

Optimization of production of hydrolyzed protein with antioxidant properties from edible mushroom (*Agaricus bisporus*)

Isan Izanloo¹, Alireza SadeghiMahoona^{2*}, Hoda Shahiri Taberestani³,
Seyedeh Narges Mazloomi⁴, Mohsen Rashidi⁵

1 MSc Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2 Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran, Email: sadeghiaz@gau.ac.ir

3 Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

4 PhD Food Chemistry, Vice-Chancellor of Food and Drug Affairs, Mazandaran University of medical university, Sari, Iran

5 The Health of Plant and Livestock Products Research Centre, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

Article Info

Article type:
Research Full Paper

Article history:
Received: 2022-04-10
Revised: 2022-04-28
Accepted: 2022-05-13

Keywords:
Edible mushroom
Enzymatic hydrolysis
Antioxidant properties
Optimization

ABSTRACT

Background and Objectives: Free radicals and hydroperoxides originate from oxidation reactions could reduce food quality and also promote the incidence of various diseases such as cancer. In this regard, using natural compounds with antioxidant properties, such as bioactive peptides, is of interest to many researchers. Demand for natural and safe antioxidants such as bioactive peptides has increased dramatically due to concerns about the safety of synthetic antioxidants such as BHT and BHA in case of long-term use, the demand for natural and safe antioxidants such as bioactive peptides has increased widely. Bioactive peptides are defined as hydrolyzed proteins that, after entering the body, show a potential to stimulate desire and health promoting activities.

Materials and Methods: The aim of this study was to optimize the hydrolysis conditions of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) powder protein with alcalase enzyme in order to produce hydrolyzed protein with potential antioxidant properties. To conduct this research, first, edible mushrooms were turned into powder after purchase from the market and conducting related processes. Then, in order to optimize the production of hydrolyzed proteins with a maximum antioxidant activity using response surface methodology, the independent variables were selected as time, temperature and ratio of enzyme to substrate and dependent variables were selected as the antioxidant capacity of the hydrolyzed sample (using DPPH free radical scavenging methods, iron ion reduction power and total antioxidant capacity). The temperatures used were in the range of 40-55 °C, the hydrolysis time between 30 to 210 minutes and the enzyme to substrate ratio 1 to 3%, which was optimized by the surface response methodology. In this research, Design Expert statistical software was used to apply the response level of statistical design. The statistical design was prepared with a central composite design with 20 experimental treatments that included a central point with six replications.

Results: The obtained results showed that all the studied parameters (enzyme concentration, temperature and hydrolysis time) had a significant effect on the antioxidant activity of the hydrolyzed product. The results showed that for the production of hydrolyzed protein of edible mushroom with high antioxidant activity (DPPH free radical scavenging methods,

reducing power of Fe^{3+} and total antioxidant capacity) by the alkalase enzyme, the optimal conditions include the temperature of 47.5°C , the time was 197 minutes and the enzyme-to-substrate ratio was 2.1%, which with desirability of 100% was equal to DPPH free radical scavenging of 10.661%, reducing the power of Fe^{3+} equal to 2.45 (absorption at 700 nm) and the total antioxidant capacity was equal to 1.224 (absorption at 695 nm).

Conclusions: The results showed that by hydrolysis of protein of edible mushroom under optimal conditions a product with suitable antioxidant capacity can be obtained, which can be used as natural and functional additives in food formulations.

Cite this article: Izanloo, I., SadeghiMahoonak, A.R., Shahiri Taberestani, H., Mazloomi, S.N., Rashidi, M. 2022. Optimization of production of hydrolyzed protein with antioxidant properties from edible mushroom (*Agaricus bisporus*). *Food Processing and Preservation Journal*, 14 (3), 55-78.



© The Author(s).

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20087.1701

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی آنتی‌اکسیدانی از قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*)

آیسان ایزانلو^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، هدی شهیری طبرستانی^۳، سیده نرگس مظلومی^۴، محسن رشیدی^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲. استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، رایانامه: sadeghiaz@gau.ac.ir
۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۴. دکتری تخصصی شیمی مواد غذایی، معاونت غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری
۵. مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های گیاهی و دامی دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله کامل علمی-پژوهشی	سابقه و هدف: رادیکال‌های آزاد و هیدروپراکسیدهای حاصل از واکنش‌های اکسیداسیون باعث افت کیفیت مواد غذایی و همچنین عامل بروز بیماری‌های مختلف نظیر سرطان می‌باشند. به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانند BHT و BHA در صورت استفاده بلند مدت وجود دارد، تقاضا برای آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و ایمن هم‌چون پپتیدهای زیست‌فعال به شکل گسترده‌ای افزایش پیدا کرده است. پپتیدهای زیست‌فعال به عنوان پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای تعریف می‌شوند که پس از ورود و جذب در بدن، دارای اثرات سلامتی بخش مشخصی هستند.
واژه‌های کلیدی: قارچ خوراکی دکمه‌ای هیدرولیز آنزیمی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بهینه‌سازی	مواد و روش‌ها: هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز پروتئین پودر قارچ دکمه‌ای (<i>Agaricus bisporus</i>) با آنزیم آلکالاز به منظور تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب بود. بدین منظور ابتدا قارچ خوراکی پس از خریداری از بازار و انجام فرآیندهای آماده‌سازی مربوطه به پودر تبدیل گردید. سپس به منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده قارچ با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش سطح پاسخ متغیرهای مستقل زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیر وابسته اندازه‌گیری قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه هیدرولیز شده (به روش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) تعریف شدند. دماهای مورد استفاده در محدوده‌ی ۵۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد، زمان بین ۳۰ تا ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ تا ۳ درصد بود که توسط روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند. در این تحقیق از نرم‌افزار آماری Design Expert برای اعمال طرح آماری سطح پاسخ استفاده شد. طرح آماری مذکور به صورت کامپوزیت مرکزی با تعداد ۲۰ تیمار آزمایشی شامل شش تکرار در نقطه‌ی مرکزی، طراحی گردید.
	یافته‌ها: نتایج به‌دست آمده نشان داد که کلیه پارامترهای مورد بررسی (غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز) تاثیر مشخصی بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول هیدرولیز شده تولیدی دارند. جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده از پودر قارچ با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) شرایط بهینه هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز شامل دمای ۴۷/۵ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۹۷ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۱ درصد بود که با درجه -

مطلوبیت ۱۰۰ درصد منطبق با فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH معادل با ۱۰/۶۶۱ درصد (نمونه رقیق شده)، قدرت احیاکنندگی یون آهن معادل با ۲/۴۵ (جذب در ۷۰۰ طول موج نانومتر) و ظرفیت آنتی اکسیدانی کل برابر با ۱/۲۲۴ (جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر) بود.

نتیجه گیری: نتایج نشان داد که با بهینه سازی شرایط هیدرولیز پروتئین حاصل از پودر قارچ خوراکی می توان به محصولی با حداکثر قابلیت آنتی اکسیدانی دست یافت که دارای پتانسیل کاربرد به عنوان یک افزودنی طبیعی و فراسودمند در فرمولاسیون مواد غذایی می باشد.

استناد: ایزانلو، آ، صادقی ماهونک، ع.ر، شهیری طبرستانی، ه.، مظلومی، س.ن، رشیدی، م. (۱۴۰۱). بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی آنتی اکسیدانی از قارچ خوراکی (*Agaricus bisporus*). فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۱۴ (۳)، ۷۸-۵۵.

DOI: 10.22069/FPPJ.2022.20087.1701



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

اکسایش ترکیبات غذایی از عوامل اصلی افت کیفیت و فساد مواد غذایی می باشد، علاوه بر این، مصرف رادیکال‌های آزاد و هیدروپراکسیدهای حاصل از این واکنش با خطر ابتلا به بیماری‌هایی نظیر سرطان، اختلالات عصبی و پیشرفت فرآیند پیری همراه است. در همین راستا، کاربرد ترکیبات طبیعی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی، نظیر پپتیدهای زیست‌فعال مورد توجه بسیاری از محققین می باشد (۱). پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از هیدرولیز پروتئین‌های غذایی از ویژگی آنتی‌اکسیدان قابل توجهی برخوردارند. ویژگی آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با ویژگی ساختاری، آبگریزی و ترکیب اسیدهای آمینه تشکیل‌دهنده زنجیره پپتیدی در ارتباط می باشد. پپتیدهای زیست‌فعال اجزاء پروتئینی خاصی هستند که دارای اثرات بیولوژیکی قابل توجهی می باشند و تأثیر مثبتی بر عملکرد یا شرایط بدن دارند (۲). انواع متفاوتی از فعالیت‌های فیزیولوژیکی از پپتیدهای زیست‌فعال گزارش شده است از جمله اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد فشارخونی، و غیره در شرایط درون‌زیست یا برون‌زیست که این ویژگی‌ها وابسته به نوع، تعداد، توالی و ویژگی‌های اسیدهای آمینه موجود در پپتیدها می باشند. معمولاً پپتیدها دارای اندازه‌ای بین ۲۰-۳ اسید آمینه و جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می باشند (۳). جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به‌عنوان افزودنی غذایی استفاده می شود هر چند این آنتی‌اکسیدان‌ها فعالیت قوی‌تری نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از خود نشان می دهند، اما در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌منظور جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مورد توجه پژوهشگران می باشد (۴). در میان آنتی‌اکسیدان-

های طبیعی می توان به پپتیدهای زیست‌فعال اشاره کرد که دارای ۲۰-۲ اسید آمینه و وزن مولکولی کمتر از ۶ کیلو دالتون هستند و در ساختار پروتئین اولیه غیر فعال اند و با واکنش‌هایی هیدرولیزی که به‌هنگام تخمیر یا هضم مواد غذایی رخ می دهند، فعال می شوند و ویژگی‌های سلامتی بخش مانند آنتی‌اکسیدانی، کاهندگی کلسترول و فعالیت ضد فشار خون دارند (۵). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع پروتئینی مختلف به اثبات رسیده است از جمله: پروتئین سویا (۶)، پروتئین ماهی (۷)، سفیده تخم مرغ (۸)، تخم کتان (۹)، بادام زمینی (۱۰)، و شاه‌دانه (۱۱). رایج‌ترین روش تولید پپتیدهای زیست‌فعال، هیدرولیز پروتئین‌ها به کمک آنزیم‌ها می باشد (۱۲). آلکالاز از جمله آنزیم‌هایی است که در هیدرولیز پروتئین‌ها نقش دارد (۱۳). آنزیم آلکالاز یک پروتئاز غیراختصاصی میکروبی و قلیایی با فعالیت کاتالیتیکی بالاست که توسط باسیلوس لیچنی فرمیس تولید و قادر است. در pH مناسب در کوتاه‌ترین زمان درجه هیدرولیز بالاتری در مقایسه با پروتئازهای اسیدی ایجاد نماید (۱۴). در میان منابع مناسب جهت تولید پپتید زیست‌فعال، قارچ به‌عنوان یکی از قدیمی‌ترین مواد غذایی با ارزش غذایی در نظر گرفته می شود و ارزش غذایی آن قابل مقایسه با ماهی و گوشت، می باشد (۱۵). قارچ منبع مناسبی از اسیدهای آمینه متعدد (آسپارتیک اسید، سرین، گلیسین، ترئونین، گلوتامین، والین، سیستئین، آلانین، لوسین، ایزولوسین، لیزین، هیستیدین پرولین، آرژنین و تیروزین)، پروتئین‌ها (بین ۱۹ تا ۳۸ درصد)، ویتامین‌ها، مواد معدنی و غیره است به‌همین دلیل مصرف آن روبه افزایش است. از نظر ارزش غذایی کلاهک قارچ به‌طور متوسط دارای رطوبت ۹۰/۷۶±۰/۳۴، پروتئین ۳۳/۶۵±۰/۱۵، چربی ۲۰/۴۸±۰/۲۷، کربوهیدرات ۲۰/۵۹±۰/۲۷، فیبر

کردن مشابه یکدیگر بود در صورتی که ممانعت از اکسیداسیون اسیدلینولئیک برای هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز-فلاورزیم بیشترین میزان بود. فراکسیون‌های مختلف در آزمون FRAP^۱ فعالیت وابسته به غلظت نشان دادند و بالاترین فعالیت مربوط به فراکسیون‌های حاصل از پانکراتین و آلکالاز با وزن مولکولی ۱-۳ کیلو دالتون به ثبت رسید (۱۹).

روش سطح پاسخ (RSM^۲) روشی سودمند برای ارزیابی فرآیندهای پیچیده است که به صورت موفقیت‌آمیزی در بهینه‌سازی فرآیندهای غذایی نیز به کار برده شده است (۲۰). RSM، شامل فرآیندهای آماری و ریاضی می‌باشد که می‌توان از آن برای بررسی یک یا چند متغیر وابسته و مستقل استفاده نمود، این روش اثر متغیرهای مستقل را به تنهایی و یا به صورت ترکیبی در فرآیند نشان می‌دهد و با ایجاد یک مدل ریاضی به صورت دقیق فرآیند را تفسیر می‌کند (۲۱). هدف این پژوهش تعیین شرایط بهینه هیدرولیز (دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا) پروتئین قارچ دکمه‌ای توسط آنزیم آلکالاز به روش سطح پاسخ جهت تولید پپتیدهای زیست فعال با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بیشینه (مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، احیاء کنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل)، به عنوان یک افزودنی فراسودمند با قابلیت کاربرد در فرمولاسیون‌های غذایی بود.

مواد و روش‌ها

مواد اولیه: قارچ دکمه‌ای خوراکی (*Agaricus bisporus*) از بازار محلی شهر گرگان تهیه و پس از تایید رقم مورد نظر، به آزمایشگاه منتقل شدند. کلیه

۳۳/۱۱±۰/۲۰، خاکستر ۱۰/۱۷±۰/۲۰ درصد برمبنای وزن خشک و ارزش غذایی ساقه قارچ به طور متوسط شامل رطوبت ۹۰/۲۷±۰/۲۴، پروتئین ۱۹/۰۱±۰/۲۴، چربی ۲/۰۰±۰/۲۴، کربوهیدرات ۳۱/۴۱±۰/۴۲، فیبر ۳۸/۰۸±۰/۱۸، خاکستر ۲۲/۲۲±۰/۲۲ ۹/۵ درصد برمبنای وزن خشک می‌باشد. با توجه به ویژگی‌های مذکور، قارچ می‌تواند به عنوان منبع مناسبی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زا در صنایع غذایی گوناگون کاربرد داشته باشد (۱۶). قارچ دکمه‌ای با نام علمی (*Agaricus bisporus*) از خانواده (*Garygonyan*) و یکی از محصولات با ارزش در اکثر کشورهای جهان می‌باشد. با توجه به این که یکی از اجزای تغذیه‌ای مهم در قارچ پروتئین آن است، بنابراین منبع خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشد (۱۷). در پژوهش‌های گوناگونی از قارچ به عنوان منبع تولید پپتید زیست فعال استفاده شده است از جمله فرزانه و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی قارچ *Agaricus bisporus* و *Terfezia clavaryi* از آنزیم‌های گوارشی (پپسین - آلفاکیموتریپسین - تریپسین) جهت هیدرولیز پروتئین قارچ استفاده نمودند. نتایج بررسی آن‌ها نشان داد که برخی پپتیدهای تولیدی از هر دو نوع قارچ نسبت به پروتئین‌های اولیه فعالیت ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند (۱۸). در پژوهش دیگری کیماتو و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی پروتئین هیدرولیز شده و پپتیدهای حاصل از قارچ خوراکی *Agaricus bisporus* با استفاده از آلکالاز، پانکراتین، فلاورزیم، آلکالاز-پانکراتین و آلکالاز-فلاورزیم پرداختند. پروتئین‌های هیدرولیز شده با روش فرآیلایش به فراکسیون‌های با وزن مولکولی مختلف >۱، ۱-۳، ۳-۵ و ۵-۱۰ کیلودالتون تفکیک شدند. EC₅₀ هیدرولیزهای حاصل در فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در ۵ روز اینکوبه

1. Ferric Reducing Antioxidant Power Assay
2. Response Surface Methodology

قدرت احیاء یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) تعریف شدند. دماهای مورد استفاده در محدوده ۵۵- ۴۰ درجه سانتی‌گراد، زمان بین ۳۰ تا ۲۱۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱ تا ۳ درصد بودند که توسط روش سطح پاسخ بهینه‌سازی شدند. به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم، محلول پروتئینی تلقیح شده با آنزیم در دمای ۸۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آب قرار داده شد. هر تیمار به‌طور جداگانه در ساترئیوژ یخچال‌دار با ۵۰۰۰ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد برای مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد و سوپرناتانت حاصل برای به دست آوردن پودر پروتئین هیدرولیز شده با خشک‌کن انجمادی خشک شد. پودر حاصل تا زمان استفاده در دمای ۱۸- درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۳).

بهینه‌یابی فرآیند جهت دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی: به‌منظور بهینه‌یابی فرآیند از نظر ویژگی‌های ضداکسایش، از نرم‌افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای سه متغیر مستقل: غلظت آنزیم به‌سوبسترا (X_1)، دما (X_2) و زمان هیدرولیز (X_3) در پنج سطح ($+\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$) استفاده گردید (جدول ۱).

موادشیمیایی و آنزیم آلکالاز از شرکت‌های معتبر (مرک و سیگما) تهیه شدند.

آماده‌سازی قارچ‌خوراکی: 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 آون 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 (۲۲).

تولید پروتئین هیدرولیز شده: جهت انجام هیدرولیز با آلکالاز از روش هی و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات استفاده شد (۲۲). ۵۰ گرم پودر قارچ در بالن حجمی توزین و با ۱۰۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ($\text{pH}=8$) مخلوط گردید. سپس به‌منظور بهینه‌سازی تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی به روش سطح پاسخ متغیرهای مستقل زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیر وابسته اندازه‌گیری قابلیت آنتی‌اکسیدانی نمونه هیدرولیز شده (به سه روش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH،

جدول ۱- سطوح متغیرهای مورد استفاده برای بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پودر قارچ

Table 1- Level of variables used to optimize the antioxidant activity of mushroom powder protein hydrolysate

حدود تغییرات					متغیرهای مستقل
Level of variables					Independent variables
$-\alpha$	-1	0	+1	$+\alpha$	
0.4	1.008	1.9	2.79	3.4	غلظت آنزیم (%)
25	33.10	45	56.89	65	Enzyme concentration (%) دما (درجه سانتی‌گراد)
30	72.56	135	197.43	240	Temperature (° C) زمان هیدرولیز (دقیقه)
					Hydrolysis time (Min)

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل بودند. به این منظور ۲۰ تیمار تصادفی، با در نظر گرفتن شش تکرار

پاسخ‌های مورد بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت مهارکنندگی یون Fe^{3+} و

در نقطه مرکزی توسط نرم افزار Design Expert جهت هیدرولیز، نیز در جدول ۲ ارائه شده است. پیشنهاد شد. تیمارهای پیشنهاد شده توسط نرم افزار

جدول ۲- تیمارهای تصادفی پیشنهادی جهت هیدرولیز پروتئین پودر قارچ توسط آنزیم آلكالاز

Table 2- Proposed random treatments for hydrolysis of mushroom powder protein by alcalase enzyme

تیمار	غلظت آنزیم (درصد)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی گراد)	زمان هیدرولیز (دقیقه)
Treatment	Enzyme concentration (%)	Hydrolysis temperature (°C)	Hydrolysis time (Min)
1	1.01	33.1	197.5
2	1.9	45	135
3	1.01	56.9	197.5
4	1.9	45	240
5	1.9	25	135
6	1.9	45	30
7	1.9	45	135
8	2.8	56.9	197.5
9	2.8	33.1	72.6
10	1.01	56.9	72.6
11	1.9	65	135
12	1.01	33.1	72.6
13	0.4	45	135
14	2.8	56.9	72.6
15	1.9	45	135
16	1.9	45	135
17	2.8	33.1	197.5
18	3.4	45	135
19	1.9	45	135
20	1.9	45	135

آزمون‌های شیمیایی

اندازه‌گیری میزان پروتئین: میزان پروتئین نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) با استفاده از روش کج‌لدال اندازه‌گیری شد. به این صورت که یک گرم از نمونه به درون لوله هضم کج‌لدال افزوده شد و به آن ۲۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ و یک قرص کاتالیزور هضم افزوده شد. از یک لوله هضم بدون نمونه و حاوی اسید و کاتالیزور به عنوان شاهد استفاده شد. عمل هضم به مدت ۱۲۰ دقیقه و با توان ۸۰ دستگاه تا شفاف شدن محتوی لوله انجام شد. پس از سرد شدن و خروج بخارات اسیدی مرحله‌ی تقطیر

با استفاده از سود ۴۰ درصد و اسید بوریک ۴ درصد با استفاده از دستگاه تقطیر انجام گرفت. در نهایت تیتراسیون نمونه با اسیدکلریدریک ۰/۱ نرمال در حضور معرف متیل‌رد و تا ارغوانی شدن نمونه صورت گرفت. درصد ازت نمونه با استفاده از معادله (۱) محاسبه شد (۲۴).

معادله (۱)

$$\text{درصد ازت نمونه} = \frac{1.4 \times N \times (V_1 - V_2)}{m} \times 100$$

در رابطه فوق N نرمالیت اسیدکلریدریک، V_1

حجم اسید مصرفی برای نمونه، V_2 حجم مصرفی برای شاهد و m وزن نمونه بر حسب گرم می‌باشد.

به‌منظور محاسبه درصد پروتئین میزان ازت در فاکتور پروتئین (۶/۲۵) ضرب و میزان آن محاسبه گردید.

اندازه‌گیری میزان رطوبت: ۲ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) در ظروف فلزی آلومینیومی مخصوص اندازه‌گیری رطوبت توزین شد و تا رسیدن به وزن ثابت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن در دیسکاتور و توزین مجدد میزان رطوبت از طریق معادله (۲) محاسبه گردید (۲۴).

معادله (۲)
$$\text{درصد رطوبت} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$
 در رابطه فوق W_1 وزن ظرف و نمونه قبل خشک کردن و W_2 وزن ظرف و نمونه بعد از خشک کردن و m وزن نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان خاکستر: ۲ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) در بوته‌چینی با وزن مشخص توزین گردید و پس از سوزاندن اولیه روی هیتر، بوته حاوی نمونه به کوره الکتریکی با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شد. عمل حرارت‌دهی در کوره تا زمانی که رنگ خاکستر روشن شود ادامه یافت. پس از سرد کردن بوته در دیسکاتور و توزین مجدد، مقدار خاکستر نمونه از طریق معادله (۳) محاسبه گردید (۲۴).

معادله (۳)
$$\text{درصد خاکستر} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$
 در رابطه فوق W_1 وزن بوته و خاکستر و W_2 وزن بوته و m وزن نمونه می‌باشد.

اندازه‌گیری میزان چربی: برای اندازه‌گیری چربی ۳ گرم نمونه (پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده) روی کاغذ صافی توزین شد و پس از بستن کاغذ صافی در قسمت استخراج کننده دستگاه سوکسله قرار داده شد. پس از متصل کردن بالن با وزن مشخص، بالن با حلال هگزان پر شد و عمل استخراج به مدت ۴ ساعت انجام گرفت. پس از طی این مراحل حلال اضافی

خارج شد و با قرار دادن بالن‌ها در آون با دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد باقی‌مانده حلال جداسازی و بالن مجدداً توزین شد. درصد چربی با استفاده از طریق معادله (۴) محاسبه گردید (۲۴).

معادله (۴)
$$\text{درصد چربی} = \frac{(W_1 - W_2)}{m} \times 100$$
 در رابطه فوق W_1 وزن ثانویه بالن، W_2 وزن اولیه بالن و m وزن نمونه می‌باشد.

آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از روش وو و همکاران (۲۰۰۳) تعیین شد (۷). ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (40mg/ml) حل شدند. سپس، ۱/۵ml از هر نمونه با ۱/۵ml از محلول اتانولی DPPH (0.15mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شد. سپس، مخلوط حاصل در ۲۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ و به مدت ۲۰ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از معادله (۵) محاسبه گردید.

معادله (۵)

درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

$$= \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

A_{control} جذب شاهد (حجم یکسانی از آب مقطر به جای نمونه با محلول DPPH مخلوط می‌شود) و A_{control} جذب نمونه می‌باشد. لازم به ذکر است که به دلیل جذب بالای محلول پروتئینی به دلیل رنگ بالای محلول، عمل رقیق سازی به نسبت ۱ به ۱۰ صورت گرفت و نتایج این بخش با محلول رقیق شده گزارش شده که البته به دلیل مقایسه‌ای بودن نتایج تیمارها خللی در بهینه‌سازی ایجاد نمی‌نماید.

این تحقیق از نرم‌افزار آماری Design Expert برای اعمال طرح آماری سطح پاسخ استفاده شد. طرح آماری مذکور به صورت کامپوزیت مرکزی و تعداد ۲۰ تیمار آزمایشی و شامل نقطه‌ی مرکزی با شش تکرار، طراحی گردید. متغیرهای مستقل زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیر وابسته قابلیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن، و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل) نمونه هیدرولیز شده تعریف شدند. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شدند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی: ترکیبات شیمیایی پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آن در جدول ۳ آورده شده است. همان‌طور که در جدول مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت پودر قارچ برابر با $6/2 \pm 0/52$ درصد بود. مقدار رطوبت قارچ خوراکی در حدود ۹۰ درصد بود که در طی فرایند خشک کردن به این میزان کاهش داده شد. میزان چربی و خاکستر پودر قارچ بر اساس وزن خشک، به ترتیب $(3/8 \pm 0/15)$ و $(7/66 \pm 0/17)$ بود؛ که به ترتیب کمتر و بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع می‌باشند (۱۶). میزان پروتئین پودر قارچ برابر با $1/26 \pm 26/6$ درصد اندازه‌گیری شد. اوبوه (۲۰۰۹) میزان پروتئین موجود در کلاهدک و ساقه قارچ را به ترتیب $33/65 \pm 0/15$ و $19/01 \pm 0/24$ ، میزان خاکستر را به ترتیب $10/17 \pm 0/20$ و $9/5 \pm 0/22$ ، و میزان چربی را به ترتیب $2/48 \pm 0/20$ و $2/00 \pm 0/24$ گزارش نمودند (۱۶). علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه به‌کار گرفته شده در این پژوهش با پژوهش‌های قبل را می‌توان به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرآیند خشک کردن نسبت داد. بعد از فرآیند هیدرولیز، میزان پروتئین در محصول هیدرولیز شده حاصل برابر با

آزمون قدرت احیاکنندگی یون آهن: این آزمون براساس بررسی قدرت احیا اتم آهن (III) توسط پروتئین هیدرولیز شده انجام شد. ابتدا پودرهای هیدرولیز شده در آب مقطر (40 mg/ml) حل شدند. سپس ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه با $2/5$ میلی‌لیتر از بافر فسفات $0/2$ مولار ($\text{pH}=6/6$) و $2/5$ میلی‌لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱ درصد مخلوط گردید. مخلوط در دمای 50 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه گرم‌خانه‌گذاری شد و سپس $2,5$ میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید 10 درصد (وزنی-حجمی) به آن اضافه شد. مخلوط برای 10 دقیقه با 3000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت $2,5$ میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با $2/5$ میلی‌لیتر آب مقطر و $0/5$ میلی‌لیتر از محلول $0/1$ درصد وزنی (وزنی-حجمی) کلرید آهن مخلوط گردید. پس از چند دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در 700 نانومتر خوانده شد. حجم یکسانی آب مقطر به جای نمونه برای تهیه نمونه کنترل استفاده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاکنندگی است (۲۵).

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: جهت انجام این آزمون، ابتدا 100 میکرولیتر از نمونه محلول پودر هیدرولیز شده (40 mg/ml) شده با 1000 میکرولیتر معرف مولیبدات (اسید سولفوریک $0/6$ مولار، سدیم فسفات 28 میلی مولار و مولیبدات آمونیوم 4 میلی مولار) مخلوط گردید و سپس به مدت 90 دقیقه در بن‌ماری 95 درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از خنک شدن نمونه‌ها، جذب نمونه‌ها در طول موج 695 نانومتر اندازه‌گیری گردید (۲۶).

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور بهینه‌یابی فرآیند هیدرولیز پروتئین پودر قارچ، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده شد و ترسیم نمودارها توسط نرم‌افزار Design Expert صورت گرفت. در

۳۱/۹۴ درصد بود. دلیل افزایش میزان پروتئین در محصول تولیدی فرآیند هضم آنزیمی و به دنبال آن سانتیفرژ محصول تولیدی بود که موجب حذف

یکسری ترکیبات موجود در قارچ از جمله چربی و همچنین ترکیبات معدنی متصل به ساختار می‌گردد.

جدول ۳- ترکیب شیمیایی پودر قارچ و پروتئین هیدرولیز شده قارچ (بر حسب درصد)

Table 3- Chemical composition of mushroom powder and mushroom protein hydrolyzate

پروتئین هیدرولیز شده قارچ Mushroom protein hydrolysate	پودر قارچ Mushroom powder	ترکیب (%) Composition (%)
31.94 ± 1.41	26.6 ± 0.17	پروتئین (N×۶۲۵) Protein
-	3.8 ± 0.15	چربی Fat
8.79 ± 0.17	6.02 ± 0.52	رطوبت Moisture
4.26 ± 0.23	7.66 ± 0.12	خاکستر Ash
55.01 ± 0.7	55.92 ± 0.15	کربوهیدرات (اختلاف از سایر ترکیبات) Carbohydrate by Diff.

*اعداد بر مبنای وزن خشک و به صورت میانگین سه تکرار ± انحراف معیار گزارش شدند.

Data reported as dry basis and Mean ± standard deviation of three replications

بهینه‌یابی فرآیند به منظور دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت آنتی‌اکسیدانی: آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش جهت ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۷۲۴۷ و ۰/۷۱۳۵ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. بالا بودن ضریب تبیین حاکی از این امر است که مدل رگرسیون قادر به توصیف مناسب از شرایط است و توانسته ۷۲/۴۷ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده: ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تمام تیمارهای پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز، در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تیمارهای مختلف در سطح ۵ درصد وجود داشت.

بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: در معادله ۷ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (خاصیت فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH) ارائه شد:

معادله (۷)

$$= 12.13 + 1.24 (X_1) + 2.36 (X_2) - 2.82 (X_3) - 0.52 (X_1X_2) + 1.55 (X_1X_3) + 1.23 (X_2X_3)$$

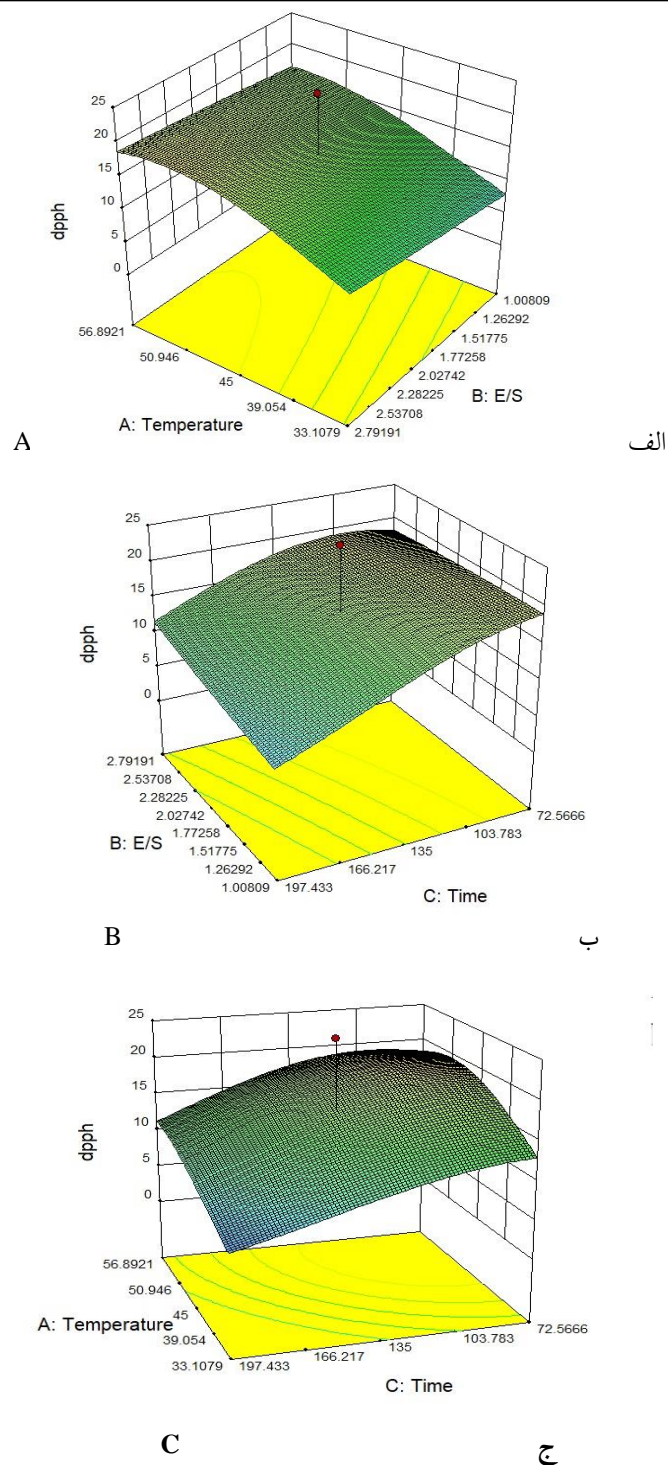
که در این معادله، (X₁) به عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا، (X₂) به عنوان دمای هیدرولیز و (X₃) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

جدول ۴- تیمارهای تصادفی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پودر قارچ حاصل توسط تیمار با آنزیم آلکالاز
Table 4. Random treatments and antioxidant activity of protein hydrolysate obtained from mushroom powder by treatment using alcalase enzyme

تیمار Treatment	غلظت آنزیم (%) Enzyme concentration (%)	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد) Hydrolysis temperature (°C)	زمان هیدرولیز (دقیقه) Hydrolysis time (Min)	فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (%) DPPH free radical scavenging activity (%)	فعالیت احیاکنندگی Fe ³⁺ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) Fe ³⁺ Reducing activity (absorbance at 700 nm)	ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر) Total antioxidant capacity (absorbance at 695 nm)
1	1.01	33.1	197.5	6.3	0.32	1.076
2	1.9	45	135	12.6	0.16	1.124
3	1.01	56.9	197.5	10.5	0.327	1.118
4	1.9	45	240	1.7	1.074	1.327
5	1.9	25	135	2.5	0.18	0.921
6	1.9	45	30	19.7	0.143	1.042
7	1.9	45	135	25	0.521	1.308
8	2.8	56.9	197.5	16.3	0.707	1.201
9	2.8	33.1	72.6	13.3	0.174	1.041
10	1.01	56.9	72.6	15.5	0.323	1.116
11	1.9	65	135	14.5	0.255	1.099
12	1.01	33.1	72.6	11.6	0.22	0.976
13	0.4	45	135	7.5	0.306	0.975
14	2.8	56.9	72.6	10.5	0.419	1.158
15	1.9	45	135	12.8	0.69	1.315
16	1.9	45	135	12.7	0.162	1.124
17	2.8	33.1	197.5	9.8	0.39	1.189
18	3.4	45	135	14.1	0.823	1.479
19	1.9	45	135	12.9	0.164	1.125
20	1.9	45	135	12.9	0.164	1.125

غلظت آنزیم بالاتر در زمان ثابت استفاده نمود. بسیاری از محققین گزارش نمودند که با پیشرفت هیدرولیز پپتیدهای با وزن مولکولی پایین بوجود می‌آیند که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند (۲۷). مقصودلو و همکاران (۲۰۱۷) با هیدرولیز پروتئین دانه گرده‌ی گل با آنزیم پیسین گزارش کردند که افزایش غلظت آنزیم از ۱ درصد به ۲ درصد، منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی حاصل از حدود ۵۰ درصد به ۱۰۰ درصد گردید (۲۸).

اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: نمودار سه بعدی تأثیر دما و غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا (در زمان ۱۳۵ دقیقه) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۱-الف نشان می‌دهد که افزایش دما و نیز افزایش نسبت غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا، تأثیر مثبتی بر افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشت و منجر به افزایش آن گردید. بنابراین بهتر است جهت دستیابی به بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، از دما و



شکل ۱- نمودار سه بعدی (الف) تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، (ب) زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا و (ج) دما

و زمان بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH (برحسب درصد)

(در تمامی اشکال متغیر سوم در نقطه مرکزی و ثابت فرض شده است که عبارت است از زمان ۱۳۵ دقیقه، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد

و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۹ درصد).

Figure 1- Three-dimensional diagram of (A) the effect of temperature and enzyme-to-substrate ratio, (B) time and enzyme-to-substrate ratio (C) time and temperature on DPPH free radical scavenging activity (%) (In all figures the third variable was assumed to be at its central level which is time 135 minutes, temperature 45 °C and enzyme/substrate ratio of 1.9%).

به رادیکال DPPH ترکیبات پایدار را تولید کنند. گزارش شده است که افزایش گروه‌های با زنجیره جانبی حاوی اسیدهای آمینه هیدروفوب موجب سهولت دسترسی پپتیدها جهت واکنش با رادیکال‌های آزاد DPPH می‌گردد (۳۱). افزایش زمان، تأثیر منفی بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشت که دلیل این امر می‌تواند ناشی از پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده پروتئینی باشد که باعث شکستن زنجیره‌ی برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تشکیل شده در مراحل اولیه هیدرولیز و کاهش آن‌ها می‌شود. گزارش شده است که تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی با گذشت زمان در اثر تغییر طول زنجیره‌های پپتیدی حاصل یا افزایش هیدرولیز می‌باشد (۳۲).

بررسی قدرت احیا کنندگی Fe^{3+} : معادله ۸ با توجه به ضرایب رگرسیون و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (قدرت احیا کنندگی Fe^{3+}) ارائه شد:

معادله (۸)

$$= 1.52 - 0.18 (X_1) - 0.18 (X_2) - 0.36 (X_3) - 0.13 (X_1X_2) - 0.11 (X_1X_3) + 0.097 (X_2X_3)$$

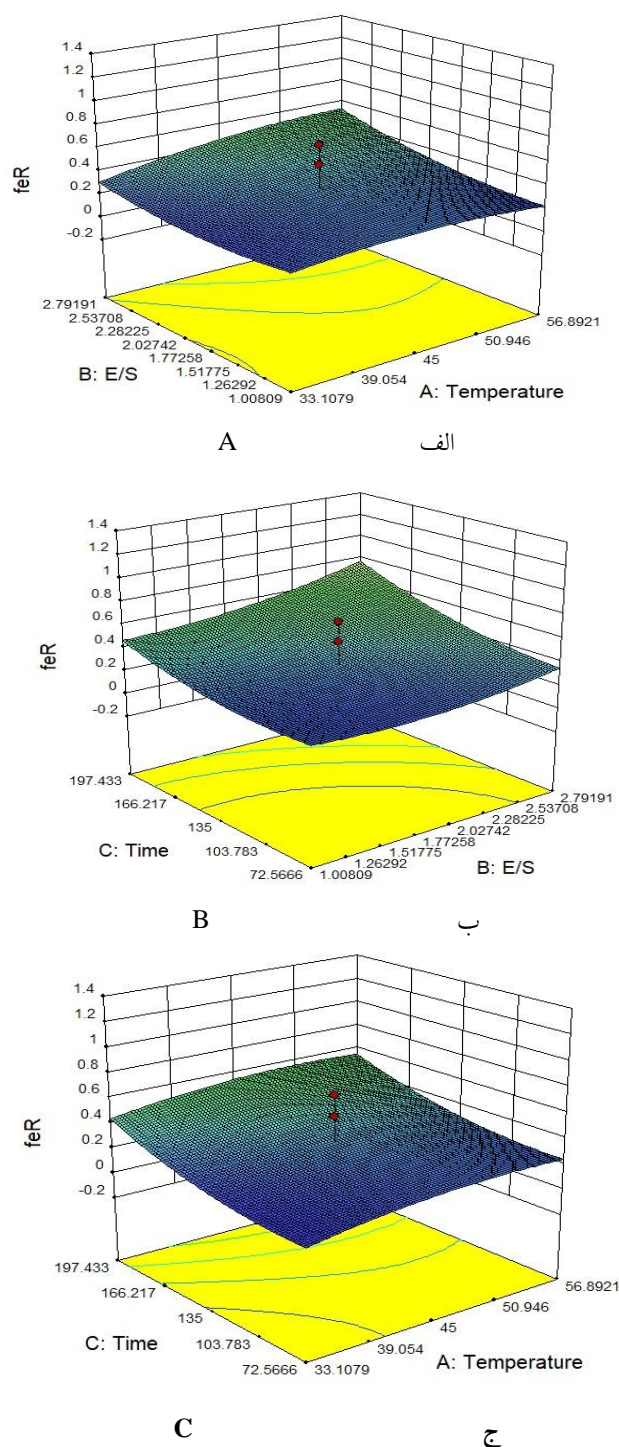
که در این معادله، (X_1) به‌عنوان غلظت آنزیم به سوبسترا، (X_2) به‌عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به‌عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است. آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش جهت ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود. در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل‌شده به ترتیب برابر با ۰/۶۵۴۳ و ۰/۶۲۲۱ به‌دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بود. ضریب تبیین برابر ۰/۶۵۴۳ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل

نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت آنزیم آلکالاز به سوبسترا (در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، در شکل ۱-ب نشان می‌دهد که افزایش زمان تا حدی موجب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH گردید، اما با افزایش زمان هیدرولیز این میزان مهار دچار کاهش گردید. همچنین افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا، تأثیر مثبتی بر افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد. مظلومی و همکاران (۲۰۲۰) با هیدرولیز پروتئین ضایعات هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین نشان دادند که افزایش دما و افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا تأثیر مثبتی بر افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشت (۲۹). مشکین فر و همکاران (۲۰۱۴) 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 و در نتیجه از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاسته می‌شود (۳۰). احتمالاً پیشرفت هیدرولیز و تأثیر آنزیم بر پپتیدهای تولید شده در مراحل اولیه منجر به تخریب پپتیدهایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا شده است و در نتیجه قابلیت آنتی‌اکسیدانی محصول تولیدی در مراحل بعدی کاهش یافته است. نمودار سه‌بعدی تأثیر دما و زمان (در میزان بهینه نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۹ درصد) بر فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۱-ج، نشان می‌دهد که با افزایش دما، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافته و کمترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، در پایین‌ترین حد دمایی (۳۵ درجه سانتی‌گراد) مشاهده شد. نور محمدی و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که افزایش دما منجر به افزایش درجه هیدرولیز و ایجاد پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌گردد، که می‌تواند با انتقال هیدروژن

آهن سه ظرفیتی به یون آهن دو ظرفیتی افزایش می‌یابد (۳۳). نمودار سه‌بعدی تأثیر زمان و غلظت آنزیم آلکالاز به سوبسترا (در دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد) بر قدرت احیاءکنندگی یون آهن در شکل ۲-ب نشان می‌دهد که افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا و نیز افزایش زمان هیدرولیز، سبب افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن می‌شود و بیشترین فعالیت احیاءکنندگی Fe^{3+} ، در غلظت ۲/۷۹ درصد آنزیم و زمان ۱۹۷ دقیقه مشاهده شد. تأثیر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر روی افزایش قدرت احیاءکنندگی یون آهن در مقادیر بالاتر هر دو پارامتر محسوس‌تر بود. جی و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که با افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، پپتیدهای با قابلیت دادن الکترون جهت احیاء یون آهن سه‌ظرفیتی به یون آهن دو ظرفیتی افزایش می‌یابد (۳۳). به‌طور کلی با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم بکار برده شده جهت انجام هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و سبب تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای با وزن مولکولی پایین می‌گردد. بسته به وزن مولکولی، بار و ساختار فضایی زنجیره انتهایی پپتیدهای تولید شده ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن‌ها افزایش می‌یابد (۳۴). در تطابق با این یافته‌ها مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶)، با هیدرولیز پروتئین گرده گل گزارش کردند که با افزایش هیدرولیز تا حدود ۳/۵ ساعت، قدرت احیاءکنندگی افزایش می‌یابد و پیشرفت هیدرولیز منجر به کاهش قدرت احیاءکنندگی می‌گردد (۲۸). خانتافانت و همکاران (۲۰۱۱)، نیز افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی را با افزایش زمان هیدرولیز گزارش کردند (۳۵).

رگرسینون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۶۵/۴۳ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به‌دست آمده را توضیح دهد.

اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت احیاءکنندگی Fe^{3+} : نمودار سه‌بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم آلکالاز به سوبسترا (در زمان ۱۳۵ دقیقه) بر فعالیت احیاءکنندگی Fe^{3+} در شکل ۲-الف نشان می‌دهد که افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا با شیب ملایم سبب افزایش فعالیت احیاءکنندگی یون آهن می‌شود، بیشترین فعالیت احیاءکنندگی یون آهن در بالاترین غلظت آنزیم مشاهده شد. افزایش دما یک روند افزایشی بر فعالیت احیاءکنندگی Fe^{3+} داشته و با افزایش دما، روند احیاءکنندگی یون آهن به آرامی افزایش یافت. در دماهای بالاتر تأثیر افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا بر میزان قدرت احیاءکنندگی یون آهن محسوس‌تر بود. جامدار و همکاران (۲۰۱۰) افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده را به رها شدن اسیدهای آمینه با قابلیت آنتی‌اکسیدانی مانند لیزین و تریپتوفان نسبت دادند (۱۰). نورمحمدی و همکاران (۲۰۱۹) دلیل روند افزایشی قدرت احیاء یون آهن را افزایش درجه هیدرولیز و در نتیجه افزایش تولید پپتیدهای دهنده الکترون و رهایش آن‌ها از زنجیره پپتیدی دانستند (۳۱). جی و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که هیدرولیز آنزیمی، سبب شکستن اتصالات مجاور اسیدهای آمینه فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان شده و به دنبال شکسته شدن این باندهای پپتیدی و رها شدن از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدها کاهش یافته و سپس با افزایش زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز و شکسته شدن بیشتر زنجیره‌های پپتیدی، پپتیدهای با قابلیت دادن الکترون جهت احیاء یون



شکل ۲- نمودار سه‌بعدی (الف) تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، (ب) زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا و (ج) دما و

زمان بر قدرت احیا کنندگی Fe^{3+}

(در تمامی اشکال متغیر سوم در نقطه مرکزی و ثابت فرض شده است که عبارت است از زمان ۱۳۵ دقیقه، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۹ درصد).

Figure 2- Three-dimensional graph of the effect (A) temperature and enzyme-to-substrate ratio (B) time and enzyme-to-substrate ratio (C) time and temperature on the Fe^{3+} reducing power (In all figures the third variable was assumed to be at its central level which is time of 135 minutes, temperature 45 °C and enzyme/substrate ratio of 1.9%).

در این پژوهش میزان ضریب تبیین و ضریب تبیین تعدیل شده به ترتیب برابر با ۰/۸۰۶۱ و ۰/۷۸۲۵ به دست آمد که اعداد به دست آمده بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بودند. ضریب تبیین برابر ۰/۸۰۶۱ نشان‌دهنده‌ی این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش توانسته ۸۰/۶۱ درصد از کل تغییرات در دامنه نتایج به دست آمده را توضیح دهد.

اثر پارامترهای هیدرولیز بر روی قابلیت

آنتی‌اکسیدانی کل: نمودار سه بعدی تأثیر دما و نسبت آنزیم آلکالاز به سوسترا (در زمان ۱۳۵ دقیقه) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (شکل ۳-الف) نشان می‌دهد که دمای هیدرولیز باعث افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل محصول تولیدی گردید. غلظت آنزیم به سوسترا یک تأثیر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل نشان داد، به طوری که با افزایش این پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل روند افزایشی نشان داد. بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی پروتئین هیدرولیز شده نوعی کوسه ماهی (*Mustelus mustelus*) با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز قلیایی، پپسین و تریپسین، نشان دادند که با افزایش غلظت آنزیم و درجه هیدرولیز، قابلیت آنتی‌اکسیدانی کل در نمونه‌های هیدرولیز شده نیز افزایش می‌یابد و بیشترین میزان فعالیت در غلظت ۳ mg/ml آنزیم گزارش شد (۲۵). نمودار سه بعدی تأثیر زمان و نسبت غلظت آنزیم آلکالاز به سوسترا (در دمای بهینه ۴۵ درجه سانتی‌گراد) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (شکل ۳-ب) نشان می‌دهد که زمان هیدرولیز و نسبت آنزیم به سوسترا یک تأثیر افزایشی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشت اما تأثیر نسبت آنزیم به سوسترا بر افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل بارزتر از زمان بود.

نمودار سه بعدی تأثیر دما و زمان هیدرولیز (در نسبت آنزیم آلکالاز به سوسترا ۱/۹ درصد) قدرت احیاءکنندگی یون آهن در شکل ۲-ج نشان می‌دهد که دمای هیدرولیز یک تأثیر افزایشی بر فعالیت احیاءکنندگی یون آهن داشت. زمان هیدرولیز نیز سبب افزایش فعالیت احیاءکنندگی یون آهن محصول تولیدی می‌شود؛ و بیشترین فعالیت احیاءکنندگی یون آهن، در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۹۷ دقیقه مشاهده شد. شعبانپور و همکاران (۲۰۱۷) با هیدرولیز پروتئین میگو با آنزیم فلاورزیوم، افزایش قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده را با افزایش دما در زمان ثابت گزارش کردند (۳۶). خانتافات و همکاران (۲۰۱۱) با هیدرولیز پروتئین گوشت نوعی ماهی گزارش کردند که افزایش زمان هیدرولیز همراه با درجه هیدرولیز منجر به افزایش قدرت احیاءکنندگی پپتیدهای حاصل گردید (۳۵). وو و همکاران (۲۰۰۳) با هیدرولیز ماهی ماکرول با آنزیم پروتئاز N، افزایش قدرت احیاءکنندگی آهن را با افزایش زمان هیدرولیز گزارش کردند (۷).

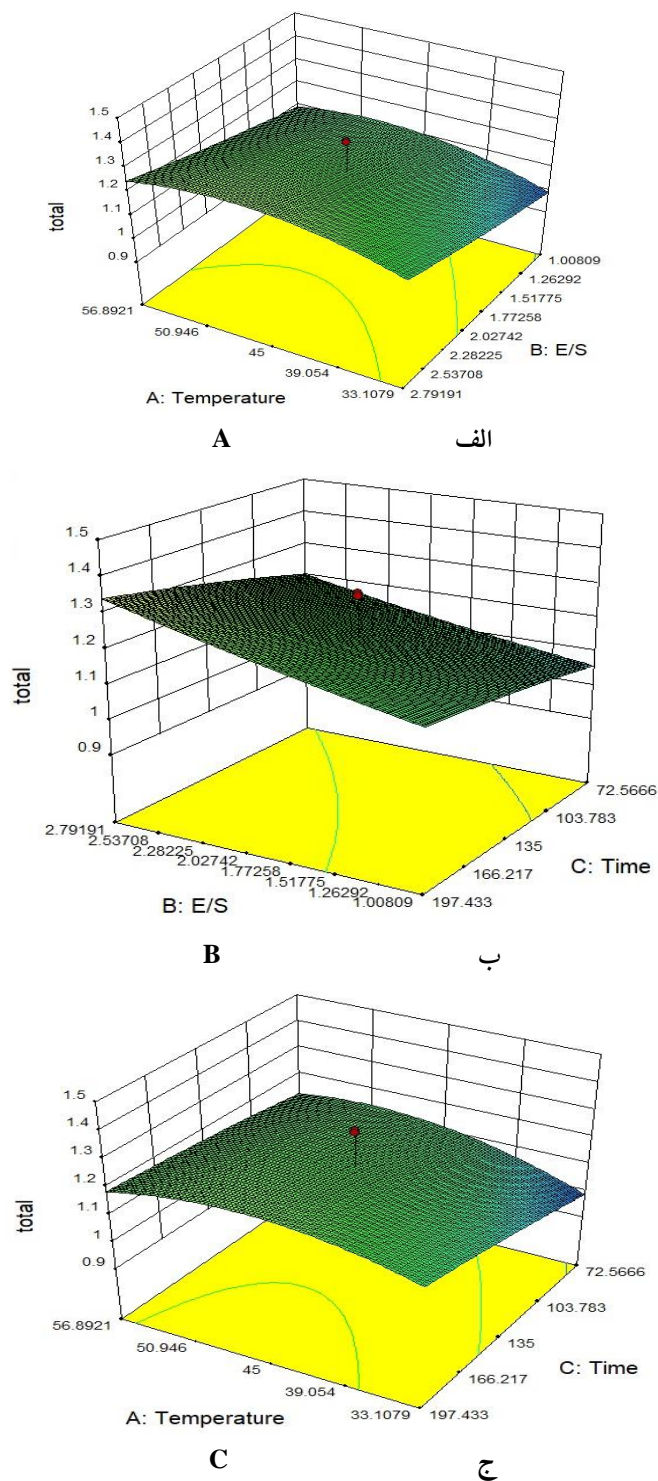
بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل: معادله ۹ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) ارائه شد:

معادله (۹)

$$\text{ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل} = 1.14 + 0.084 (X_1) + 0.045 (X_2) + 0.057 (X_3) - 6.625 (X_1 X_2) + 0.11 (X_1 X_3) - 0.025 (X_2 X_3)$$

که در این معادله، (X_1) به عنوان غلظت آنزیم به سوسترا، (X_2) به عنوان دمای هیدرولیز و (X_3) به عنوان زمان انجام هیدرولیز گزارش شده است.

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. ضرایب تبیین واقعی و تبیین تعدیل شده و فقدان برازش جهت ارزیابی کارایی مدل به منظور پیش‌بینی پاسخ‌ها به کار می‌رود.



شکل ۳- نمودار سه بعدی (الف) تأثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا، (ب) زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا و (ج) دما

و زمان بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی کل

(در تمامی اشکال متغیر سوم در نقطه مرکزی و ثابت فرض شده است که عبارت است از زمان ۱۳۵ دقیقه، دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترا ۱/۹ درصد).

Figure 3- Three-dimensional diagram of the effect of (A) temperature and enzyme-to-substrate ratio, (B) time and enzyme-to-substrate ratio (C) time and temperature on the total antioxidant capacity (In all figures the third variable was assumed to be at its central level which time is 135 minutes, temperature is 45 °C and enzyme/substrate ratio is 1.9%).

پان و همکاران (۲۰۱۶) 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 (۳۷). مظالمومی و همکاران (۲۰۲۰)، بوگاتف و همکاران (۲۰۰۹) به ترتیب با هیدرولیز پروتئین دانه پرتقال و ماهی گزارش کردند که با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل محصول هیدرولیز شده تولیدی افزایش یافت (۲۹ و ۲۵). کاوه و همکاران (۲۰۱۹) با هیدرولیز پروتئین‌های شنبلیله گزارش کردند افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم پانکراتین و آلکالاز همراه با افزایش درجه هیدرولیز پروتئین منجر به افزایش قابل توجه قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها شد (۳۸).

نمودار سه‌بعدی تأثیر دما و زمان (در غلظت بهینه نسبت آنزیم آلکالاز به سوبسترا ۲ درصد) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل (شکل ۳-ج) نشان می‌دهد که افزایش هر دو پارامتر دما و زمان هیدرولیز تأثیر صعودی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل داشتند. کاوه و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که با پیشرفت هیدرولیز آنزیم آلکالاز می‌تواند با شکستن زنجیره‌های پروتئینی، پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهی تولید کند که منجر به تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدارتر شده در نتیجه قدرت آنتی‌اکسیدانی کل افزایش یافته است (۳۸). نتایج تحقیقات مختلف نشان‌دهنده این است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده به‌طور قابل توجهی به منبع اولیه پروتئین، نوع و مقدار آنزیم و شرایط فرآیند وابسته می‌باشد، همچنین کارایی پپتیدها در ممانعت از واکنش‌های اکسیداسیون به‌وجود بقایای اسیدهای آمینه در آن‌ها بستگی دارد (۳۹). مشخص شده است که

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر ویژگی‌های ساختاری نظیر ترکیب اسید آمینه و اندازه پپتید یا وزن ملکولی آن قرار دارد (۴۰). به‌عنوان مثال، پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای که حاوی مقادیر بالای اسیدهای آمینه آبریز هستند، نظیر پروتئین‌های هیدرولیز شده و بخش‌های پپتیدی حاصل از هضم متوالی پروتئین نخود با پپسین و پانکراتین، دارای ویژگی به‌دام‌اندازی رادیکال آزاد قوی بودند (۴۱). علاوه بر این، پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی اسیدهای آمینه اسیدی بار منفی (نظیر گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید) به دلیل سادگی اهدای الکترون اضافی توسط این اسیدهای آمینه، می‌توانند به صورت بالقوه به‌عنوان به‌دام‌اندازنده رادیکال‌های آزاد و یا کاهنده یون‌های فلزی عمل نمایند (۴۲). پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای حاوی مقادیر بالای آلانین، لوسین، پرولین و هم‌چنین اسیدهای آمینه آروماتیک نظیر تریپتوفان، فیل‌آلانین، تیروزین و هیستیدین از طریق انتقال مستقیم الکترون -ها موجب ایجاد فعالیت قوی در به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد می‌گردند (۴۳). به‌طورکلی نتایج تحقیقات نشان داده است که در به‌دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد تأثیر جداگانه اسیدهای آمینه خاص در توالی پپتیدی نسبت به اثرات تجمعی اسیدهای آمینه از اهمیت بیشتری برخوردار است. با وجود این که جنبه‌های خاص ارتباط بین ساختار-عملکرد در پپتیدهای آنتی‌اکسیدان به‌خوبی شناخته نشده است، اما تصور می‌شود که نوع اسید آمینه و توالی آن‌ها فاکتورهای با اهمیتی در تعیین خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها است (۴۴). علاوه بر طول زنجیره، نوع اسید آمینه، ترکیب اسید آمینه، و توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها، موقعیت قرارگیری اسیدهای آمینه خاص در زنجیره پپتیدی نقش تعیین‌کننده‌ای در ویژگی آنتی‌اکسیدانی آن دارد (۴۳). علاوه بر این پپتیدهای آنتی‌اکسیدان، دارای اسیدهای آمینه

و ۱/۴۸ (جذب در طول موج ۶۹۵ نانومتر) برای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل به دست آمد. مقادیر آزمایشی تا حد بالایی مطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل بود که بیان‌گر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با حداکثر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی از پودر قارچ بود.

نتیجه‌گیری کلی

امروزه به‌منظور 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 نمود. از جمله راه‌کارهای موجود استفاده از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است. 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 زیست‌فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها تولید می‌شوند و دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند. قارچ خوراکی به‌عنوان منبعی غنی از مواد مغذی و ترکیبات سلامتی‌زا در صنایع غذایی گوناگون کاربرد دارد و از نظر پروتئین نیز غنی می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که با بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پودر قارچ می‌توان به محصولی با قابلیت آنتی‌اکسیدانی دست یافت. نتایج به‌دست آمده نشان داده است که جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده پودر قارچ با حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) توسط آنزیم آلکالاز شرایط بهینه شامل دمای ۴۷/۵ درجه‌سانتی‌گراد، زمان ۱۹۷ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۱ درصد بود.

آبگریز نظیر لوسین و والین در انتهای آمینی توالی خود هستند. همچنین مشخص شده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهایی که در ساختار خود دارای اسیدهای آمینه گوگرددار نوکلئوفیل (نظیر سیستئین و متیونین)، اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین، تریپتوفان، و تیروزین) و/یا دارای اسید آمینه حاوی حلقه ایمیدازول هیستیدین هستند عموماً دارای ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی قوی می‌باشند (۴۴). اسیدهای آمینه آبگریز نقش مهمی در به دام اندازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند، در حالی که اسیدهای آمینه قطبی مسئول شلاته‌کنندگی و احیاء یون‌های فلزی هستند.

بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز جهت تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا توسط آنزیم آلکالاز با استفاده از روش سطح پاسخ: نتایج به‌دست آمده نشان داد که شرایط بهینه جهت هیدرولیز پروتئین پودر قارچ جهت ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی Fe^{3+} و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل) توسط آنزیم آلکالاز، دمای ۴۷/۵ درجه‌سانتی‌گراد، زمان ۱۹۷ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۱ درصد بود که با درجه مطلوبیت ۱۰۰ درصد منطبق با ۱۰/۶۶۱ درصد فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH قدرت احیاءکنندگی یون آهن ۲/۴۵ (جذب در ۷۰۰ نانومتر)، و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل ۱/۲۲۴ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) بود. به‌منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی (در سه تکرار) در شرایط پیش‌بینی شده (دمای ۴۷/۵ درجه‌سانتی‌گراد، زمان ۱۹۷ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۱ درصد) توسط مدل اجرا گردید که مقادیر ۱۰/۷ درصد برای فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ۲/۶۴ (جذب در ۷۰۰ طول موج نانومتر) برای قدرت احیاءکنندگی یون آهن

References

- Salmanian, S., Sadeghi Mahoonak, A. R., Khomeiri, M., and Masteri Farahani, M.R. 2013. Phenolic acid content, antiradical and antimicrobial properties of *Mentha aquatica* leaf methanolic extract. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 8:2.145-154. (In Persian)
- Shahidi, F. and Zhong, Y. 2008. Bioactive peptides. Journal of AAOO International. 91:4.914-31.
- Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., and Tatematsu, M. 1986. Studies on antioxidants: The carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenic. Journal of Food and Chemical Toxicology. 24;10-11.1071-82.
- Shimizu, M., Sawashita, N., Morimatsu, F., Ichikawa, J., Taguchi, Y., Ijiri, Y., and Yamamoto, J. 2009. Antithrombotic papain-hydrolyzed peptides isolated from pork meat. Thrombosis Research. 123:5.753- 757.
- Beermann, C., Euler, M. Herzberg, J., and Stahl, B. 2009. Antioxidative capacity of enzymatically released peptides from soybean protein isolate. European Food Research and Technology. 229:4.644-637.
- 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. 36:9.949-957.
- Nimalaratne, C., Bandara, N., and Wu, J. 2015. Purification and characterization of antioxidant peptides from enzymatically hydrolyzed chicken egg white. Food Chemistry. 188.467-472.
- Gao, D., Cao, Y., and Li, H. 2010. Antioxidant activity of peptide fractions derived from cottonseed protein hydrolysate. Journal of the Science of Food and Agriculture. 90:11.1855-1860.
- 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.
- Girgih, A.T., He, R., Malomo, S., Offengenden, M., Wu, J., and Aluko, R. E. 2014. Structural and functional characterization of hemp seed (*Cannabis sativa* L.) protein-derived antioxidant and antihypertensive peptides. Journal of Functional Foods. 6.384-394.
- Korhonen, H., and Pihlanto, A. 2006. Bioactive peptides: Production and functionality. International Dairy Journal. 16: 9.945-960.
- Sherafat, N., Motamedzadegan A., and Safari. 2013. The effect of hydrolyzing time on cooked tuna fish (skipjack tuna) wastes by alcalase on protein recovery and the hydrolysate molecular weight. Innovation in Food Science and Technology. 3:17.47-54. (In Persian)
- Piri, G.S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., and Alami, M. 2015. Production and study on antioxidant activity of protein hydrolysates from whey protein. Iranian Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology. 282-271. (In Persian)
- Janakat, S.M., Al-Fakhiri, S.M., and Sallal, A.K.J. 2004. A promising peptide antibiotic from *Terfezia clavaryi* aqueous extract against *Staphylococcus aureus* in vitro. Phytotherapy Research. 18;10.810-813.
- Oboh, G., and Shodehinde, S. A. 2009. Distribution of nutrients, polyphenols and antioxidant activities in the pilei and stipes of some commonly consumed edible mushrooms in Nigeria. Chemical Society of Ethiopia. 23;3.391-398.
- Lavi, I., Nimri, L., and Levinson, D. 2012. Glucans from the edible mushroom *Pleurotus pulmonarius* inhibit colitis-associated colon carcinogenesis in mice. Journal of Gastroenterology. 47:5.504-518.
- Farzaneh, P., Khanahamadi, M., Ehsani, M.R., and Sharifan, A. 2018. Bioactive properties of *Agaricus bisporus* and *Terfezia clavaryi* proteins hydrolyzed by gastrointestinal proteases. LWT-Food Science and Technology. 91.322-329.

18. Kimatu, B.M., Zhao, L., Biao, Y., Ma, G., Yang, W., Pei, F., and Hu, Q. 2017. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chemistry*. 230:58–67.
19. Diniz, F.M., and Martin, A.M., 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*. 31:5:419-426.
20. Garrote, R.L., Coutaz, V.R., Luna, J. A., Silva, E.R., and Bertone, R.A. 1993. Optimizing processing conditions for chemical peeling of potatoes using response surface methodology. *Journal of Food Science*. 58:4:821-826.
21. He, J.Z., Ru, Q., Dong, D., and Sun, P. 2012. Chemical characteristics and antioxidant properties of crude water soluble polysaccharides from four common edible mushrooms. *Molecules*. 17:4:4373-87.
22. Pedramnia, A., Mortazavi, S.A., Sadeghi Mahoonak, A.R., Elhamirad, A.H., and Armin, M. 2017. Optimizing the production of hydrolyzed watermelon seed protein (*Citrullus lanatus*) by evaluating chelating activity using the response surface methodology. *Innovations in Food Science and Technology*. 9:4:123-133. (In Persian)
23. AOAC Method, 983.23 .2003. Fat in food, chloroform-methanol extraction. In *Official methods of analysis (15th ed; pp. 101-111)* Washington, DC, USA: Association of Official Analytical Chemists.
24. 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*. 114:4:1198-1205.
25. Prieto, P., Pineda, M., and Aguilar, M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry*. 269:337-341.
26. Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., and Kim, S.K. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Nutritional Biochemistry*. 16: 562-569.
27. Maghsudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., and Mohebbodini, H. 2017. Evaluation of the antioxidant properties hydrolyzed protein of bee pollen. *Journal of Food Science and Technology of Iran*. 13:73:227-240. (In Persian)
28. Mazloomi, N., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., and Hoshmand, G. 2020. Process optimization the production of hydrolyzed protein from orange seed waste with pepsin enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 15:1:35-48. (In Persian)
29. Meshkinfar, N., Sadeghi Mahoonak, A., Ziaifar, A.M., Ghorbani, M., and Kashani Nejad, M. 2014. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Tabriz Journal of Food Researches*. 24:2:215-225. (In Persian).
30. Nourmohammadi, E., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., and 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. (In Persian).
31. Piri, G.S., Sadeghi Mahoonak, A., Alami, M., and Ghorbani, M. 2019. Optimization of different factors affecting antioxidant activity of whey protein hydrolysate by response surface methodology. *Food Processing and Preservation Journal*. 11:1:117-130. (In Persian)
32. Je, J.Y., Lee, M.H., Lee, K., and Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and hypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 42:1266-1272.

33. Oveisipour, M., Abedian, A.M., 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 the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*. 115: 238-242.
34. Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M. R. 2011. The effects of pre-treatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brown stripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *LWT-Food Science and Technology*. 44: 4.1139-1148
35. Shabanpour, B., Kurdjazi, M., Nazari, M., and Esmaeili Kharaki, M. 2017. Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and ratio of enzyme to substrate on antioxidant properties of shrimp bioactive peptides. *Journal of Food Science and Technology of Iran*. 62:14.31-45. (in Persian).
36. Pan, X., Zhao, Y.-Q., Hu, F.-Y., and Wang, B. 2016. Preparation and identification of antioxidant peptides from protein hydrolysate of skate (*Raja porosa*) cartilage. *Journal of Functional Foods*, 25: 220-230.
37. Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A.R., Ghorbani, M., and Sarabandi, Kh. 2019. Comparison of antioxidant properties of hydrolyzed fenugreek seed protein with alcalase and pancreatin. *Journal of Innovations in Food Science and Technology*. 4.78-88. (In Persian)
38. Sarabandi, Kh., Sadeghi Mahoonak, A.R., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., and Jafari, S.M. 2018. Effect of casein enzymatic hydrolysis by pancreatin conditions on functional and antioxidant properties of casein hydrolysate. *Journal Food Science and Technology*. 10:15.303-318. (In Persian)
39. Ketnawa, S., Wickramathilaka, M., and Liceaga, A. M. 2018. Changes on antioxidant activity of microwave-treated protein hydrolysates after simulated gastrointestinal digestion: Purification and identification. *Food Chemistry*. 254.36-46.
40. Torres Fuentes, C., Contreras, M.D.M., Recio, I., Alaiz, M., and Vioque, J. 2015. Identification and characterization of antioxidant peptides from chickpea protein hydrolysates. *Food Chemistry*. 180. 194-202.
41. Zou, T.B., He, T.P., Li, H.B., Tang, H.W., and Xia, E.Q. 2016. The Structure activity relationship of the antioxidant peptides from natural proteins. *Molecules*. 21.72-89.
42. Gallego, M., Mora, L., and Toldrá, F. 2018. Characterisation of the antioxidant peptide AEEEYPDL and its quantification in Spanish dry cured ham. *Food Chemistry*. 258.8-15.
43. Nwachukwu, I.D., and Aluko, R.E. 2018. Antioxidant properties of flaxseed protein hydrolysates: Influence of hydrolytic enzyme concentration and peptide size. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 95.1105-1118.
44. Jackubczyk, A., Karas, M., Rybczynska-Tkaczyk, K., Zielinska, E., and Zielinski, D. 2020. Current Trends of Bioactive Peptides-New Sources and Therapeutic Effect. *Foods*. 9.846-875.

