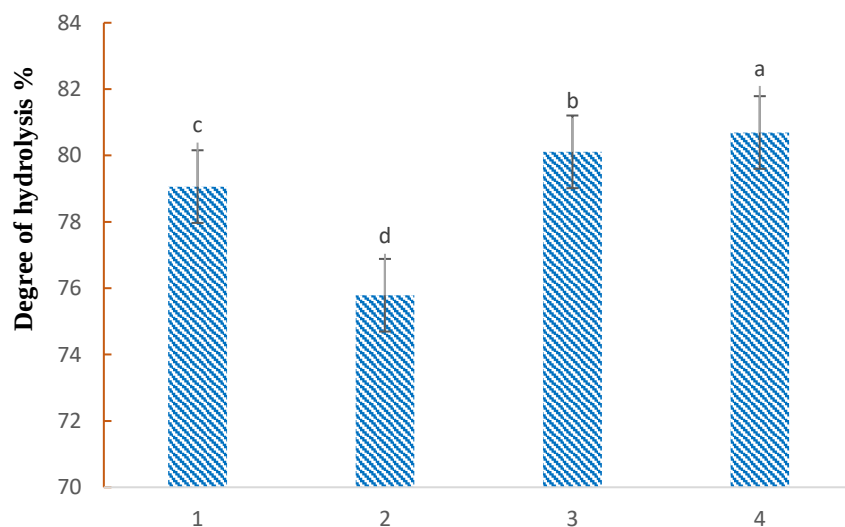


Figure 5- The degree of hydrolysis of optimized treatments.

treatment 1 (hydrolysis of protein with alcalase), treatment 2 (hydrolysis of protein with alcalase, combined with ultrasound pretreatment), treatment 3 (hydrolysis with pancreatin) and treatment 4 (hydrolysis with pancreatin, combined with ultrasound pretreatment); Means with the same letters in each column show no significant difference at the 0.05 level

با توجه به نمودار ۶، بیشترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH (۸۷٪/۸۲) مربوط به نقطه بهینه پروتئین هیدرولیز شده

۳-۵-۲- فعالیت مهار رادیکال DPPH

پروتئین کنجاله بذر کتان با آنزیم آلکالاز می باشد. این روند در هیدرولیز با آنزیم پانکراتین، نتیجه عکس داشت؛ و فراصوت سبب کاهش این فعالیت در پروتئین هیدرولیز شده گردید.

با آنزیم پانکراتین بدون پیش تیمار می باشد. اختلاف معنی داری بین هیدرولیز پروتئین بدون پیش تیمار و با پیش تیمار فراصوت توسط آنزیم آلکالاز وجود داشت ($p < 0.05$). این اختلاف نشان دهنده آن است که پیش تیمار فراصوت سبب بهبود فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در هیدرولیز

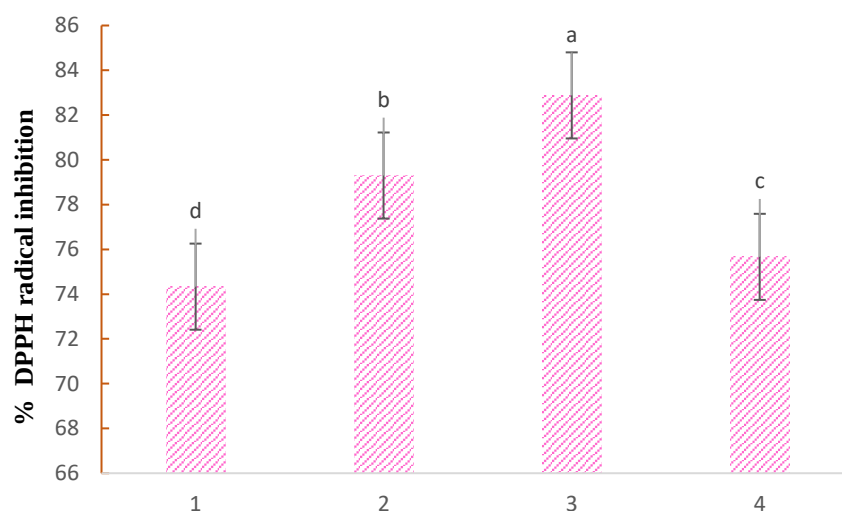


Figure 6- DPPH radical scavenging activity of optimized treatments.

treatment 1 (protein hydrolysis with alcalase), treatment 2 (protein hydrolysis with alcalase, combined with ultrasound pretreatment), treatment 3 (hydrolysis with pancreatin) and treatment 4 (hydrolysis with pancreatin, combined with ultrasound pretreatment); Means with the same letters in each column show no significant difference at the 0.05 level

فراصوت می باشد. در هیدرولیز پروتئین با هر دو آنزیم، اختلاف معناداری بین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده با پیش تیمار و بدون پیش تیمار مشاهده شد ($p < 0.05$)؛ که نشان می دهد پیش تیمار فراصوت سبب بهبود فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در پروتئین هیدرولیز شده گردید.

۳-۵-۳- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

با توجه به نمودار ۷، بیشترین فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در بین تیمارهای این پژوهش مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پانکراتین همراه با اعمال پیش تیمار

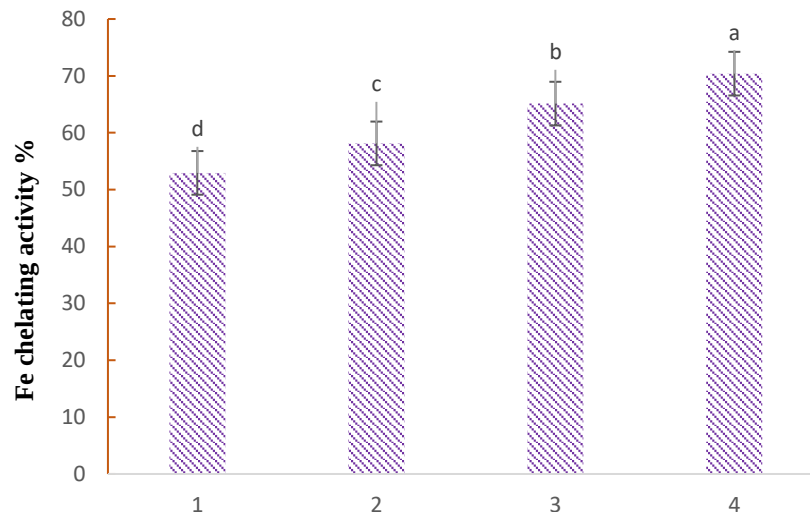


Figure 7. Fe chelating activity of optimized treatments.

treatment 1 (hydrolysis of protein with alcalase), treatment 2 (hydrolysis of protein with alcalase, combined with ultrasound pretreatment), treatment 3 (hydrolysis with pancreatin) and treatment 4 (hydrolysis with pancreatin, combined with ultrasound pretreatment); Means with the same letters in each column show no significant difference at the 0.05 level

آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم پانکراتین و آلکالاز همراه با پیش تیمار فراصوت مشاهده نشد ($p < 0.05$). اما در هیدرولیز پروتئین با هردو آنزیم، اختلاف معنادار بین نمونه با پیش تیمار و بدون پیش تیمار وجود داشت؛ که نشان دهنده آن است که فراصوت تاثیر بهبوددهنده‌ای بر فعالیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین‌های هیدرولیز شده گذاشته است.

۴-۵-۳- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

با توجه به نمودار ۸، بالاترین میزان جذب آنتی اکسیدانی کل در ۶۹۵ نانومتر (۰/۸۶) مربوط به نقطه بهینه پروتئین هیدرولیز شده توسط پانکراتین همراه با اعمال پیش تیمار فراصوت میباشد. اگرچه تفاوت معناداری بین فعالیت

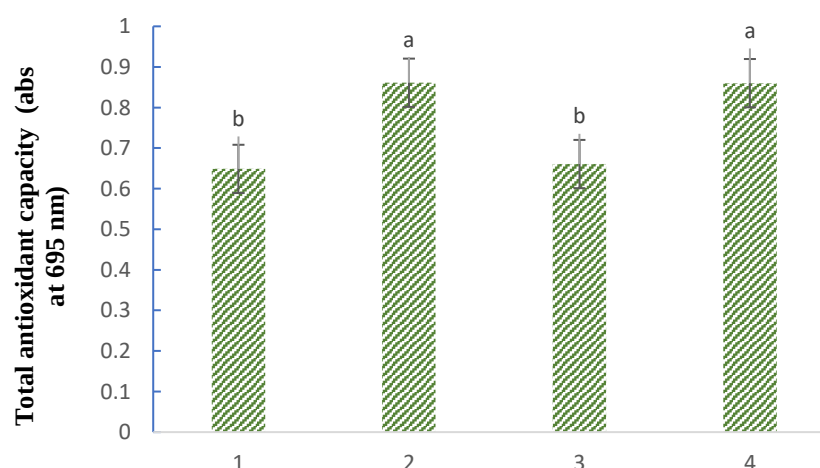


Figure 8. Total antioxidant capacity of optimized treatments.

treatment 1 (hydrolysis of protein with alcalase), treatment 2 (hydrolysis of protein with alcalase, combined with ultrasound pretreatment), treatment 3 (hydrolysis with pancreatin) and treatment 4 (hydrolysis with pancreatin, combined with ultrasound pretreatment); Means with the same letters in each column show no significant difference at the 0.05 level

(شکل ۹). تصاویر به دست آمده نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده با پیش تیمار اولتراسوند دارای ساختاری منظم و همگن می‌باشد؛ و به عبارتی پراکندگی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار دارد. ساختار پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار متراکم است.

۶-۳- تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

دو نمونه از پروتئین هیدرولیز شده، با پیش تیمار اولتراسوند و بدون پیش تیمار با میکروسکوپ الکترونی تصویربرداری شد

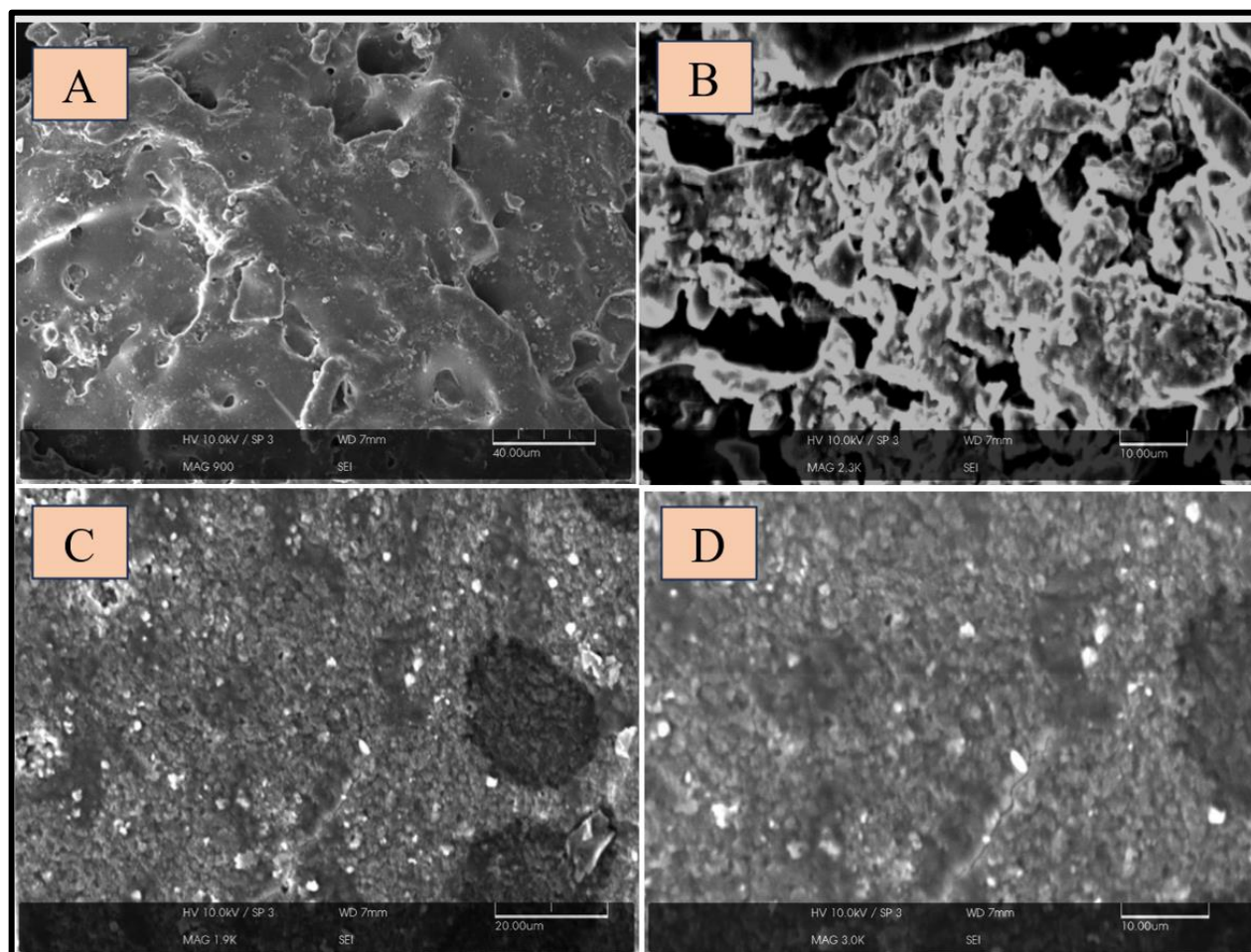


Figure 9 - Images A and B are related to hydrolyzed protein without pretreatment. And pictures C and D are related to hydrolyzed protein with ultrasound pretreatment

۴- نتیجه گیری

کنجاله بذر کتان دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا از جهت پاسخ به آزمون‌های آنتی اکسیدانی کل، شلاته‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال آزاد DPPH و درجه هیدرولیز بود. همچنین، ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تحت تاثیر متغیرهای زمان هیدرولیز، غلظت آنزیم، نوع آنزیم و پیش تیمار فراصوت بود. در مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی بین تیمارهای مورد بررسی در این پژوهش (هیدرولیز با آنزیم پانکراتین، با پیش تیمار فراصوت و بدون پیش تیمار و

در این پژوهش، تاثیر پیش تیمار فراصوت بر هیدرولیز پروتئین کنجاله بذر کتان که تحت متغیرهای زمان (۳۰-۱۸۳/۶۴ دقیقه)، غلظت آنزیم (۱-۲/۷٪) و نوع آنزیم پروتئازی (آلکالاز و پانکراتین) انجام گرفت؛ به جهت دستیابی به بهینه فعالیت آنتی اکسیدانی، مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده، پروتئین هیدرولیز شده

آنتی اکسیدانی بالا این محصول می توان پس از انجام مطالعات بالینی بر روی آن، از پروتئین هیدرولیز شده کنجاله بذر کتان به عنوان آنتی اکسیدان گیاهی در فرمولاسیون های غذایی جهت تولید محصولات فراسودمند در رژیم های غذایی مختلف بهره مند شد.

هیدرولیز با آنزیم آلکالاز، با پیش تیمار فراصوت و بدون پیش تیمار) مشخص شد که، پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم پانکراتین تحت پیش تیمار فراصوت در بهینه زمان هیدرولیز ۱۱۱/۷۷ دقیقه و غلظت آنزیم پانکراتین ۲/۲۶٪ دارای بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. با توجه به پتانسیل

۶- منابع

- [1] 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), pp.135-150.
- [2] Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Kaveh, S., & Mousavifard, M. (2022). Hypocholesterolemic, antidiabetic and bioactive properties of ultrasound-stimulated exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 28, 100334.
- [3] Kaveh, S., Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Amiri, M. J., & Conte, F. L. (2023). Bio-preservation of meat and fermented meat products by lactic acid bacteria strains and their antibacterial metabolites. *Sustainability*, 15(13), 10154.
- [4] Pihlanto, A. (2006). Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*, 16(11), 1306-1314.
- [5] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M., Sarabandi, K. (2019). Optimization of production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed. *Journal of Food Science and Technology*, 15 (84), pp. 75-88.
- [6] Dziuba, B., & Dziuba, M. (2014). Milk proteins-derived bioactive peptides in dairy products: molecular, biological and methodological aspects. *Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria*, 13(1), 5-26.
- [7] Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2012). Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of food science*, 77(1), R11-R24.
- [8] Silva, S., Almeida, A. J., & Vale, N. (2019). Combination of cell-penetrating peptides with nanoparticles for therapeutic application: a review. *Biomolecules*, 9(1), 22.
- [9] Sánchez, A., & Vázquez, A. (2017). Bioactive peptides: A review. *Food Quality and Safety*, 1(1), 29-46.
- [10] Hoshlar, L., Manafi Dizj Yakan, M., Jafarizadeh Malmiri, H., Hesari, J., Azadmard Demirchi, S., & Sadif. (2021). Investigating some physicochemical, sensory and antioxidant properties of mixed formulated fruit juices. *Innovation in Food Science and Technology*, 13(4), 95-83.
- [11] Marambe, H. K., & Wanasundara, J. P. D. (2017). Protein from flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). In *Sustainable protein sources* (pp. 133-144). Academic Press.
- [12] Adjonu, R., Doran, G., Torley, P., & Agboola, S. (2013). Screening of whey protein isolate hydrolysates for their dual functionality: Influence of heat pre-treatment and enzyme specificity. *Food chemistry*, 136(3-4), 1435-1443.
- [13] Hernández-Ledesma, B., del Mar Contreras, M., & Recio, I. (2011). Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Advances in colloid and interface science*, 165(1), 23-35.
- [14] 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*.
- [15] Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., ... & Zhang, Q. (2008). Natural variation in *Ghd7* is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature genetics*, 40(6), 761-767.
- [16] Chandrapala, J., Zisu, B., Palmer, M., Kentish, S., & Ashokkumar, M. (2011). Effects of ultrasound on the thermal and structural characteristics of proteins in reconstituted whey protein

- concentrate. *Ultrasonics sonochemistry*, 18(5), 951-957.
- [17] Jambrak, A. R., Mason, T. J., Lelas, V., Paniwnyk, L., & Herceg, Z. (2014). Effect of ultrasound treatment on particle size and molecular weight of whey proteins. *Journal of Food engineering*, 121, 15-23.
- [18] O'sullivan, J., Murray, B., Flynn, C., & Norton, I. (2016). The effect of ultrasound treatment on the structural, physical and emulsifying properties of animal and vegetable proteins. *Food hydrocolloids*, 53, 141-154.
- [19] Hasan, M. O., Hasan, T. K., & Naji, S. A. H. (2020, August). Effect of adding pumpkin and flax oil to diets on the meats physical and chemical traits of broilers. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science* (Vol. 553, No. 1, p. 012009). IOP Publishing.
- [20] Feyzi, S., Varidi, M., Zare, F. and Varidi, M.J., 2018. Effect of drying methods on the structure, thermo and functional properties of fenugreek (*Trigonella foenum graecum*) protein isolate. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 98(5), pp.1880-1888.
- [21] Li, B., Chen, F., Wang, X., Ji, B., and Wu, Y. 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 102, 1135-1143.
- [22] Adjonu, R., Doran, G., Torley, P. and Agboola, S., 2014. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. *Journal of Food Engineering*, 122, pp.15-27.
- [23] Kruger, N.J., 2009. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, pp.17-24.
- [24] Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9-10), pp.949-957.
- [25] Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M.D., Juan, F., Yardi, V. and Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 121: 178-184.
- [26] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K. (2019). 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).
- [27] 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
- [28] Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), pp.238-242.
- [29] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B., 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), pp.235-240.
- [30] Xue, F., Wu, Z., Tong, J., Zheng, J., & Li, C. (2017). Effect of combination of high-intensity ultrasound treatment and dextran glycosylation on structural and interfacial properties of buckwheat protein isolates. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81(10), 1891-1898.
- [31] Richardson, T., and Hyslop, D.B. 1985. Enzymes. Ch. 6 in Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed.), p. 371-476. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [32] Guérard, F., Guimas, L. and Binet, A.J.J.O.M.C.B.E., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 19, pp.489-498.
- [33] Sherafat, N., Motamedzadegan, A. and Safari, R., 2013. The effect of hydrolyzing time on cooked tuna fish (Skipjack tuna) wastes by alcalase on protein recovery and the hydrolysate molecular weight. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5(3).
- [34] Wang, Y., Wang, Z., Handa, C.L. and Xu, J., 2017. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their

- hydrolysates. *Food Chemistry*, 218, pp.165-172.
- [35] Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H. and Kaveh, S., 2022. Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase. *Food Engineering Research*, 21(2), pp.75-90.
- [36] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., and Nunes, M. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, 45: 18-24.
- [37] Umayaparvathi, S., Meenakshi, S., Vimalraj, V., Arumugam, M., Sivagami, G. and Balasubramanian, T., 2014. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptide from enzymatic hydrolysate of oyster (*Saccostrea cucullata*). *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 4(3), pp.343-353.
- [38] Meshginfar, N., Sadeghi Mahonak, A., Ghorbani, M., Ziaiefar, A., Kashaninejad, K. 2014. Optimizing the production of hydrolyzed protein from by-products of the meat industry using the response surface method. *Food Industry Research*, 24(2), 225-215.
- [39] Xue, W., Xing, Y., Weng, X., Zhao, Y., Tang, W., Wang, L., ... & Zhang, Q. (2008). Natural variation in Ghd7 is an important regulator of heading date and yield potential in rice. *Nature genetics*, 40(6), 761-767.
- [40] Jiang, L., Wang, J., Li, Y., Wang, Z., Liang, J., Wang, R., Chen, Y., Ma, W., Qi, B. and Zhang, M., 2014. Effects of ultrasound on the structure and physical properties of black bean protein isolates. *Food Research International*, 62, pp.595-601.
- [41] Wang, Y., Wang, Z., Handa, C.L. and Xu, J., 2017. Effects of ultrasound pre-treatment on the structure of β -conglycinin and glycinin and the antioxidant activity of their hydrolysates. *Food Chemistry*, 218, pp.165-172.
- [42] Zudaire, L., Lafarga, T., Viñas, I., Abadias, M., Brunton, N. and Aguiló-Aguayo, I., 2019. Effect of ultrasound pre-treatment on the physical, microbiological, and antioxidant properties of calçots. *Food and Bioprocess Technology*, 12(3), pp.387-394.
- [43] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Sarabandi K. (2020). Comparison of antioxidant properties of fenugreek seed protein hydrolyzed with alcalase and pancreatin. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 11(4), 77-88.
- [44] Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Chen, X.D., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q., 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food chemistry*, 134(3), pp.1360-1367.
- [45] Weiss, J., Gulseren, I. and Kjartansson, G., 2011. Physicochemical effects of high-intensity ultrasonication on food proteins and carbohydrates. *Nonthermal processing Technologies for Food*, pp.109-130.
- [46] Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Duan, Y. and Ma, H., 2019. Effects of divergent ultrasound pretreatment on the structure of watermelon seed protein and the antioxidant activity of its hydrolysates. *Food chemistry*, 299, p.125165.
- [47] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J. and Lv, J., 2015. Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18, pp.1138-1146.
- [48] Afanas' ev, Y. V., & Shlyaptsev, V. N. (1989). Formation of a population inversion of transitions in Ne-like ions in steady-state and transient plasmas. *Soviet Journal of Quantum Electronics*, 19(12), 1606.
- [49] Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D., 2008. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 73(5), pp.C405-C412.
- [50] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and 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), pp.1317-1327.
- [51] Xie, Z., Huang, J., Xu, X. and Jin, Z., 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. *Food chemistry*, 111(2), pp.370-376.
- [52] Maqsoodlou, A. Sadeghi Mahonek, A. Mohebuddini, H. 2016. Investigating the antioxidant properties of bee pollen hydrolyzed protein. *Iran Journal of Food Sciences and Industries*, 14(73), 240-227.
- [53] Pownall, T. L., Udenigwe, C. C., & Aluko, R. E. (2010). Amino acid composition and antioxidant properties of pea seed (*Pisum*

- sativum L.) enzymatic protein hydrolysate fractions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(8), 4712-4718.
- [54] Kaveh, S., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M. and 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, p.114908.
- [55] Mohammadi, Adele, Arabshahi Deloui, Zinoviadou, Kiriaki, Galanakis, & Charis. (2017). Antioxidant Properties of Various Solvent Extracts of Indian Frankincense (*Boswellia serrata*) Oleogum Resin. *Iran Food Science and Industry Research Journal*, 13(3), 28-38.
- [56] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, 114(4), pp.1198-1205.
- [57] Torruco-Uco, J., Chel-Guerrero, L., Martínez-Ayala, A., Dávila-Ortíz, G., & Betancur-Ancona, D. (2009). Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activities of protein hydrolysates from *Phaseolus lunatus* and *Phaseolus vulgaris* seeds. *LWT-Food Science and Technology*, 42(10), 1597-1604.
- [58] Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*, 102(4), pp.1233-1240.
- [59] Mazloumi, S. N., Sa Sadeghi Mahonek, A., Ghorbani, M., Houshmand, G. 2018. Determining the optimal conditions for the production of antioxidant peptides obtained from the hydrolysis of orange core protein with alcalase enzyme. *Iranian journal of food science and industry*. 16(88), 343-356.
- [60] Weiss, J., Gulseren, I. and Kjartansson, G., 2011. Physicochemical effects of high-intensity ultrasonication on food proteins and carbohydrates. *Nonthermal processing Technologies for Food*, pp.109-130.
- [61] Wen, C., Zhang, J., Zhou, J., Duan, Y., Zhang, H. and Ma, H., 2018. Effects of slit divergent ultrasound and enzymatic treatment on the structure and antioxidant activity of arrowhead protein. *Ultrasonics sonochemistry*, 49, pp.294-302.
- [62] Fadimu, G.J., Gill, H., Farahnaky, A. and 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), pp.2004-2019.



Investigating the effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant properties of hydrolyzed protein from flaxseed meal using alcalase and pancreatin enzymes by response surface method

Faezeh Farzanfar¹, Alireza Sadeghi Mahoonak^{2*}, Mohammad Ghorbani³, Seyed Hossein Hosseini Qaboos⁴, Shima Kaveh⁵

1- Master's student in food chemistry, 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

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

4-Assistant Professor, Department of Food Science and Industry, Islamic Azad University, Azadshahr branch

5-Ph.D. of Food Chemistry, Department of Food Science and Industry, Faculty of Food Industry, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/12/8

Accepted: 2024/1/22

Keywords:

antioxidant,
bioactive peptide,
ultrasound
flaxseed,
enzymatic hydrolysis,
response surface.

DOI: 10.22034/FSCT.21.147.187.

*Corresponding Author E-Mail:
Sadeghiaz@yahoo.com

ABSTRACT

In recent years, researchers have identified and extracted bioactive peptides with acceptable antioxidant properties from animal and vegetable protein sources. According to research, "Flaxseed meal" which is the main by-product of the linseed oil extraction process; It contains a large amount of protein, which can be obtained by enzymatic hydrolysis to peptides with antioxidant properties. In this research, the effect of hydrolysis conditions (enzyme concentration 2.7-1% and time 30-183.64 minutes), type of protease (pancreatin and alcalase) and ultrasound pretreatment on the degree of hydrolysis and antioxidant properties (DPPH free radical inhibition, Total antioxidant activity and iron ion chelation) of hydrolyzed protein obtained from flaxseed meal were evaluated using the response surface method. The results showed that the optimal conditions for the production of hydrolyzed protein with the most antioxidant properties with alcalase enzyme with and without pretreatment and pancreatin enzyme with and without pretreatment respectively were: hydrolysis time 79, 146/79, 111.77 and 97.21 minutes and enzyme concentration 2.29%, 1.46%, 2.26% and 1.38%; According to the obtained results, by examining the degree of hydrolysis and antioxidant properties of the hydrolyzed proteins of flaxseed meal, hydrolyzed protein with pancreatin enzyme was suggested as the optimal treatment. Hydrolyzed protein with pancreatin enzyme with ultrasound pretreatment was reported to have 75.66% DPPH free radical inhibition, 70.39% iron ion chelating activity, total antioxidant activity with absorbance of 0.86 nm and 80.69% hydrolysis degree. Therefore, it can be stated that the hydrolyzed protein of flax seed meal with strong antioxidant capacity is a bioactive compound for use in food formulations and the production of beneficial products.