



## The Effect of Ultrasound Pretreatment on Hydrolysis Time by Pepsin Enzyme to Produce Antioxidant Peptides from Edible Mushroom (*Agaricus bisporus*) Protein

I. Izanloo<sup>1</sup>, A.R. Sadeghi Mahoonak<sup>2\*</sup>

1 and 2- M.Sc. Student and Professor, Department of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran, respectively.

(\* - Corresponding Author Email: [sadeghiaz@gau.ac.ir](mailto:sadeghiaz@gau.ac.ir))

Received: 2022.10.20  
Revised: 2023.03.02  
Accepted: 2023.04.29  
Available Online: 2023.04.29

### How to cite this article:

Izanloo, I., & Sadeghi Mahoonak, A.R. (2023). The effect of ultrasound pretreatment on hydrolysis time by pepsin enzyme to produce antioxidant peptides from edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 19(5), 693-709. (In Persian with English abstract). <https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

### Introduction

Free radicals originate from oxidation reactions decrease food quality and also promote incidence of various diseases such as cancer. In this regard, the use of natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, is of interest to many researchers. Food-derived bioactive peptides, can play an important role in the oxidative systems. Ultrasound, as a cheap and green technology, is widely used to extract proteins and antioxidant compounds. Ultrasound pretreatment before enzymatic hydrolysis can open the protein structure and increase the intensity of proteolysis by increasing the exposure of peptide bonds prone to enzymatic hydrolysis; which increases the production efficiency of bioactive peptides. Ultrasound treatment changes the three-dimensional structure of proteins. Therefore, a combination of pretreatment with ultrasound and sequential enzymatic hydrolysis can be a promising way to modify the function of proteins.

### Materials and Methods

In this research the effect of hydrolysis time and ultrasonic pretreatment on enzymatic hydrolysis of edible mushroom protein by pancreatic enzyme to produce peptides with high antioxidant capacity was evaluated. First edible mushroom was turned into powder and then, in order to optimize the production of hydrolyzed proteins with maximum antioxidant activity, the hydrolysis was performed 30, 60, 90, 120, 150, 180 and 210 minutes with a ratio of enzyme to substrate of 1% (based on the result of previous research) and at 40°C in four conditions (1- without ultrasound pre-treatment, 2- with ultrasound pre-treatment with 40% power, 3- with ultrasound pre-treatment with 70% power and 4- with ultrasound pre-treatment with 100% power) by ultrasound probe in 5 minutes before adding the enzyme. In the next step, the antioxidant capacity of hydrolyzed proteins was measured at different times by DPPH free radical scavenging activity, iron ion reduction power, iron ion chelation and total antioxidant capacity.

### Results

The results showed that the highest DPPH free radical scavenging activity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 69.1, 77.45, 79.07 and 80.27, respectively. In most of the hydrolysis times, DPPH free radical scavenging activity in ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples treated with 40 and 70% power. The highest total antioxidant capacity in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 0.871, 1.025, 1.05 and 1.2 (absorption at 695 nm), respectively. In most of the hydrolysis times, the total antioxidant capacity in the samples treated with ultrasound with 100% power was higher than the samples treated with



©2023 The author(s). This is an open access article distributed under [Creative Commons Attribution 4.0 International License \(CC BY 4.0\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source.

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

40 and 70% power. The results showed that the highest reducing power of  $Fe^{3+}$  in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 2.03, 2.40, 2.44 and 2.51 (absorption at 700 nm), respectively. The highest iron ion chelation power in untreated and treated samples with 40, 70 and 100% ultrasound power were 25.22, 30.40, 26.52 and 41.10%, respectively. By increasing the ultrasound power in most of the hydrolysis times, the chelating power of iron ions in the ultrasound treatment with 100% power was higher than the samples pretreated with 40 and 70% power. The results showed that samples pretreated with 100% power ultrasound have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40% and 70% ultrasound power. Based on the results, using ultrasound treatment with 100% power and during hydrolysis time of 60 minutes, a product with high antioxidant capacity was obtained and selected as a suitable treatment.

### Conclusion

The ultrasonic mechanism is attributed to its thermal effects, cavitation and mechanical efficiency, so that it can increase the mass transfer and increase the contact between the substrate and the enzyme or change the spatial structure of the substrate. The results showed that samples pretreated with ultrasound with 100% power have the highest antioxidant properties compared to samples without pretreatment and pretreated with 40 and 70% power. Therefore, the use of high-power ultrasonic pretreatment shortens the hydrolysis time to achieve peptides with higher antioxidant capacity and thus increases the efficiency of enzymatic hydrolysis.

**Keywords:** Antioxidant properties, Bioactive peptides, Mushroom powder, Pretreatment, Protein

## مقاله پژوهشی

جلد ۱۹، شماره ۵، آذر- آذر ۱۴۰۲، ص. ۶۹۳-۷۰۹

# تأثیر پیش‌ تیمار فراصوت بر زمان هیدرولیز به وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)

آیسان ایزانلو<sup>۱</sup> - علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

### چکیده

پپتیدهای زیست‌فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن دارند. فراصوت، به‌عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود. تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش‌ تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی می‌تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین‌ها باشد. هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تأثیر پیش‌ تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای به‌وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. جهت انجام پژوهش ابتدا قارچ به پودر تبدیل و سپس عمل هیدرولیز در زمان‌های ۳۰-۲۱۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۱٪ (وزنی/وزنی) نسبت به وزن سوبسترای پروتئینی) و در دمای ۴۰ درجه‌سانتی‌گراد در چهار وضعیت بدون و با پیش‌ تیمار فراصوت با توان ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ صورت گرفت. افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی یون آهن در زمان‌های هیدرولیز کوتاه‌تر گردید. نتایج نشان داد، نمونه‌های پیش‌ تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه‌های بدون پیش‌ تیمار و پیش‌ تیمار شده با توان ۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشند. بنابراین استفاده از پیش‌ تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی-اکسیدانی بالاتر و افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌گردد و به‌عنوان تیمار مناسب انتخاب گردید.

**واژه‌های کلیدی:** پپتیدهای زیست‌فعال، پروتئین، پودر قارچ، پیش‌ تیمار، ویژگی آنتی‌اکسیدانی

### مقدمه

ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه پژوهشگران می‌باشد (Vioque et al., 2001). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHA، BHT، PG<sup>۵</sup> و TBHQ<sup>۶</sup> به‌دلیل نگرانی‌های مرتبط با عوارض نامطلوب آن‌ها بر سلامت انسان، تحت کنترل و نظارت شدید

به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت بدن در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است از پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده در فرآورده‌های غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به‌کار برده می‌شوند که در

۱ و ۲- به‌ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد و استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران  
(\*)- نویسنده مسئول: (Email: [sadeghiaz@gau.ac.ir](mailto:sadeghiaz@gau.ac.ir))

<https://doi.org/10.22067/ifstrj.2023.78786.1203>

3- butylated hydroxyanisole

4- butylated hydroxytoluene

5- propyl gallate

6- Tertiary butylhydroquinone

قارچ به‌عنوان 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، موادمعدنی و غیره است و به‌همین دلیل مصرف آن رو به افزایش است. یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم قارچ پروتئین است، در نتیجه می‌تواند منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال باشد (Lavi et al., 2012). هدف از این پژوهش بررسی اثر زمان هیدرولیز و همچنین تاثیر پیش‌ تیمار فراصوت بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین قارچ دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) به‌وسیله آنزیم پپسین جهت تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد.

## مواد و روش‌ها

### مواد

پپسین (به‌صورت پودر با فعالیت ۲۵۰ U/mg)، DPPH، پتاسیم فری‌سیانید، فریک کلراید، تری کلرواستیک‌اسید، آسکوربیک‌اسید از شرکت سیگما، اتانول ۹۶٪، سود، اسیدکلریدریک، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، اسید فسفریک از شرکت مرک و قارچ خوراکی دکمه‌ای (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی تهیه شدند.

### 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 درجه‌سانتی‌گراد 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 پلی‌پروپیلنی بسته‌بندی و تا زمان مصرف در یخچال نگهداری شدند (He et al., 2012).

### اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

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

هستند. در سال‌های اخیر، افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان در ارتباط بین سلامت و رژیم غذایی موجب افزایش تقاضا برای غذاهای فراسودمند شده است (FitzGerald & Meisel, 2000). پپتیدهای زیست‌فعال توالی‌هایی با ۲۰-۳ اسیدآمینه هستند که از شکسته‌شدن پروتئین به پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد تشکیل می‌شوند (Nourmohammadi et al., 2017). پپتیدهای زیست‌فعال در واقع بخش‌های پروتئینی خاصی هستند که علاوه بر ارزش غذایی، تأثیرات مثبتی بر عملکرد بدن و شرایطی دارند که منجر به اثرگذاری بر سلامتی می‌شود. البته پپتیدهای زیست‌فعال در ساختار پروتئین والد به شکل غیرفعال هستند و زمانی که به‌صورت توالی پپتیدی آزاد می‌شوند، می‌توانند اثرات سلامتی بخش خود را بروز دهند (Bhat et al., 2015). رایج‌ترین روش تولید پپتیدهای فعال زیستی از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها است. اکثر پپتیدهای فعال زیستی شناخته شده با استفاده از آنزیم‌های دستگاه‌گوارش، معمولاً پپسین و تریپسین تولید شده‌اند. در زمینه تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده تحقیقات زیادی انجام شده است. فرآیندهای هیدرولیز آنزیمی دارای معایبی از جمله کارایی پایین آنزیم، زمان طولانی فرایند آنزیمی و نرخ پایین تبدیل سوبسترا به محصول می‌باشند (Zhou et al., 2017). در نتیجه امروزه از روش‌های مختلف نظیر امواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش‌ تیمار پروتئین و رفع مشکلات فوق استفاده می‌شود (Li et al., 2017). فراصوت، به‌عنوان یک فناوری سبز، و ارزان، به‌طور گسترده‌ای برای استخراج پروتئین و ترکیبات آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود (Wen et al., 2018). علاوه بر این، فرایند فراصوت تأثیری بر روی ساختار اولیه پروتئین ندارد با این حال موجب تغییر در ساختار سوم و چهارم پروتئین می‌گردد که این امر در ویژگی‌های عملکردی و زیست‌فعالی آن تأثیرگذار است (Walters, 2019). پیش‌ تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam et al., 2015). تیمار با فراصوت باعث تغییر ساختار سه بعدی پروتئین‌ها می‌شود. در نتیجه، ترکیبی از پیش‌ تیمار با فراصوت و هیدرولیز آنزیمی متوالی می‌تواند راهی امیدوارکننده برای اصلاح عملکرد پروتئین‌ها باشد (Chen et al., 2011).

پن و همکاران (Pan et al., 2016)، گزارش کردند که افزایش مدت زمان فعالیت آنزیم، منجر به افزایش رهاسازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی 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.

## هیدرولیز پروتئین پودر قارچ

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

## نتایج و بحث

## ترکیب شیمیایی

ترکیبات شیمیایی پودر قارچ در جدول ۱ آورده شده است.

جدول ۱- ترکیب شیمیایی پودر قارچ خوراکی  
Table 1- Chemical composition of mushroom powder

| ترکیب شیمیایی<br>Chemical compounds                          | مقدار<br>Amount |
|--|-----------------|
| پروتئین (N×۶/۲۵)<br>Protein                                  | 26.6 ± 0.17     |
| چربی<br>Fat  | 3.8 ± 0.15      |
| رطوبت<br>Moisture  | 6.02 ± 0.52     |
| خاکستر<br>Ash  | 7.66 ± 0.12     |
| کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات)<br>Carbohydrate by Diff. | 55.92 ± 0.15    |

\*اعداد بر مبنای وزن خشک گزارش شدند.

Data reported as dry basis

\*میانگین سه تکرار ± انحراف معیار

Three replications ± Mena

## تأثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار فراصوت بر روی مهار

## رادیکال آزاد DPPH

در شکل ۱ قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل الف بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار نشده در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به میزان ۶۹/۱۰ درصد مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز قابلیت مهار رادیکال DPPH کاهش یافت که دلیل این کاهش پیشرفت هیدرولیز و هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت آنتی‌اکسیدانی تولیدی در زمان اولیه هیدرولیز می‌باشد.

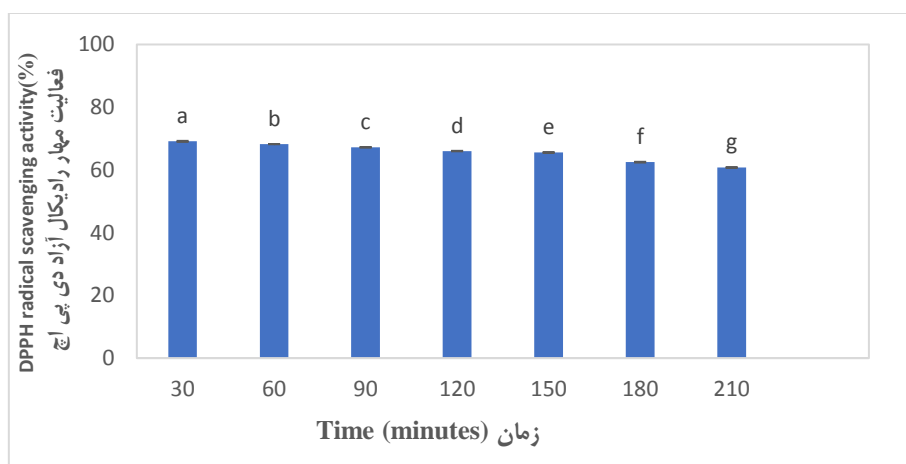
جهت انجام هیدرولیز با پیپسین از روش (Paisansak et al., 2020)، با کمی تغییرات استفاده شد. ۵۰ گرم پودر قارچ را در بالن حجمی توزین و در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات (pH=۲) مخلوط گردید. سپس به منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، عمل هیدرولیز در طی زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه با نسبت به آنزیم به سوبسترا ۱ درصد (بر مبنای آزمون‌های اولیه) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در چهار وضعیت صورت گرفت. حالت اول نمونه بدون پیش تیمار فراصوت، حالت دوم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد، حالت سوم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد و حالت چهارم همراه با پیش تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد توسط پروب فراصوت (توان ۲۰۰ وات و فرکانس ۲۴ کیلوهرتز، مدل UP 200H Ultrashallprozessor) در زمان ۵ دقیقه قبل از افزودن آنزیم انجام گرفت (لازم به ذکر است که انتخاب توان فراصوت بر مبنای آزمون‌های اولیه 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. هر تیمار به طور جداگانه در سانتریفیوژ یخچال‌دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت 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 آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف توسط روش‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن، شلاته‌کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل اندازه‌گیری گردید.

## آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی

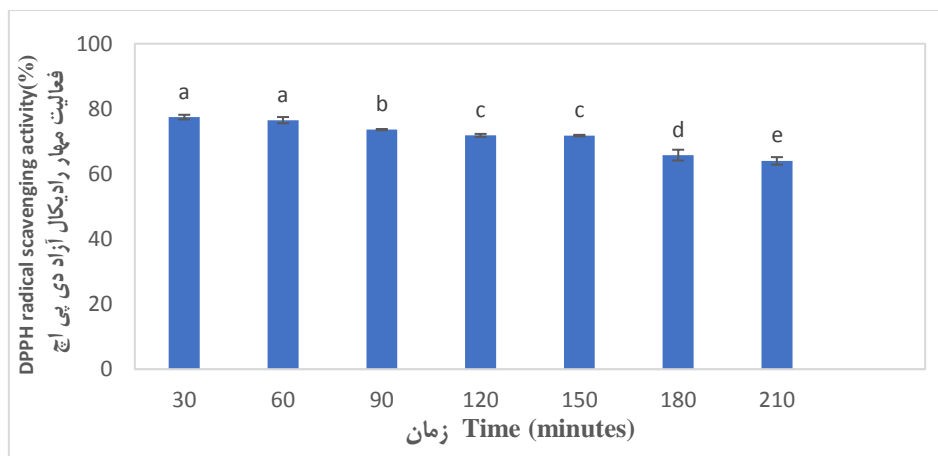
فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH از روش چی و همکاران (Chi et al., 2015)، قدرت احیاکنندگی آهن از روش بوگاتوف و همکاران (Bougatef et al., 2009)، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل از روش پریو و همکاران (Dasgupta & De, 2007) و فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن از روش جامدار و همکاران (Jamdar et al., 2010) استفاده شد.

## تجزیه و تحلیل آماری

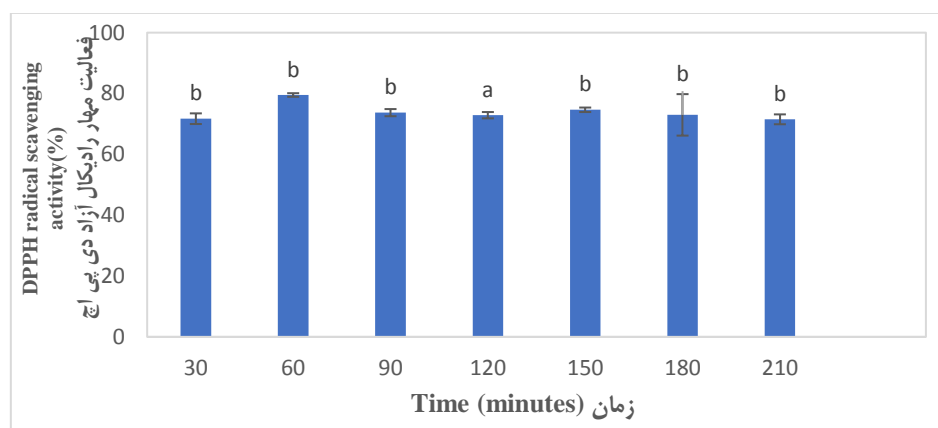
در این پژوهش اثر زمان‌های مختلف هیدرولیز (۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی قارچ خوراکی و همچنین تأثیر پیش تیمار فراصوت و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی با کاربرد آنالیز واریانس یک طرفه و با استفاده از نرم‌افزار



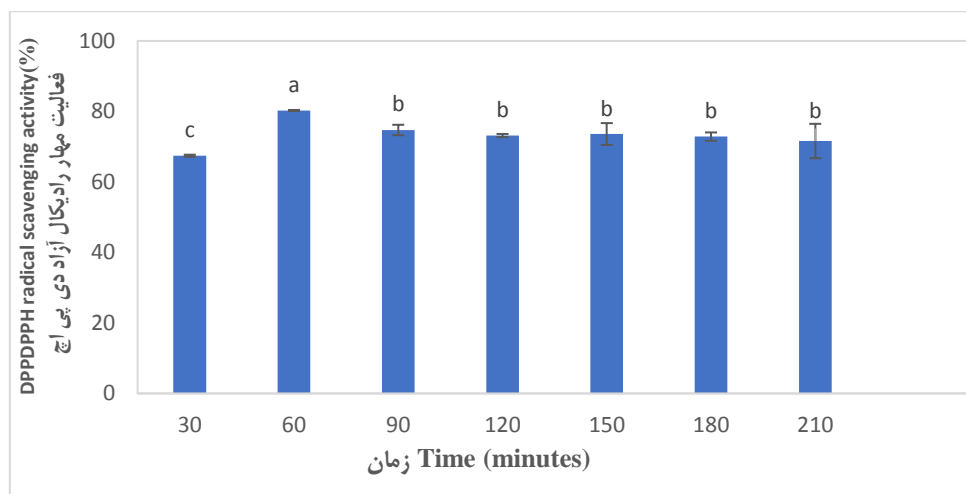
الف a



ب b



ج c



d د

شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), hydrolyzed protein with 40% ultrasound treatment (1b), hydrolyzed protein with 70% ultrasound treatment (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

تیمارنشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۶۹/۱۰ و ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد که نشان از افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۱ج بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۷۹/۰۷ درصد مشاهده شد. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۸۰/۲۷ درصد مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت در زمان‌های ابتدایی باعث افزایش قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت موجب بهبود فعالیت به دام انداختن رادیکال‌های آزاد می‌گردد، که این امر توسط محققین مختلف گزارش شده است (Nadeem et al., 2018). پیش تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد؛ این امر باعث افزایش کارایی در تولید پپتیدهای زیست‌فعال می‌گردد (Kadam et al., 2018).

فرآیند فراصوت در طی هیدرولیز موجب کاهش وزن مولکولی همراه با در معرض قرارگیری مقادیر بالاتر اسیدهای آمینه آبگریز و

مشکین فر و همکاران (Meshginfar et al., 2014)، گزارش کردند که فرآیند هیدرولیز باعث رها شدن پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از پروتئین می‌شود اما افزایش زمان هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم منجر به شکستن تعدادی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولید شده در مراحل اولیه هیدرولیز می‌گردد در نتیجه از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است در نتیجه قابلیت آنتی‌اکسیدانی تولیدی در مراحل بعدی کاهش یافته است. در شکل ۱ب، ج و د به ترتیب قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰ درصد تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

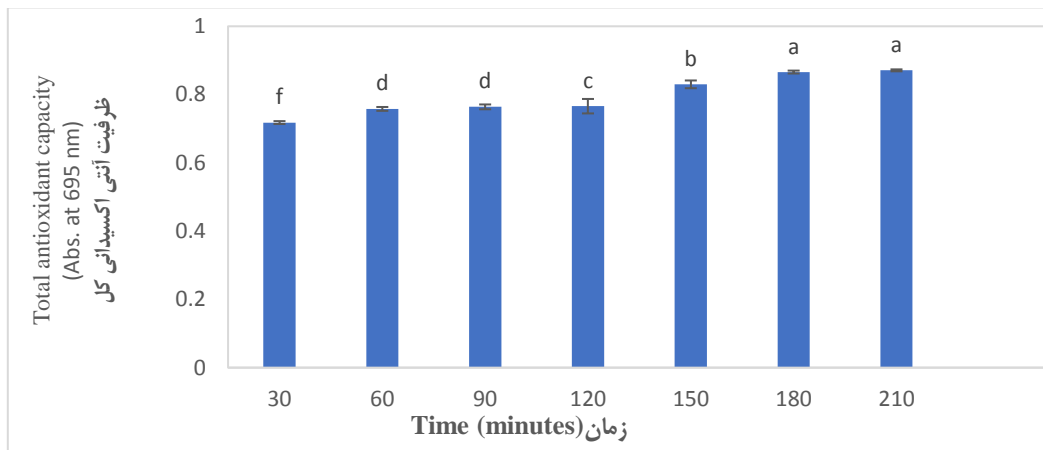
بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به میزان ۷۷/۴۵ درصد مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه‌های بدون پیش تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ و در زمان‌های ۳۰ و ۶۰ دقیقه به ترتیب ۶۹/۱۰ و ۶۸/۲۲ درصد و ۷۷/۴۵ و ۷۶/۵۱ درصد بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های ابتدایی هیدرولیز بود. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در نمونه‌های

پروتئینی را تغییر داده، در نتیجه مکان‌های آبرگیز ایزوله پروتئین گردو در معرض قرار می‌گیرند؛ که در نهایت این امر موجب افزایش سطح تماس بین آنزیم و سوبسترا شده و باعث بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گردو می‌شود (Matmaroh *et al.*, 2011).

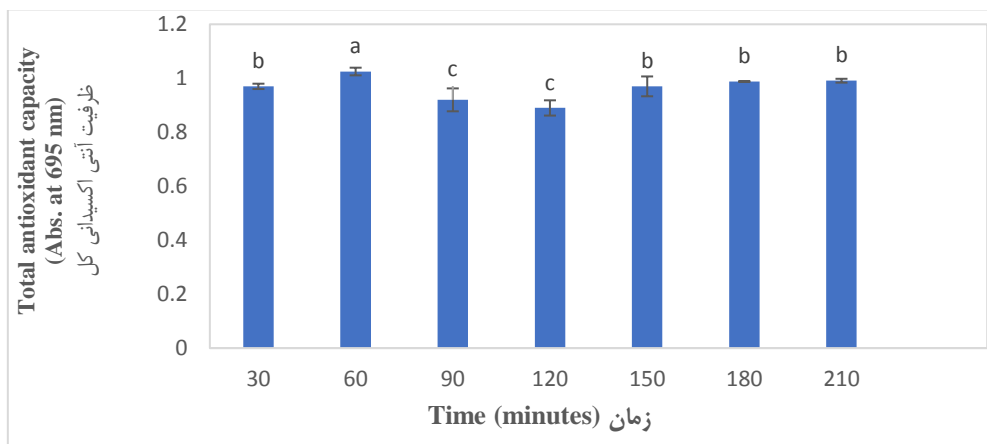
### تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌ تیمار فراصوت بر روی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل

در شکل ۲ ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌ تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

همچنین موجب تقویت برهمکنش پپتید با مولکول DPPH می‌گردد. مطالعه‌ی گورا آل‌موناسید و همکاران (Guerra-Almonacid *et al.*, 2019)، نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده *erythrina edulis* تیمار شده با فراصوت نسبت به نمونه‌های تیمار نشده دارای بالاترین فعالیت‌های مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب با مقادیر  $IC_{50}$  در محدوده ۱۵۱/۱۳ تا ۱۷۳/۲۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر و ۶۴/۵۲ تا ۷۷/۶۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. همچنین گزارش شد، فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده گردو با تیمار فراصوت با توان ۸۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، ۱۲۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰ و ۳۰ دقیقه)، ۱۴۰۰ وات (به مدت ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه)، و ۱۸۰۰ وات (به مدت ۲۰ دقیقه) بالاتر از نمونه شاهد بود. آن‌ها گزارش کردند که این نتایج ممکن است به دلیل تغییرات ساختاری در فراکسیون‌های ایزوله پروتئینی گردو پس از پیش‌ تیمار فراصوت باشد که باعث می‌شود فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌های آن متفاوت باشد. پیش‌ تیمار فراصوت با شدت بالا می‌تواند محیط اطراف گروه‌های

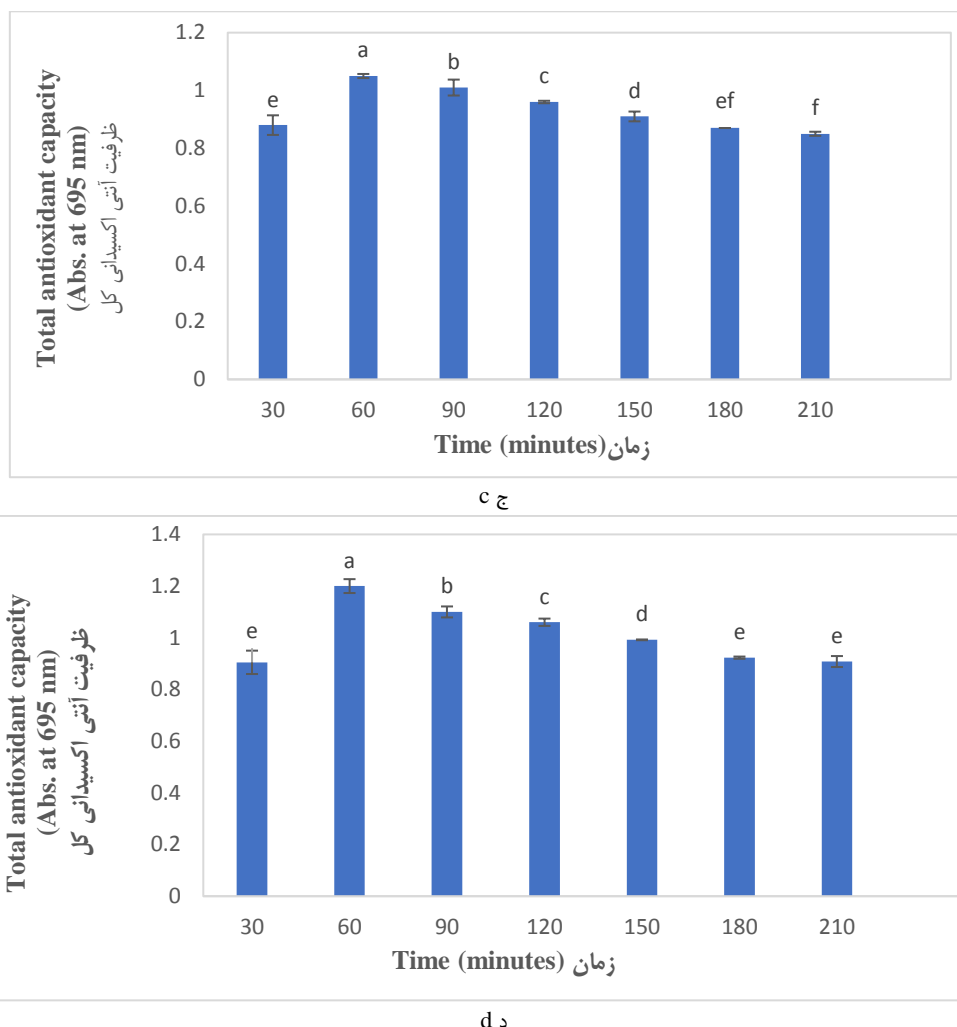


الف



ب





شکل ۲- ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 2. Total antioxidant capacity in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

ثبات‌تر تبدیل کنند، بنابراین موجب توقف واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون می‌گردند (Aderinola *et al.*, 2019). در شکل ۲ ب، ج و د به ترتیب ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ در زمان ۶۰ دقیقه به میزان ۱/۰۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده است. به طوری که مقادیر آن برای نمونه‌های

با توجه به شکل ۲ الف بالاترین میزان ظرفیت آنتی اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار نشده در زمان‌های هیدرولیز ۲۱۰ دقیقه به میزان ۰/۸۷ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده گردید. با افزایش زمان هیدرولیز ظرفیت آنتی اکسیدانی کل افزایش یافت، که دلیل این افزایش پیشرفت هیدرولیز و تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان می‌باشد. در واقع با افزایش زمان فعالیت آنزیم پیپسین، آزاد سازی پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهنده‌گی افزایش یافته است. پیش تیمار فراصوت موجب می‌شود که در طول هیدرولیز، بخش‌های پروتئین‌های با وزن مولکولی بالا به بخش‌هایی با وزن مولکولی نسبتاً کوچک با ظرفیت اهدای الکترون تجزیه شوند و بنابراین می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آن‌ها را به محصولاتی با

های فعال را منتقل و در معرض قرار داده و در واکنش‌های اکسیداسیون دخالت می‌کند (Wali et al., 2017).

### تأثیر زمان هیدرولیز و پیش‌ تیمار فراصوت بر روی قدرت احیاءکنندگی یون آهن

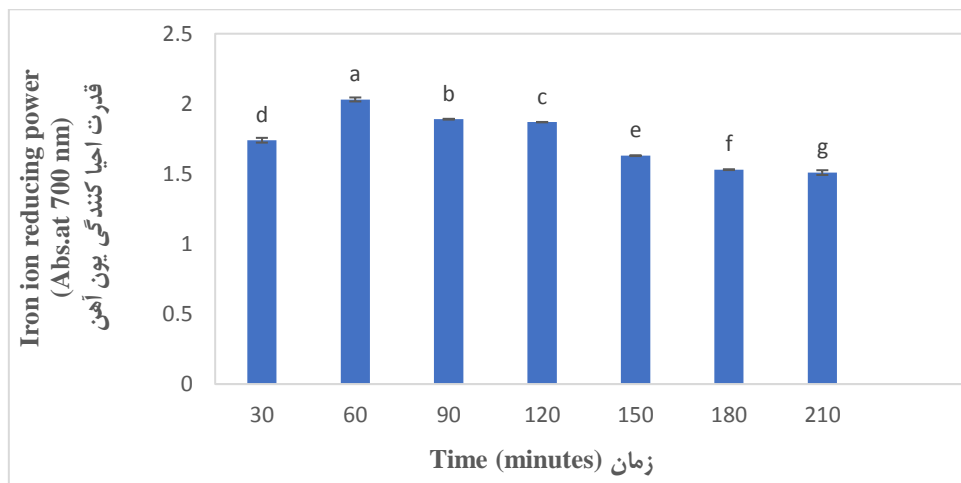
در شکل ۳ قدرت احیاءکنندگی یون آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌ تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تأثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

باتوجه به شکل ۳ الف بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمارنشده در زمان هیدرولیز ۶۰ 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 آنتی‌اکسیدان می‌باشد. احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با قدرت احیاءکنندگی یون آهن بالا شده است در نتیجه این قابلیت در مراحل بعدی کاهش یافته است. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پسیپس بر افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن پروتئین اولیه می‌باشد. به‌طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی شد، این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش میزان هیدرولیز منجر به آزاد شدن آمینواسیدهای آزاد می‌گردد که به‌عنوان منبع اضافی از الکترون‌ها و پروتون‌ها عمل می‌کنند (Zhu et al., 2008).

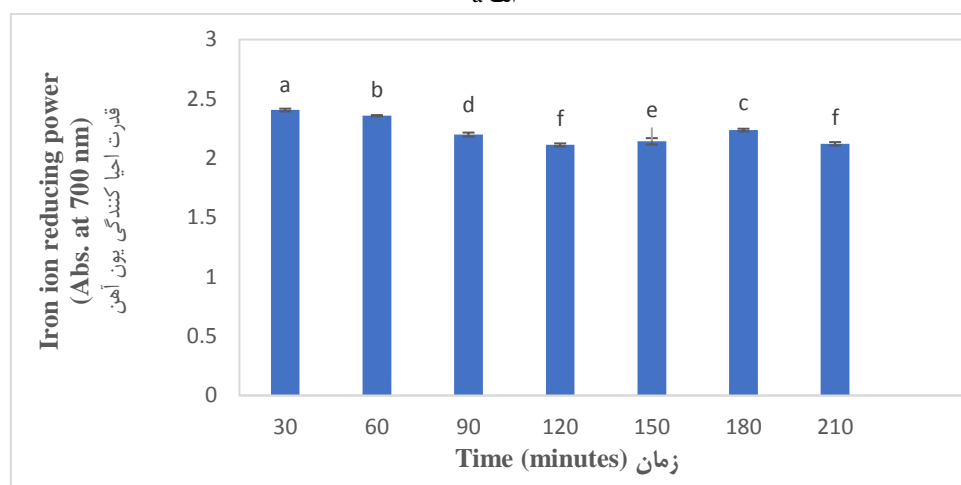
جی و همکاران (Je et al., 2009)، نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی، سبب شکستن اتصالات مجاور اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریئوفان شده و به با شکسته شدن این پیوندهای پپتیدی و رها شدن آن‌ها از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها کاهش می‌یابد. در ادامه افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز منجر به شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی شده و در نتیجه پپتیدهای با قابلیت الکترون دهی جهت احیاء یون آهن سه به یون آهن دو افزایش می‌یابند.

بدون پیش‌ تیمار فراصوت و نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان‌های ۶۰ و ۹۰ دقیقه به ترتیب (۰/۷۵ و ۰/۷۶) و (۱/۲۵ و ۰/۹۲) (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. این امر نشان از افزایش قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های تیمار شده توسط فراصوت در زمان‌های هیدرولیز پایین‌تر بود. دلیل این امر این است که پیش‌ تیمار فراصوت قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین و افزایش شدت پروتئولیز از طریق افزایش در معرض قرارگیری باندهای پپتیدی مستعد به هیدرولیز آنزیمی گردد. همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمارنشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۰/۸۷ و ۱/۰۲۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل تحت تأثیر تیمار فراصوت بود. با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۷۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۱/۰۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت ۱۰۰٪ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۱/۲ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) مشاهده شد. با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، افزایش توان تیمار فراصوت باعث افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در زمان‌های هیدرولیز کوتاه‌تر گردید. در اغلب زمان‌های هیدرولیز، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمارنشده و تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بود. فراصوت بواسطه اثرات مکانیکی، حفرگی، اثرات گرمایی، هم‌زدن دینامیکی، تنش برشی و اغتشاش باعث ایجاد یک سری تغییرات شیمیایی و فیزیکی در پروتئین می‌گردد؛ این اثرات موجب شکستن پیوندهای کووالانسی، تغییر ساختار پروتئین و تسریع فرآیند هیدرولیز آنزیمی و در نتیجه افزایش ترکیب آنزیم و پروتئین‌ها می‌گردد (Zhang et al., 2017; Ding et al., 2018).

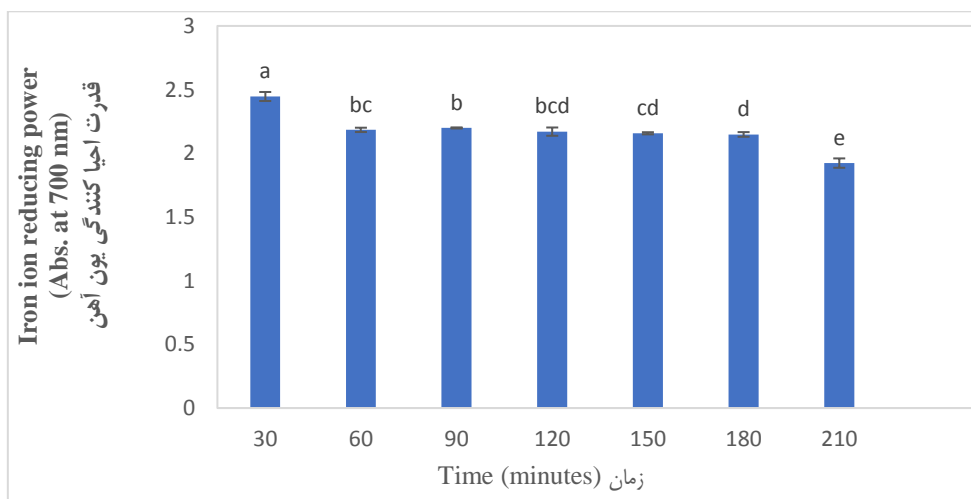
در بررسی زو و همکاران (Zou et al., 2019)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر پروتئین هیدرولیز شده مغز خوک تیمار شده با فراصوت نسبت به تیمارنشده نشان داده شد که مقادیر ABTS، DPPH، HRSA، Fe<sup>2+</sup>-CA و قدرت احیاء به ترتیب ۷۲، ۷۳، ۵۶، ۶۰ و ۰۶۵ درصد بود. فراصوت موجب کاهش زمان هیدرولیز و افزایش آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود و موجب افزایش فعالیت بازدارندگی ACE و قابلیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد، پیش‌ تیمار فراصوت، اسید آمینه



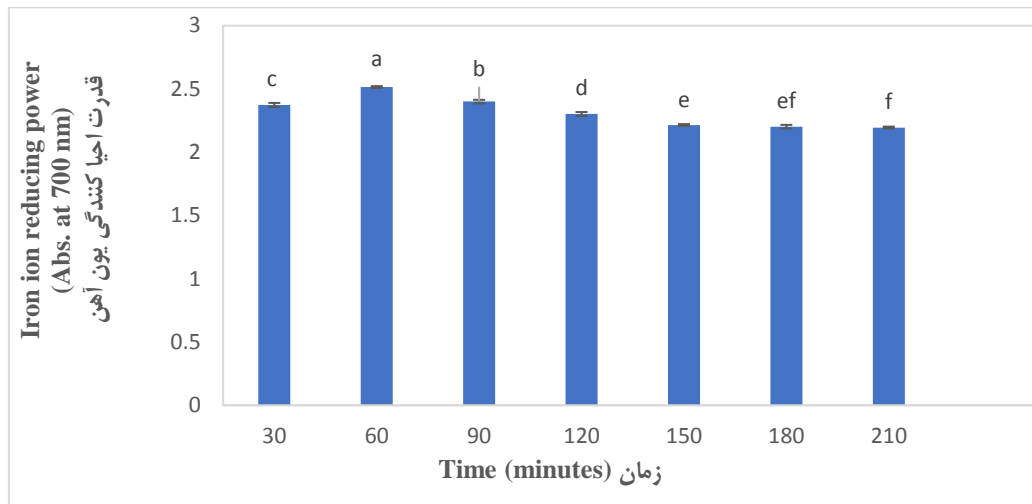
الف a



ب b



ج c



d د

شکل ۳- قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 3. The reducing power of iron ion in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and Protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

(Liang *et al.*, 2017)، گزارش کردند که پیش تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلاسینین و گلاسیسین به طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیز شده افزایش داد. علاوه بر این، هضم آلکالاز به کمک پیش تیمار فراصوت به دلیل تشکیل پپتیدهای زنجیر کوتاه حاوی اسیدآمینه‌های آبگریز با وزن مولکولی بین ۲۰۰-۳۰۰ دالتون، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ذرت را افزایش می‌دهد. مطالعات اخیر نشان داده است که پیش تیمار فراصوت می‌تواند آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین بادامزمینی (Yu *et al.*, 2012) و گلوتن گندم (Zhu *et al.*, 2011) را تسهیل کند. به طور کلی افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به افزایش قابل توجه قدرت احیاءکنندگی می‌شود که این امر می‌تواند به دلایل مختلفی باشد از جمله این که، افزایش درجه هیدرولیز منجر به در دسترس قرار گرفتن بیشتر اسیدآمینه‌های الکترون دهنده مانند لیزین، تریپتوفان و هیستیدین می‌گردد در نتیجه قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد. افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده را به رها شدن اسیدهای آمینه با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیزین و تریپتوفان نسبت داده‌اند (Jamdar *et al.*, 2010).

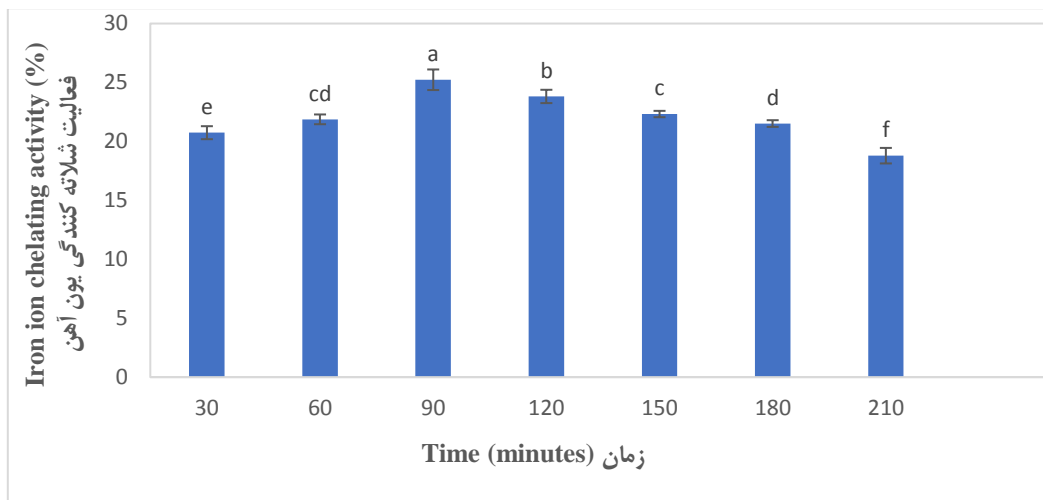
در شکل ۳ ب، ج و د به ترتیب قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۲/۰۳ و ۲/۴۰ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۳ ج بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۳۰ دقیقه به میزان ۲/۴۴ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) و همچنین بالاترین میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲/۵۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود.

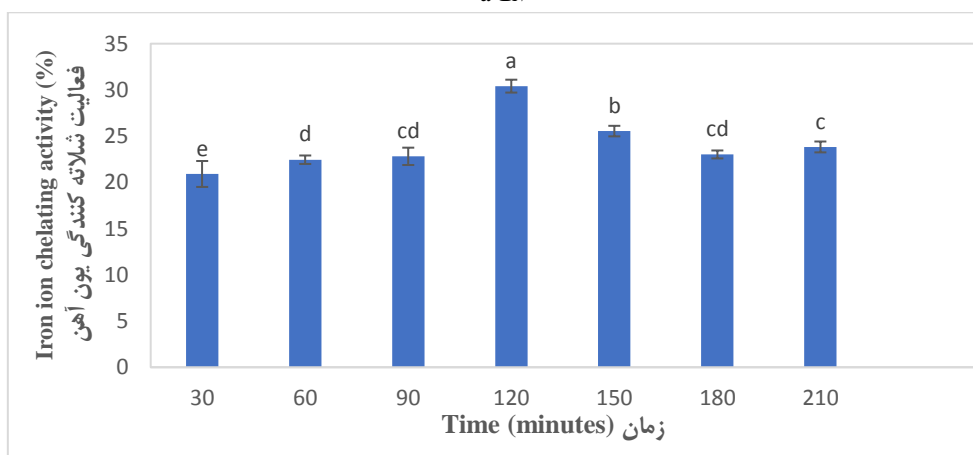
با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) تحت تاثیر زمان هیدرولیز آورده شده است.

تأثیر زمان هیدرولیز و پیش تیمار فراصوت بر روی قدرت شلاته کنندگی یون آهن

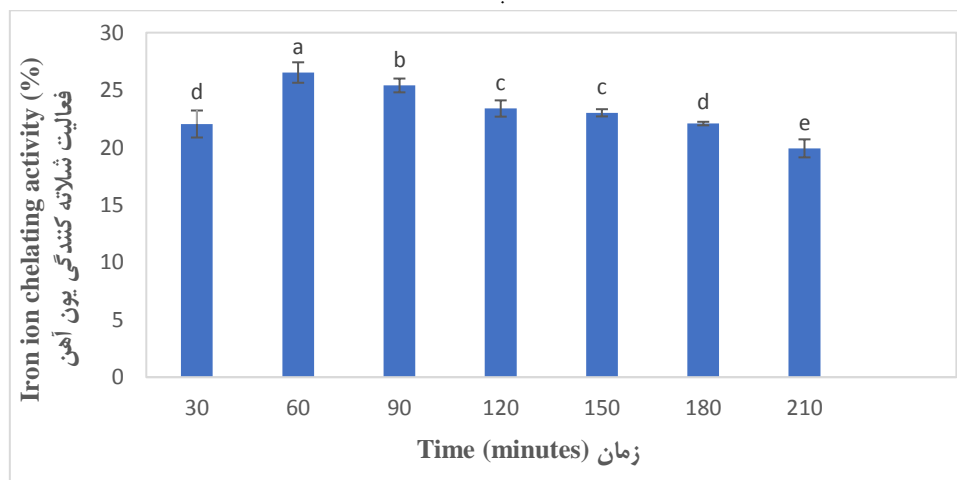
در شکل ۴ قدرت شلاته کنندگی یون آهن نمونه های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده

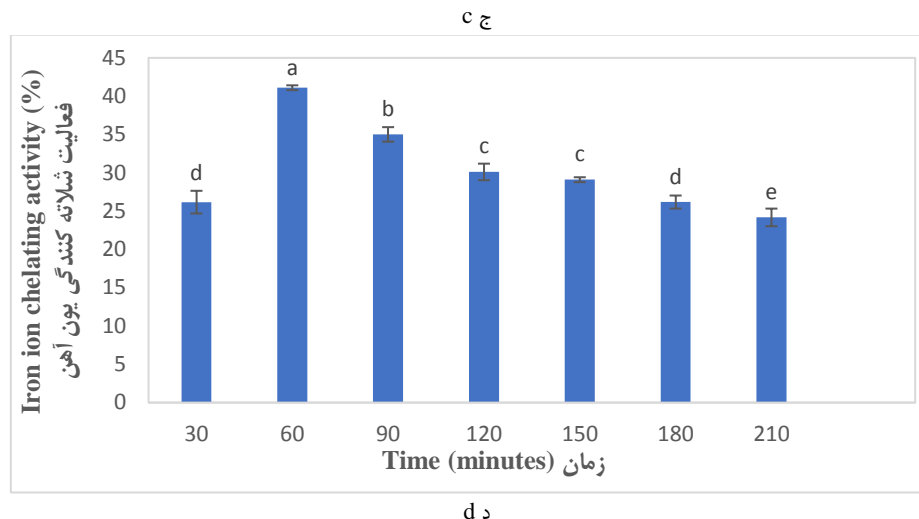


الف a



ب b





شکل ۴- قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار فراصوت (الف)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۴۰ درصد (ب)، پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۷۰ درصد (ج) و پروتئین هیدرولیز شده با تیمار فراصوت با توان ۱۰۰ درصد (د) در زمان‌های هیدرولیز مختلف

Fig. 4. Iron ion chelating power in hydrolyzed protein samples without ultrasound pretreatment (1a), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 40% power (1b), protein hydrolyzed with ultrasound treatment with 70% power (1c) and protein hydrolyzed by ultrasound treatment with 100% power (1d) at different hydrolysis times

تریپتوفان و هیستیدین می‌باشد، پپتیدهای دارای توالی هیستیدین و تریپتوفان به دلیل دارا بودن حلقه‌ی ایمیدازول، توانایی شلاته‌کنندگی و به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد را دارند بنابراین احتمالاً افزایش زمان و درجه هیدرولیز منجر به تولید پپتیدهایی با این ترکیب شده و در نتیجه قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن توسط آن‌ها افزایش یافته است. جمدار و همکاران (Jamdar et al., 2010) و کلومپونگ و همکاران (Klompong et al., 2007) نیز به ترتیب افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی بادام زمینی و نوعی ماهی<sup>۱</sup> را با افزایش درجه هیدرولیز گزارش کردند.

در شکل ۴، ب، ج و د به ترتیب قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان‌های ۴۰، ۷۰ و ۱۰۰٪ طی زمان هیدرولیز آورده شده است. بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ در زمان ۱۲۰ دقیقه به میزان ۳۰/۴۰ (جذب در ۵۶۲ نانومتر) مشاهده شد. با مقایسه نتایج این بخش با نمونه‌های تیمار نشده مشخص می‌شود که میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن در تمام زمان‌های هیدرولیز در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده بود. همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده توسط فراصوت با توان ۴۰٪ به ترتیب ۲۵/۲۲ و

باتوجه به شکل ۴ الف بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار نشده در زمان هیدرولیز ۹۰ دقیقه به میزان ۲۵/۲۲ (جذب در ۵۶۲ 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 آنتی‌اکسیدان می‌باشد. این یافته‌ها حاکی از تأثیر مثبت هیدرولیز با آنزیم پپسین بر افزایش قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین اولیه می‌باشد. آنزیم پپسین منجر به هضم شدن باندهای پپتیدی از طریق شکستن پیوند میان اسیدهای آمینه آبرگیز مانند لوسین و اسیدهای آمینه آروماتیک مانند فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین با سایر اسیدهای آمینه می‌گردد (Sun et al., 2011). ویژگی پروتئاز بر اندازه، مقدار، ترکیب اسید آمینه آزاد و پپتیدها و توالی اسیدآمینه آن‌ها تأثیر می‌گذارد که به نوبه خود بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز شده‌ها تأثیر می‌گذارد. ارزیابی درصد شلاته‌کنندگی نمونه‌ها نشان‌دهنده‌ی تأثیر قابل توجه زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. به‌طور کلی قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر نوع آنزیم، میزان هیدرولیز و ساختار آمینواسیدی پروتئین اولیه قرار دارد (Nourmohammadi et al., 2017). بنابراین، آنزیم پپسین توانسته پپتیدهایی با ترکیب آمینواسیدی مناسب و با قابلیت به‌دام‌اندازی یون آهن تولید کند. علاوه بر این موارد، پروتئین قارچ خوراکی غنی از لیزین،

### نتیجه گیری

امروزه به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که از اکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال آزاد به وجود آمده در فرآورده غذایی و سلول‌های زنده جلوگیری شود. از جمله راه‌کارهای موجود استفاده از آنتی‌اکسیدان هاست. از طرفی با توجه به گرایش مصرف‌کنندگان به سمت غذاهای فراسودمند و نگرانی‌هایی که در زمینه آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد، منجر به افزایش توجه پژوهشگران به سمت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی گشته است. پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. 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 می‌باشند. امروزه از روش‌های مختلف نظیر امواج فراصوت، مایکروویو، انجماد، فرایند فشار بالا، و غیره برای پیش تیمار پروتئین و رفع معایب فوق استفاده می‌شود. مکانیسم فراصوت به تأثیرات حرارتی، کاوتاسیون و کارایی مکانیکی آن نسبت داده می‌شود به طوری که می‌تواند باعث افزایش انتقال جرم و افزایش تماس بین سوبسترا و آنزیم یا تغییر در ساختار فضایی سوبسترا گردد. در این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده قارچ دکمه‌ای با استفاده از آنزیم پپسین با و بدون پیش تیمار فراصوت صورت گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های پیش تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ نسبت به نمونه‌های بدون پیش تیمار و پیش تیمار شده با فراصوت با توان ۴۰ و ۷۰٪ بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی را دارا می‌باشند. براساس نتایج تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ و طی زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه موجب دستیابی محصولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌گردد و به عنوان تیمار مناسب انتخاب گردید. در نتیجه بر اساس این نتایج می‌توان بیان نمود که استفاده از پیش تیمار فراصوت با توان بالا موجب کوتاه نمودن زمان هیدرولیز جهت دستیابی به پپتیدهای با قابلیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر می‌گردد و در نتیجه موجب افزایش کارایی هیدرولیز آنزیمی می‌گردد.

۳۰/۴۰٪ مشاهده شد که نشان از افزایش قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن تحت تأثیر تیمار فراصوت بود.

با توجه به شکل ۴ ج بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۷۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۲۶/۵۲٪ و همچنین بالاترین میزان قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در نمونه‌های تیمار شده با فراصوت با توان ۱۰۰٪ در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به میزان ۴۱/۱۰٪ مشاهده شد با توجه به این نتایج و مقایسه با تیمارهای قبلی، مشخص می‌شود که با افزایش توان فراصوت در اغلب زمان‌های هیدرولیز، قدرت شلاته‌کنندگی یون آهن در تیمار فراصوت با توان ۱۰۰٪ بالاتر از نمونه‌های تیمار نشده و تیمار شده با فراصوت ۴۰ و ۷۰٪ بود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که پیش تیمار فراصوت باعث شکستن برهمکنش‌های قوی بین مولکولی بین ماتریس-ماده حل شده، از جمله نیروهای واندروالسی و پیوندهای هیدروژنی می‌گردد (Ding et al., 2018). حفرگی صوتی موجب بهبود کیفیت انتقال بین آنزیم و سوبسترا می‌شود در نتیجه فراصوت می‌تواند باعث باز شدن ساختار پروتئین، کاهش اندازه پپتید و افزایش دسترسی آنزیم به پیوندهای پپتیدی گردد (Yang et al., 2017). آبادیا گارسیا و همکاران (Abadía-García et al., 2016)، نشان دادند که استفاده از توان بالای فراصوت موجب تغییر آرایش ساختار پروتئین و در نتیجه بهبود فرایند هیدرولیز آنزیمی می‌گردد، همچنین نشان دادند که پیش تیمار فراصوت باعث افزایش نرخ هیدرولیز می‌گردد. پژوهشگران گزارش کردند که پیش تیمار فراصوت پروتئین‌های بتا-کانگلاسینین و گلاسینین به طور قابل توجهی درجه هیدرولیز، گروه‌های SH آزاد و ظرفیت شلاته‌کنندگی یون آهن را در پروتئین‌های هیدرولیز شده ذرت افزایش داد، که دلیل آن افزایش نسبت‌های ماریچ  $\alpha$  و چرخش بتا، و کاهش در صفحه بتا و نسبت ماریچ تصادفی دو بخش پروتئین پس از پیش تیمار فراصوت می‌باشد (Liang et al., 2017).

### منابع

1. Abadía-García, L., Castaño-Tostado, E., Ozimek, L., Romero-Gómez, S., Ozuna, C., & Amaya-Llano, S.L. (2016). Impact of ultrasound pretreatment on whey protein hydrolysis by vegetable proteases. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 37, 84-90. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.010>
2. Aderinola, T.A., Fagbemi, T.N., Enjuigha, V.N., Alashi, A.M., & Aluko, R.E. (2019). In vitro antihypertensive and antioxidative properties of alcalase-derived *Moringa oleifera* seed globulin hydrolysate and its membrane fractions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 43(2), e13862. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13862>
3. 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1731-5>

4. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.10.075>
5. 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. <https://doi.org/10.1021/jf103771x>
6. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.03.045>
7. Dasgupta, N., & De, B. (2007). Antioxidant activity of some leafy vegetables of India: A comparative study. *Food Chemistry*, 101(2), 471-474. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.003>
8. 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. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.11.027>
9. FitzGerald, R.J., & Meisel, H. (2000). Milk protein-derived peptide inhibitors of angiotensin-I-converting enzyme. *British Journal of Nutrition*, 84(S1), 33-37. <https://doi.org/10.1017/S0007114500002221>
10. Guerra-Almonacid, C.M., Torruco-Uco, J.G., Murillo-Arango, W., Méndez-Arteaga, J.J., & Rodríguez-Miranda, J. (2019). Effect of ultrasound pretreatment on the antioxidant capacity and antihypertensive activity of bioactive peptides obtained from the protein hydrolysates of *Erythrina edulis*. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 288-296. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2019.104787>
11. He, J. Z., Ru, Q.M., Dong, D.D., & Sun, P.L. (2012). Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*, 17(4), 4373-4387. <https://doi.org/10.3390/molecules17044373>
12. Horwitz, W., Chichilo, P., & Reynolds, H. (1970). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists.
13. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.12.027>
14. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266-1272. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.06.013>
15. Kadam, S.U., Tiwari, B.K., Álvarez, C., & O'Donnell, C.P. (2015). Ultrasound applications for the extraction, identification and delivery of food proteins and bioactive peptides. *Trends in Food Science & Technology*, 46(1), 60-67. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.012>
16. 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. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.07.016>
17. 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. <https://doi.org/10.1007/s00535-011-0514-7>
18. 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. <https://doi.org/10.3390/md15030061>
19. Liang, Q., Ren, X., Ma, H., Li, S., Xu, K., & Oladejo, A.O. (2017). Effect of low-frequency ultrasonic-assisted enzymolysis on the physicochemical and antioxidant properties of corn protein hydrolysates. *Journal of Food Quality*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2784146>
20. Matmaroh, K., Benjakul, S., Prodpran, T., Encarnacion, A.B., & Kishimura, H. (2011). Characteristics of acid soluble collagen and pepsin soluble collagen from scale of spotted golden goatfish (*Parupeneus heptacanthus*). *Food Chemistry*, 129(3), 1179-1186. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.05.099>
21. 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. *Journal of Food Research*, 24(2), 215-225.
22. 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. <https://doi.org/10.22067/ifstrj.v1395i0.45423>



23. Nadeem, M., Ubaid, N., Qureshi, T.M., Munir, M., & Mehmood, A. (2018). Effect of ultrasound and chemical treatment on total phenol, flavonoids and antioxidant properties on carrot-grape juice blend during storage. *Ultrasonics Sonochemistry*, 45, 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.02.034>
24. Paisansak, S., Sangtanoo, P., Srimongkol, P., Saisavoey, T., Reamtong, 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. <https://doi.org/10.1007/s13197-020-04517-z>
25. 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. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2016.06.008>
26. Sun, Q., Shen, H., & Luo, Y. (2011). Antioxidant activity of hydrolysates and peptide fractions derived from porcine hemoglobin. *Journal of Food Science and Technology*, 21, 6646-6652. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0115-0>
27. Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.D.M., & Millán, F. (2001). Obtención y aplicaciones de hidrolizados proteicos. *Grasas y Aceites*, 52(2), 132-136. <https://doi.org/10.3989/gya.2001.v52.i2.385>
28. Wali, A., Ma, H., Shahnawaz, M., Hayat, K., Xiaong, J., & Jing, L. (2017). Impact of power ultrasound on antihypertensive activity, functional properties, and thermal stability of rapeseed protein hydrolysates. *Journal of Chemistry*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/4373859>
29. Walters, M.E. (2019). *Effects of Ultrasonication on the Antioxidant and Anti-diabetic Properties of Hydrolyzed Oat Proteins* (Doctoral dissertation, Carleton University). <https://doi.org/10.22215/etd/2019-13844>
30. Wen, C., Zhang, J., Zhang, H., Dzah, C. S., Zandile, M., Duan, Y., et al. (2018a). Advances in ultrasound assisted extraction of bioactive compounds from cash crops-A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, 48, 538–549. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2018.07.018>
31. Yang, X., Li, Y., Li, S., Oladejo, A. O., Wang, Y., Huang, S., ... & Ye, X. (2017). Effects of low power density multi-frequency ultrasound pretreatment on the enzymolysis and the structure characterization of defatted wheat germ protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 38, 410-420. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2017.03.001>
32. Yu, L., Sun, J., Liu, S., Bi, J., Zhang, C., & Yang, Q. (2012). Ultrasonic-assisted enzymolysis to improve the antioxidant activities of peanut (*Arachin conarachin* L.) antioxidant hydrolysate. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 9051-9068. <https://doi.org/10.3390/ijms13079051>
33. Zhang, Y., Ma, L., Cai, L., Liu, Y., & Li, J. (2017). Effect of combined ultrasonic and alkali pretreatment on enzymatic preparation of angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitory peptides from native collagenous materials. *Ultrasonics Sonochemistry*, 36, 88-94. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.11.008>
34. Zhou, C., Hu, J., Yu, X., Yagoub, A.E.A., Zhang, Y., Ma, H., ... & Otu, P.N.Y. (2017). Heat and/or ultrasound pretreatments motivated enzymolysis of corn gluten meal: Hydrolysis kinetics and protein structure. *LWT*, 77, 488-496. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.048>
35. Zhu, K.X., Su, C.Y., Guo, X.N., Peng, W., & Zhou, H.M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(5), 1053-1059. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02585.x>
36. 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. <https://doi.org/10.1021/jf703697e>
37. Zou, Y., Yang, H., Li, P.P., Zhang, M. H., Zhang, X.X., Xu, W.M., & Wang, D.Y. (2019). Effect of different time of ultrasound treatment on physicochemical, thermal, and antioxidant properties of chicken plasma protein. *Poultry Science*, 98(4), 1925-1933. <https://doi.org/10.3382/ps/pey502>