

(OPEN ACCESS)

The effects of ultrasound and microwave pretreatments on the properties of the hydrolyzed protein of *Chlorella vulgaris* microalgae

Sakineh Yeganeh^{*1}, Mina Esmaeili², Alireza Sadeghi³

1. Corresponding Author, Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: skyeeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir
2. Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: mina.smaily@gmail.com
3. Dept. of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran. E-mail: alirezasadeghi137272@yahoo.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 11.24.2024
Revised: 12.09.2024
Accepted: 12.15.2024

Keywords:
Antioxidant property,
Chlorella vulgaris
microalgae,
Microwave,
Protein hydrolysate,
Ultrasound

ABSTRACT

Ultrasound and microwave are new technologies that have recently been widely used to perform hydrolysis. The aim of this study is to investigate the effect of modern ultrasound and microwave technologies on the properties of hydrolyzed protein of the microalgae *Chlorella vulgaris*. For this purpose, the microalgae *Chlorella vulgaris* was hydrolyzed with alcalase enzyme (temperature 50 °C, concentration 100 mg enzyme, pH=8, for four hours) under ultrasound waves (70 W for 10 minutes) and microwave (90 °C for 10 minutes). The results showed that the protein content with a value of (59.67 ± 0.12%) in the algae *Chlorella vulgaris* has the highest level. Among the chemical compositions of protein hydrolysate, the highest protein content was related to protein hydrolyzed with ultrasound with a value of (89.19±0.24%) (P<0.05) and the highest moisture, ash and fat content was related to enzymatic hydrolysis with values of 3.8±0.73, 8.2±0.22 and 14.37±0.07%, respectively (P<0.05). The degree of hydrolysis increased with the use of microwave and ultrasound and the highest value was related to ultrasound hydrolysis with 37.98±0.76% (P<0.05). The antioxidant performance was also improved by using pretreatment, such that the ultrasound hydrolyzed sample showed the highest value at all concentrations (P<0.05). The highest IC50 values of DPPH and ABTS radical scavenging power in ultrasound treatment were 0.22 ± 0.01 and 0.32 ± 0.02 mg/mL, respectively (P<0.05). In general, the results showed that the use of modern methods such as microwave and ultrasound can improve the antioxidant performance of *Chlorella vulgaris* algae hydrolysate.

Cite this article: Yeganeh, Sakineh, Esmaeili, Mina, Sadeghi, Alireza. 2026. The effects of ultrasound and microwave pretreatments on the properties of the hydrolyzed protein of *Chlorella vulgaris* microalgae. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 15 (1), 193-209.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2024.23020.1914

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

اثرات پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده ریز جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*)

سکینه یگانه^{۱*}، مینا اسمعیلی^۲، علیرضا صادقی^۳

۱. نویسنده مسئول، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: skyeganeh@gmail.com ; s.yeganeh@sanru.ac.ir
۲. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: mina.smaily@gmail.com
۳. گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران. رایانامه: alirezasadeghi137272@yahoo.com

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله:	اولتراسوند و مایکروویو فناوری جدیدی هستند که اخیراً به‌طور گسترده برای انجام هیدرولیز
مقاله کامل علمی - پژوهشی	به‌کار گرفته می‌شوند. هدف از این مطالعه بررسی تأثیر فناوری‌های نوین اولتراسوند و مایکروویو بر خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده ریز جلبک کلرلا ولگاریس (<i>Chlorella vulgaris</i>) است.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۰۴	برای این منظور ریز جلبک کلرلا ولگاریس با آنزیم آلکالاز (دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم آنزیم، pH=۸، به مدت چهار ساعت) تحت امواج اولتراسوند (۷۰ وات به مدت ۱۰ دقیقه) و مایکروویو (۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه) هیدرولیز شد. نتایج حاصل نشان داد که میزان پروتئین (۰/۱۲ ± ۵۹/۶۷ درصد) در جلبک کلرلا ولگاریس بالاترین میزان را دارا می‌باشد. در میان ترکیبات شیمیایی بالاترین میزان پروتئین، مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با کمک اولتراسوند با مقدار (۰/۲۴ ± ۸۹/۱۹ درصد) بود (P<۰/۰۵) و بیش‌ترین میزان رطوبت، خاکستر و چربی مربوط به هیدرولیز آنزیمی بدون پیش‌تیمار و به ترتیب با مقدار ۰/۷۳ ± ۳/۸، ۰/۲۲ ± ۸/۲ و ۰/۰۷ ± ۱۴/۳۷ درصد بود (P<۰/۰۵). درجه هیدرولیز با به‌کارگیری مایکروویو و اولتراسوند افزایش یافت و بیش‌ترین مقدار مربوط به هیدرولیز اولتراسوند (۰/۷۶ ± ۳۷/۹۸ درصد) بود (P<۰/۰۵). عملکرد آنتی‌اکسیدانی نیز با استفاده از پیش‌تیمار بهبود یافت به‌طوری‌که نمونه هیدرولیز شده با اولتراسوند بیش‌ترین مقدار را در تمامی غلظت‌ها از خود نشان داد و نمونه حاصل از پیش‌تیمار با مایکروویو نیز نسبت به تیمار شاهد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت (P<۰/۰۵). به‌طورکلی نتایج نشان داد استفاده از روش‌های نوین مانند اولتراسوند می‌تواند باعث بهبود عملکرد آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات جلبک کلرلا ولگاریس شود.
واژه‌های کلیدی:	اولتراسوند، پروتئین هیدرولیز شده، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ریز جلبک کلرلا ولگاریس، مایکروویو

استناد: یگانه، سکینه، اسمعیلی، مینا، صادقی، علیرضا (۱۴۰۵). اثرات پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده ریز جلبک کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*). نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۵ (۱)، ۱۹۳-۲۰۹.

Doi: 10.22069/japu.2024.23020.1914



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

ریزجلبک‌ها به دلیل هزینه تولید کم، رشد سریع، عدم رقابت برای زمین‌های زراعی و مزایای زیست‌محیطی در مقایسه با منابع رایج (حیوانی)، به‌عنوان یک منبع زیستی جایگزین مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱). غنی بودن ریزجلبک‌ها از ترکیبات مهم، مانند پلی‌ساکاریدها، لیپیدها، پروتئین‌ها و ویتامین‌ها (۲)، پتانسیل آن‌ها را برای انواع کاربردهای صنعتی، مانند زیست‌پزشکی، غذایی، و لوازم آرایشی-بهداشتی نشان می‌دهد. هیدرولیز پروتئین یک روش جایگزین روش‌های سنتی برای ارزش بخشیدن به زیست‌توده جلبکی است (۳)، زیرا محصول نهایی دارای انحلال‌پذیری، قابلیت هضم و خواص زیست‌فعال بالایی است که ارزش بازاری آن را افزایش می‌دهد (۴). کلرلا ولگاریس (*Chlorella vulgaris*) یک ریزجلبک با ترکیب غذایی جالب شامل لیپیدها، کربوهیدرات‌ها، فیبر، ویتامین‌ها و پروتئین‌ها است. کلرلا به دلیل محتوای بالای پروتئین که معمولاً تا ۶۰ درصد است، مورد توجه است. هیدرولیز پروتئین‌های ریزجلبک می‌تواند چندین ویژگی جالب دیگر را افزایش دهد، زیرا منجر به آزاد شدن پپتیدهای فعال زیستی با فعالیت‌های زیستی متعدد می‌شود. پپتیدهای زیست‌فعال مختلفی از *C. vulgaris* تولید شده است که خواص ارزشمندی مانند آنتی‌اکسیدانی (۵)، ضد فشار خون (۶)، ضد التهاب (۷)، ضد سرطان (۵) و ضد میکروبی (۶) را نشان می‌دهند. علاوه بر این، پپتیدهای ریزجلبک ممکن است به دلیل خواص عملکردی مانند حلالیت (۸) و هم‌چنین خواص امولسیون‌کنندگی (۸) و کف‌کنندگی (۹)، که می‌تواند برای کاربردهای صنعتی مفید باشد، مورد توجه قرار گیرد (۱۰). استخراج متوالی با استفاده از رویکردهای تکنولوژیکی چندگانه یا با استفاده از چندین حلال به‌صورت متوالی با موفقیت برای بهبود استخراج

ترکیبات با ارزش بالا از جلبک‌ها استفاده شده است (۱۱). وجود دیواره سلولی سفت و سخت در *C. vulgaris* مانع از استخراج پروتئین‌های داخل سلولی می‌شود (۱۲). استخراج مرسوم پروتئین‌ها از گونه‌های کلرلا وقت‌گیر است، زیرا برای دستیابی به بازیابی قابل‌توجهی از ترکیبات، به‌هم‌زدن طولانی‌مدت نیاز است. تکنیک‌ها و پروتکل‌های استخراج جدید برای استخراج پروتئین‌های *C. vulgaris* مورد نیاز است. شکستن دیواره سلولی توسط تیمارهای مکانیکی، حرارتی، شیمیایی، اولتراسوند و آنزیمی می‌تواند به‌طور قابل‌توجهی کارایی استخراج پروتئین‌ها را از زیست‌توده افزایش دهد (۱۲ و ۱۳). مرحله ازهم‌گسیختگی سلولی ریزجلبک‌ها بخش مهمی از فرآیند است، زیرا با بخش بزرگی از هزینه کلی فرآیند مرتبط است و می‌تواند به دستیابی به راندمان بالاتر استخراج پروتئین کمک کند. معمولاً، فرآیندهای تخریب و شکستن سلول قبل از استخراج انجام می‌شود تا سلول‌های ریزجلبک را مختل کنند و آزادسازی مولکول‌های زیستی ارزشمند را تحریک کنند (۱۴). روش‌های مختلفی برای استخراج ترکیبات از ریزجلبک‌ها مانند روش‌های مرسوم و استخراج کمک اولتراسوند وجود دارد. روش‌های مرسوم استخراج ترکیبات از ریزجلبک‌ها، مانند استخراج مایع-مایع یا جامد-مایع، معمولاً به زمان استخراج طولانی و مقادیر زیادی حلال نیاز دارند و حتی می‌توانند باعث از بین رفتن برخی از مواد مغذی و ترکیبات زیست‌فعال در طول استخراج شوند. استخراج با استفاده از اولتراسوند به‌طور گسترده برای استخراج ترکیبات با ارزش افزوده بالا از ریزجلبک‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (۱۵). اولتراسوند نیاز به مصرف حلال کم‌تری دارد، زمان استخراج را کوتاه کرده و منجر به بازده استخراج مناسبی می‌شود. در واقع، اولتراسوند دیواره سلولی ریزجلبک‌ها را تجزیه

می‌کند و از این رو می‌توان ترکیب فعال زیستی را استخراج کرد. این امر اولتراسوند را به روشی جایگزین برای استخراج کارآمد در مقایسه با روش‌های استخراج معمولی تبدیل می‌کند (۱۶ و ۱۷). مایکروویوها امواج الکترومغناطیسی غیریونیزه با فرکانس بین ۳۰۰ مگاهرتز تا ۳۰۰ گیگاهرتز هستند و بین اشعه ایکس و اشعه مادون قرمز در طیف الکترومغناطیسی قرار می‌گیرند (۱۸). از اثرات حرارتی انرژی مایکروویو برای گرم کردن حلال‌های قطبی در تماس با نمونه‌های جامد استفاده می‌شود. افزایش شرایط دما و فشار ناشی از گرمایش باعث تسریع رهاسازی ترکیبات کاربردی از سلول‌ها می‌شود (۱۹). استخراج ترکیبات با استفاده از مایکروویو یک روش سبز جایگزین برای ازهم‌گسیختگی سلولی با زمان فرآیند کوتاه، نیاز به انرژی کم و بدون استفاده از مواد شیمیایی خطرناک ارائه می‌دهد (۲۰).

۲- پیکریل هیدرازیل (DPPH)، و ۲،۲-آزینوبیس (ABTS) 3 ethylbenzothiazoli-6-sulfnic acid) از شرکت سیگما آلدریج تهیه شد. تمام مواد شیمیایی مورد استفاده در این کار دارای درجه خلوص بالا بودند.

هیدرولیز آنزیمی جلبک: هیدرولیز آنزیمی بر اساس روش هیو و همکاران (۲۰۰۳) با تغییرات جزئی انجام شد (۲۳). ۲ گرم از پودر جلبک با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی شیکردار (SWB-35، کره جنوبی) انکوبه شد. بعد از تنظیم pH (pH=۸) و دما (۵۰ درجه سانتی‌گراد)، ۱۰۰ میلی‌گرم آنزیم L FG ۲/۴ آلکالاز به ترکیب اضافه گردید. پس از افزودن آنزیم، محلول به مدت ۴ ساعت در شرایط هیدرولیز باقی ماند (۲۴). واکنش آنزیمی با عملیات حرارتی در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه متوقف شد. و سپس بلافاصله در حمام یخ محصول حاصل از هیدرولیز خنک شد. هیدرولیزات در ۵۰۰۰g و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ (320R، آلمان) شد. هم‌چنین pH سوپرناتانت حاصل روی ۷ (با HCL یا NaOH) تنظیم گردید. در نهایت سوپرناتانت به دست آمده فریزدرایر شد و تا زمان آنالیز در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. هیدرولیز آنزیمی جلبک با ۳ تکرار صورت گرفت. (۲۵ و ۲۲).

پیش‌تیمار مایکروویو: نمونه‌ها پس از طی مراحل آماده‌سازی مشابه با روش ذکر شده در بالا، پیش از افزودن آنزیم آلکالاز، تحت تیمار با مایکروویو (LG, MH 8265 کره جنوبی) قرار گرفتند. بدین‌منظور نمونه‌های هم‌وزن شده در ظروف درب‌دار

با توجه به مطالب بیان شده، در مطالعه حاضر تأثیر پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر میزان پروتئین محلول، درجه هیدرولیز و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی کلرلا ولگاریس هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

پودر جلبک کلرلا ولگاریس از شرکت کاسپین خریداری شد و تا زمان هیدرولیز آنزیمی در ظرف‌های پلاستیکی درب‌دار و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (۲۲). آنزیم آلکالاز L ۲/۴

دستگاه‌های کج‌دال (V50، ایران)، سوکسله (6 CTF، ایران)، کوره الکتریکی (14-KLI، ایران) و آن الکتریکی (UF55، Memmert آلمان) سنجش شد (۲۸).

درجه هیدرولیز: درجه هیدرولیز براساس روش هویل و مریت (۱۹۹۴) سنجش شد (۲۹). مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. بدین منظور ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیزشده با ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شده و سپس با دور ۸۰۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری تعیین و درجه هیدرولیز با معادله زیر محاسبه شد:

$$\left(\frac{\text{درجه هیدرولیز}}{\%} \right) = \frac{100 \times \text{میزان نیتروژن در محلول } 10\% \text{ تری کلرواستیک اسید}}{\text{میزان نیتروژن در نمونه}}$$

$$DPPH = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100 = \text{درصد مهار رادیکال}$$

که در آن، Ab جذب نمونه شاهد، AS جذب نمونه استاندارد- جذب رنگ نمونه جلبک هیدرولیز شده. **فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS:** برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش آلمان و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد (۳۲). محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه شد و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگهداری شد. پس از طی زمان موردنظر، رقیق‌سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب 0.02 ± 0.07 در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه (در غلظت‌های مختلف) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق‌سازی‌شده ABTS مخلوط

مخصوص مایکروویو، در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد، فرکانس ۲۴۵۰ هرتز، به مدت ۱۰ دقیقه تحت تیمار با مایکروویو قرار گرفتند (۲۶). ادامه مراحل هیدرولیز به روش ذکر شده در بالا انجام گرفت.

پیش تیمار اولتراسوند: به منظور پیش تیمار با اولتراسوند (Up 400 Power Sonic 405، آمریکا) نیز نمونه‌های هموزن شده پیش از افزودن آنزیم، با فرکانس ۳۰ کیلوهرتز، شدت ۷۰ وات و به مدت ۱۰ دقیقه تحت تیمار با اولتراسوند قرار گرفتند (۲۷). ادامه مراحل هیدرولیز به روش ذکر شده در بالا صورت پذیرفت.

آنالیز تقریبی: مقادیر پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در جلبک و پودر پروتئین هیدرولیزشده با استفاده از روش‌های استاندارد AOAC و به ترتیب با

پروتئین محلول: مقدار پروتئین محلول به روش لوری و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از آلبومین سرم گاو (۱-۰/۱ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد و خواندن جذب نمونه‌ها با استفاده از دستگاه خوانش جذب میکروپلیت (Plate Reader, Epoch2)، در طول موج ۷۵۰ نانومتر سنجش شد (۳۰).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: برای انجام این آزمایش به حجم معینی از محلول نمونه، همان میزان از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال طبق رابطه زیر محاسبه گردید (۳۱):

و سپس همگنی واریانس‌ها از طریق آزمون لون (Leven) بررسی گردید. آنالیز واریانس یکطرفه جهت مقایسه آماری تیمارهای مختلف و آزمون دانکن جهت مقایسه چندگانه میانگین‌ها (سطح ۵ درصد) استفاده شد و جهت رسم نمودارها از نرم‌افزار Excel استفاده شد.

نتایج و بحث

آنالیز تقریبی ریزجلبک کلرلا و لگاریس *C. vulgaris*
 و پروتئین هیدرولیز شده آن: جدول ۱ میانگین آماری پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت ریزجلبک کلرلا و لگاریس *C. vulgaris* و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پیش‌تیمارهای مختلف را ارائه می‌دهد. براساس جدول ۱، محتوای پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت در جلبک کلرلا و لگاریس به ترتیب $8/2 \pm 0/22$ درصد، $59/67 \pm 0/12$ درصد و $3/8 \pm 0/73$ درصد است که در این میان پروتئین بیش‌ترین مقدار را به خود اختصاص داد. محتوای پروتئین در بین تیمارهای پروتئین هیدرولیز شده متفاوت بود و بیش‌ترین میزان مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند و کم‌ترین میزان مربوط به تیمار پروتئین هیدرولیز شده بدون استفاده از فناوری نوین بوده است که این مقادیر به ترتیب $89/19 \pm 0/24$ درصد و $82/67 \pm 0/6$ درصد بود و تیمار اولتراسوند تفاوت معناداری با سایر تیمارها نشان داد ($P < 0/05$). بیش‌ترین مقدار چربی، خاکستر و رطوبت در بین پروتئین‌های استخراج شده مربوط به تیمار پروتئین هیدرولیز شده بدون پیش‌تیمار و به ترتیب $4/1 \pm 0/02$ درصد، $7/3 \pm 0/12$ درصد و $2/52 \pm 0/01$ درصد بود در حالی که کم‌ترین مقدار چربی، خاکستر و رطوبت مربوط به تیمار اولتراسوند و به ترتیب $1/52 \pm 0/05$ درصد، $4/27 \pm 0/34$ درصد و $2/29 \pm 0/05$ درصد بود که اختلاف معنی‌داری با سایر تیمارها داشت

و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی زمان موردنظر، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه نیز از غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{ABTS درصد مهارکنندگی} = \frac{Ab-As}{Ab} \times 100$$

که در آن، Ab جذب نمونه شاهد، As جذب نمونه استاندارد- جذب رنگ نمونه جلبک هیدرولیز شده.

قدرت کاهندگی یون آهن (FRAP): برای اندازه‌گیری قدرت کاهندگی آهن (FRAP) در عصاره جلبکی، از روش چئو و همکاران (۲۰۰۸) استفاده شد (۳۳). برای انجام این آزمایش ابتدا ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار ($\text{pH}=6/6$) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری سیانات پتاسیم ۱ درصد با ۱ میلی‌لیتر از غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده مخلوط شد. این محلول در حمام آبی با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در محیط تاریک به مدت ۲۰ دقیقه نگهداری شد. سپس به این محلول ۲/۵ میلی‌لیتر اسید تری‌کلرواستیک ۱۰ درصد اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دور 3000 rpm سانتریفیوژ شد. در ادامه، ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن ۰/۱ درصد به ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط اضافه گردید. سپس این محلول در دمای محیط به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا ایجاد رنگ صورت پذیرد. سپس جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از محلول اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف استفاده شد و قدرت کاهندگی آهن بر حسب میلی‌گرم اسید آسکوربیک بر گرم پودر جلبکی خشک شده بیان شد.

تجزیه و تحلیل آماری: به منظور تجزیه و تحلیل نتایج از نرم‌افزار SPSS ۲۶ استفاده شد. بررسی نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون شاپیروویک (Shapiro-Wilk)

می‌کنند، در نتیجه کارایی فرآیند هیدرولیز آنزیمی را افزایش می‌دهند (۳۴). در مطالعه حاضر میزان پروتئین در هیدرولیز با کمک مایکروویو بالاتر از هیدرولیز آنزیمی بود که می‌توان بیان کرد که فرآیند مایکروویو باعث ایجاد ارتعاش در آب و سایر مولکول‌های قطبی می‌شود و دما را بالا می‌برد که این امر باعث پارگی دیواره سلولی ریزجلبک‌ها شده و بازیابی پروتئین‌ها را نسبت به روش‌های مرسوم افزایش می‌دهد (۳۵).

($P < 0.05$). در مطالعه یومگو و همکاران (۲۰۲۱) بیان شده است که در هیدرولیز آنزیمی با کمک اولتراسوند، حباب‌های پدیده کایتاسیون به دلیل عمل مکانیکی ایجاد شده توسط برهمکنش امواج ضربه‌ای منفجر می‌شوند و نیروی برشی مکانیکی بسیار قابل‌توجهی ارائه می‌دهند. در نتیجه، گروه‌های آبدوست موجود در پروتئین در طول دناتوره شدن آزاد می‌شوند، حلالیت را افزایش می‌دهند و اتصال آنزیم به بستر را ساده‌تر

جدول ۱- ترکیبات مختلف (درصد) ریزجلبک کلرلا (*C. vulgaris*) و پروتئین هیدرولیز شده آن.

Table 1. Various components (%) of microalgae *Chlorella (C. vulgaris)* and its hydrolyzed protein.

پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند Ultrasound Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو Microwave Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده Hydrolyzed Protein	جلبک کلرلا ولگاریس <i>C. vulgaris</i> algae	ترکیب
89.19±0.24 ^a	86.67±0.03 ^b	82.34±0.60 ^c	59.71±0.10	پروتئین Protein
1.52±0.05 ^c	2.10±0.04 ^b	4.10±0.02 ^a	14.37±0.07	چربی Fat
4.27±0.34 ^c	5.72±0.09 ^b	7.30±0.12 ^a	8.20±0.22	خاکستر Ash
2.29±0.05 ^c	2.37±0.54 ^b	2.52±0.01 ^a	3.80±0.73	رطوبت Moisture

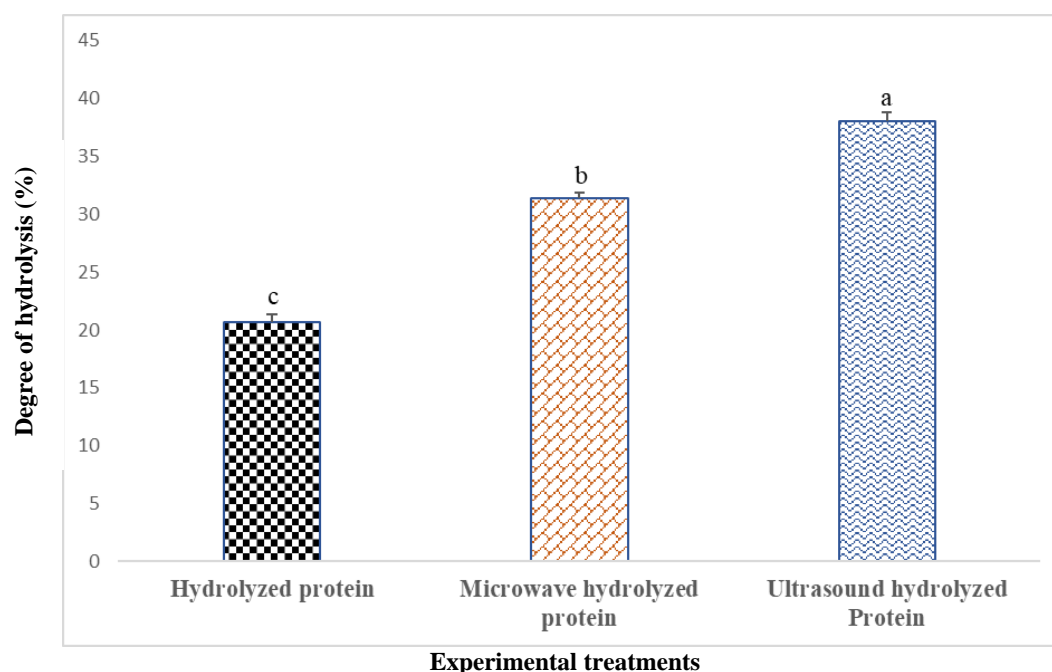
میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشند ($P < 0.05$)
Mean ± standard deviation of three replicates, different letters in row indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$)

زمان هیدرولیز کافی و نسبت آنزیم به سوبسترای مناسب دارد (۳۶). طی مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۹ درجه هیدرولیز جلبک اسپرولینا با استفاده از معرف ارتوفتال‌آلدهید (OPA) سنجیده شد و بیش‌ترین افزایش درجه هیدرولیز (0.75 ± 25.08 درصد) در ساعت اول هیدرولیز رخ داده بود. پس از گذشت زمان میزان درجه هیدرولیز به $1/22 \pm 33/45$ درصد افزایش یافت (۳۷). مناسب بودن pH مستقیماً بر فعالیت آنزیم آلكالاز تأثیر می‌گذارد و در نتیجه DH را افزایش می‌دهد (۳۸). در مطالعه حاضر با به کارگیری مایکروویو و اولتراسوند درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز (DH): شکل ۱ نشان‌دهنده درجه هیدرولیز پروتئین‌های استخراج شده از جلبک کلرلا ولگاریس *C. vulgaris* است. در مطالعه حاضر بیش‌ترین و کم‌ترین میزان درجه هیدرولیز مربوط به پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند و پروتئین هیدرولیز شده بدون استفاده از روش‌های نوین بود که به ترتیب $37/98 \pm 0/76$ درصد و $20/65 \pm 0/65$ درصد بوده است ($P < 0.05$). هم‌چنین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو با میزان $29/43 \pm 0/52$ نسبت به تیمار شاهد افزایش معناداری داشت ($P < 0.05$). افزایش درجه هیدرولیز نیاز به pH بهینه،

مطالعه هم راستا بود. به نظر می‌رسد که پیش‌ تیمار مایکروویو پیوندهای پروتئینی را مستعد هیدرولیز می‌کند و تشعشعات مایکروویو ممکن است سرعت تا شدن و باز شدن پروتئین‌های کروی را افزایش دهد (۴۲). در مقابل، مطالعه دیگری نشان داد که درجه هیدرولیز پروتئین برنج پس از پیش‌ تیمار اولتراسونیک به‌طور قابل‌ توجهی افزایش نمی‌یابد (۴۳). نتایج متضاد ممکن است به تفاوت‌های آشکار در نوع و ماهیت پروتئین در بین پروتئین‌های مختلف مورد مطالعه مربوط باشد (۴۴).

افزایش یافت. این ممکن است به دلیل اختلال در ساختار پروتئین توسط امواج اولتراسوند باشد (۳۹). اولوکو و همکاران در سال ۲۰۱۳ و رسیندیز- وازکوئز و همکاران در سال ۲۰۱۷ گزارش دادند که پیش‌ تیمار اولتراسونیک درجه هیدرولیز کنساتره پروتئین شیر را افزایش داد که با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر مطابقت دارد (۴۰ و ۴۱). در مطالعه‌ای با استفاده از گرمایش مایکروویو (هیدرولیز به کمک مایکروویو) توانستند درجه هیدرولیز را در مقادیر نسبتاً کوتاهی از زمان هیدرولیز افزایش دهند (۲۶) که با نتایج این



شکل ۱- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده از ریز جلبک کلرلا (*C. vulgaris*).

میانگین \pm انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف را نشان می‌دهند ($P < 0.05$).

Figure 1. Hydrolysis degree of hydrolyzed protein from microalgae *Chlorella* (*C. vulgaris*).
Mean \pm standard deviation of three replicates, different letters indicate significant differences among treatments ($P < 0.05$).

یافت ($P < 0.05$)، هم‌چنین در هیدرولیز با اولتراسوند اثر آنتی‌اکسیدانی قابل‌ملاحظه‌ای در غلظت‌های مختلف مشاهده شد به گونه‌ای که در غلظت ۰/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر $1/56 \pm 93/40$ درصد فعالیت نشان داد ($P < 0.05$). بر اساس جدول ۳، IC_{50} مهارکنندگی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: براساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۲) از بررسی فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ریزجلبک کلرلا ولگاریس، با افزایش غلظت پروتئین، میزان مهارکنندگی افزایش

با استفاده از ترکیب اولتراسوند + مایکروویو + آنزیم ۳/۱ میلی گرم بر میلی لیتر بود که فعالیت قابل توجهی در مهار DPPH از خود نشان داد. در مطالعه مذکور هیدرولیز پروتئین به دست آمده توسط اولتراسوند- آنزیم میزان IC_{50} ۳/۱۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود این در حالی است هیدرولیز مایکروویو- آنزیم بیشترین IC_{50} (۴/۳۱ میلی گرم بر میلی لیتر) و کمترین مهار DPPH را نسبت به هیدرولیزهای دیگر از خود نشان داد. در این مطالعه میزان IC_{50} برای هیدرولیز اولتراسوند کمترین مقدار بود و بیشترین مهار DPPH را از خود نشان داد و هیدرولیز آنزیمی بدون پیش تیمار بیشترین IC_{50} و کمترین مهار DPPH در غلظت‌های مختلف نسبت به سایر هیدرولیزها را از خود به نمایش گذاشت. با به کارگیری اولتراسوند و مایکروویو ترکیب اسید آمینه آزاد شده از فعالیت آنزیم به ویژه اسیدهای آمینه ضروری مانند متیونین، هیستیدین، فنیل آلانین و تیروزین می‌تواند بر فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی تأثیر بگذارد که ثابت شده است دهنده پروتون قوی تری نسبت به سایر اسیدهای آمینه هستند (۴۸).

DPPH پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند کمترین مقدار را به خود اختصاص داد که 0.22 ± 0.01 میلی گرم بر میلی لیتر بود ($P < 0.05$). IC_{50} شاخصی است که برای ارزیابی کارایی فعالیت‌های مهارکنندگی استفاده می‌شود و IC_{50} پایین نشان دهنده فعالیت مهارکنندگی بالاتر است (۴۵). در مطالعه‌ای که فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده تیلاپیا با استفاده از اولتراسوند را مورد بررسی قرار دادند مشخص شد که هیدرولیز به کمک اولتراسونیک در ۷۰ وات بالاترین فعالیت رادیکال آزاد DPPH را در میان هیدرولیزهای پیش تیمار نشده از خود نشان داد (۲۷). فناوری اولتراسوند در طول هیدرولیز باعث کاهش وزن مولکولی می‌شود و با قرار گرفتن مقادیر بیشتری از باقی مانده‌های آبرگیز در معرض برهمکنش‌های پپتیدی با مولکول DPPH را تقویت می‌کند (۴۶). علاوه بر این، اولتراسوند برای کاهش زمان هیدرولیز و افزایش آزادسازی پپتیدهای فعال زیستی مفید است (۴۷). مقدار IC_{50} در مطالعه‌ی پروتئین هیدرولیزهای تهیه شده از ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sinensis*)

جدول ۲- ارزیابی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف (بر حسب درصد) پروتئین‌های هیدرولیز شده ریزجلبک کلرلا (*C. vulgaris*).

Table 2. Evaluation of DPPH free radical scavenging power at different concentrations (%) of hydrolyzed proteins of the microalgae *Chlorella (C. vulgaris)*.

غلظت (میلی گرم / میلی لیتر)	پروتئین هیدرولیز شده (درصد)	پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو (درصد)	پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند (درصد)
Concentration (mg/ml)	Hydrolyzed Protein (%)	Microwave Hydrolyzed Protein (%)	Ultrasound Hydrolyzed Protein (%)
0.1	15.45±0.06 ^{Ch}	34.93±0.30 ^{Bh}	37.93±0.30 ^{Ag}
0.2	25.54±0.05 ^{Cg}	41.20±1.57 ^{Bg}	44.43±0.47 ^{Af}
0.3	41.21±0.07 ^{Cf}	53.20±0.40 ^{Bf}	56.13±0.94 ^{Ae}
0.4	57.66±0.06 ^{Ce}	63.30±0.96 ^{Be}	65.46±0.45 ^{Ad}
0.5	66.75±0.03 ^{Cd}	70.70±0.45 ^{Bd}	74.29±0.74 ^{Ac}
0.6	72.87±0.06 ^{Cc}	78.70±0.78 ^{Bc}	81.21±0.59 ^{Ab}
0.7	82.40±0.03 ^{Cb}	91.50±0.30 ^{Bb}	93.40±1.56 ^{Aa}
0.8	86.95±0.07 ^{Ba}	95.30±0.65 ^{Aa}	-

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف بزرگ متفاوت (A، B و C) در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مختلف می‌باشند. حروف کوچک متفاوت (a، b، c، d، e، f، g و h) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین غلظت‌های مختلف می‌باشد ($P < 0.05$)

Mean ± standard deviation of three replicates, different capital letters in row indicate significant differences among treatments, different small letters in column indicate significant differences among concentrations ($P < 0.05$)

جدول ۳- مقادیر غلظت مهارکننده ۵۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ریز جلبک کلرلا (*C. vulgaris*) در مهار رادیکال DPPH

Table 3. IC₅₀ values of hydrolyzed protein from the microalgae *Chlorella* (*C. vulgaris*) for inhibiting DPPH radical.

پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند Ultrasound Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده به مایکروویو Microwave Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده Hydrolyzed Protein	تیمار Treatment
0.22±0.01 ^c	0.26±0.02 ^b	0.35±0.02 ^a	غلظت مهارکننده ۵۰ درصد (میلی گرم/ میلی لیتر) (mg/ml) IC ₅₀

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مختلف می باشد (P<۰/۰۵)
Mean ± standard deviation of three replicates, different letters indicate significant differences among treatments (P<0.05)

و پپتیدهای کوچک نیز بر فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیر می‌گذارد (۴۹). در مطالعه‌ای دیگر، فعالیت مهار رادیکال ABTS هیدرولیز تیلایپا با استفاده از اولتراسوند را مورد بررسی قرار دادند که هیدرولیز به کمک اولتراسونیک در ۷۰ وات بالاترین فعالیت رادیکال ABTS را در میان هیدرولیزهای پیش تیمار نشده نشان داد. در مطالعه حاضر نیز هیدرولیز با کمک اولتراسوند بیشترین مهار ABTS را در بین سایر تیمارها نشان داد (P<۰/۰۵). مقدار IC₅₀ در مطالعه هیدرولیزهای پروتئین تهیه شده از ماهی خاویاری چینی (*A. sinensis*) با استفاده از ترکیب اولتراسوند + مایکروویو + آنزیم ۱/۵۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود که این هیدرولیز فعالیت قابل توجهی در مهار ABTS از خود نشان داد (P<۰/۰۵)، به دنبال آن در هیدرولیز پروتئین به دست آمده توسط اولتراسوند- آنزیم میزان IC₅₀ ۲/۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر بود این در حالی است هیدرولیز مایکروویو- آنزیم بیشترین مقدار IC₅₀ و کمترین مهار ABTS را نسبت به هیدرولیزهای دیگر از خود نشان داد (۴۸). نتایج مطالعه حاضر با نتایج مطالعه بیان شده هم‌راستا بود به طوری که بیشترین تا کمترین میزان IC₅₀ به ترتیب مربوط به هیدرولیز بدون پیش تیمار، هیدرولیز مایکروویو و هیدرولیز اولتراسوند بود. اولتراسوند می‌تواند توان اهدای الکترون پروتئین هیدرولیز شده را تقویت کند. این ممکن است با اصلاح ساختار پپتید آزاد شده مرتبط

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS: نتایج حاصل از مهار رادیکال آزاد ABTS نشان داد (جدول ۴) که میزان مهارکنندگی با افزایش غلظت پروتئین افزایش یافت (P<۰/۰۵) که در هیدرولیز با اولتراسوند در غلظت ۰/۸ میلی گرم بر میلی لیتر با مقدار ۸۱/۳۳±۰/۷۵ درصد بیشترین مهارکنندگی را نسبت به سایر هیدرولیزها از خود نشان داد (P<۰/۰۵). براساس جدول ۵، کمترین میزان IC₅₀ در مهارکنندگی ABTS مربوط به هیدرولیز با اولتراسوند با مقدار ۰/۳۲±۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر بود (P<۰/۰۵). در مطالعه کتتا و همکاران در سال ۲۰۱۷ فعالیت ABTS را در پیش تیمار مایکروویو در دمای بالا (۹۰ درجه سانتی گراد) و به دنبال آن هیدرولیز آنزیمی به روش متداول حمام آبی و پیش تیمار مایکروویو در دمای بالا (۹۰ درجه سانتی گراد) و هیدرولیز آنزیمی با کمک مایکروویو را در ماهی قزل‌آلای رنگین کمان مورد بررسی قرار دادند که به ترتیب از ۶۰-۵۵ درصد و ۶۲-۳۴ درصد گزارش کردند که نسبت به هیدرولیز آنزیمی بدون پیش تیمار مایکروویو افزایش مهار رادیکال ABTS را نشان دادند (۲۶)، که با مطالعه حاضر هم‌راستا بود. افزایش مهارکنندگی ABTS در پیش تیمار دمای بالا همراه با هیدرولیز آنزیمی می‌تواند ناشی از طیف گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک تر و اسیدهای آمینه آزاد تولید شده باشد. علاوه بر این، تغییرات در اندازه، سطح و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد

باشد (۲۷). سامارانایکا و لی چان در سال ۲۰۰۸ اسید آمینه‌هایی شامل والین یا لوسین در انتهای N، آلانین یا تیروزین در انتهای C و سایر اسیدهای آمینه مانند پرولین یا هیستیدین در توالی‌ها را به عنوان پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی شناسایی کردند (۵۰). تغییرات در فعالیت مهار رادیکال آزاد بین هیدرولیزهای به دست آمده توسط پیش تیمارهای مختلف ممکن است به تغییرات در اندازه پپتیدها و ترکیب اسیدهای آمینه آن‌ها نسبت داده شود که در طول فرآیند هیدرولیز رخ داده است (۵۱).

جدول ۴- ارزیابی فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در غلظت‌های مختلف (بر حسب درصد) پروتئین هیدرولیز شده ریزجلیک کلرلا (*C. vulgaris*).

Table 4. Evaluation of ABTS free radical scavenging activity at different concentrations (%) of hydrolyzed protein of microalgae *Chlorella (C. vulgaris)*.

پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند (درصد) Ultrasound Hydrolyzed Protein (%)	پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو (درصد) Microwave Hydrolyzed Protein (%)	پروتئین هیدرولیز شده (درصد) Hydrolyzed Protein (%)	غلظت (میلی گرم / میلی لیتر) Concentration (mg/ml)
41.48±0.58 ^{Ah}	39.20±0.98 ^{Bh}	36.44±0.38 ^{Ch}	0.1
44.56±0.75 ^{Ag}	41.26±1.13 ^{Bg}	40.50±1.22 ^{Bg}	0.2
49.70±0.64 ^{Af}	46.33±0.75 ^{Bf}	43.60±0.75 ^{Cf}	0.3
53.76±0.20 ^{Ae}	50.36±1.06 ^{Be}	49.36±0.20 ^{Ce}	0.4
59.96±0.15 ^{Ad}	58.56±0.56 ^{Bd}	52.60±0.34 ^{Cd}	0.5
66.23±1.00 ^{Ac}	64.43±1.20 ^{Bc}	59.63±0.58 ^{Cc}	0.6
73.16±0.58 ^{Ab}	69.50±0.88 ^{Bb}	67.30±0.30 ^{Cb}	0.7
81.33±0.75 ^{Aa}	78.46±0.66 ^{Ba}	73.73±0.68 ^{Ca}	0.8

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف بزرگ متفاوت (A, B, C) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشند. حروف کوچک متفاوت (a, b, c, d, e, f, g, h) در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف می‌باشد (P<0.05).

Mean ± standard deviation of three replicates, different capital letters in row indicate significant differences among treatments, different small letters in column indicate significant differences among concentrations (P<0.05)

جدول ۵- مقادیر غلظت مهارکننده ۵۰ درصد پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ریزجلیک کلرلا (*C. vulgaris*) در مهار رادیکال ABTS.

Table 5. IC₅₀ values of hydrolyzed protein from the microalgae *Chlorella (C. vulgaris)* for inhibiting ABTS radical.

پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند Ultrasound Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو Microwave Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده Hydrolyzed Protein	تیمار Treatment
0.32±0.02 ^c	0.37±0.01 ^b	0.42±0.01 ^a	غلظت مهارکننده ۵۰ درصد (میلی گرم / میلی لیتر) (mg/ml) IC ₅₀

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد (P<0.05).
Mean ± standard deviation of three replicates, different letters indicate significant differences among treatments (P<0.05)

قدرت کاهندگی یون آهن (III) (FRAP): براساس نتایج به‌دست آمده (جدول ۶) با افزایش غلظت پروتئین، قدرت کاهندگی یون آهن افزایش یافت ($P < 0/05$) و بیش‌ترین مقدار مربوط به هیدرولیز با اولتراسوند بود که در غلظت‌های مختلف افزایش معنی‌داری نسبت به سایر پروتئین‌های هیدرولیزشده داشت که در غلظت ۰/۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر این مقدار $1/053 \pm 0/04$ درصد بود ($P < 0/05$). در مطالعه‌ای دیگر، هیدرولیز تیلایپا با استفاده از اولتراسوند در ۷۰ وات بالاترین قدرت کاهندگی را در میان هیدرولیزهای پیش‌تیمارنشده نشان داد و این پژوهش‌گران بیان داشتند که افزایش زمان پیش‌تیمار بر قدرت کاهشی هیدرولیز پروتئین تیلایپا تأثیر می‌گذارد، به ویژه زمانی که با ۷۰ وات پیش‌تیمار شود. سایر پارامترها، شدت توان و زمان فرآیند نیز ممکن است به این اثر کمک کنند (۲۷). قدرت کاهندگی یون آهن در مطالعه هیدرولیزهای پروتئین تهیه شده از ماهی خاویاری چینی (*A. sinensis*) با استفاده از ترکیب اولتراسوند+ مایکروویو+ آنزیم بالاترین میزان (۰/۵۲۸) در جذب ۷۰۰ نانومتر) را از خود نشان داد، هیدرولیز پروتئین به دست آمده توسط اولتراسوند- آنزیم جذب ۰/۵۰۸ را از خود نشان داد، این در حالی است که هیدرولیز مایکروویو- آنزیم کم‌ترین میزان کاهندگی یون آهن را از خود نشان داد (۴۸) که با نتایج حاصل در این مطالعه هم‌راستا بود به‌صورتی‌که بیش‌ترین میزان کاهندگی مربوط به هیدرولیز اولتراسوند و بعد از آن مربوط به هیدرولیز مایکروویو بود و هیدرولیز آنزیمی بدون پیش‌تیمار کم‌ترین قدرت کاهندگی را از خود نشان داد ($P > 0/05$). در مطالعه دیگر، کتنا و همکاران

در سال ۲۰۱۷ قدرت کاهندگی یون آهن را در پیش‌تیمار مایکروویو در دمای بالا (۹۰ درجه سانتی‌گراد) و به دنبال آن هیدرولیز آنزیمی به روش متداول حمام آبی و پیش‌تیمار مایکروویو در دمای بالا (۹۰ درجه سانتی‌گراد) و هیدرولیز آنزیمی با کمک مایکروویو را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان مورد بررسی قرار دادند که قدرت کاهندگی بالاتری نسبت به هیدرولیزهای پیش‌تیمارنشده از خود نشان دادند (۲۶) که با نتایج حاصل از مطالعه حاضر هم‌سو بود. در این بررسی هیدرولیز با مایکروویو قدرت کاهندگی بالاتری نسبت به هیدرولیز آنزیمی بدون پیش‌تیمار از خود نشان داد ($P < 0/05$). این را می‌توان با تابش مایکروویو در دماهایی توضیح داد که ترکیب ساختار پروتئین را تغییر می‌دهد و به آنزیم اجازه می‌دهد تا به مکان‌های هدف بیش‌تری دسترسی پیدا کند و پپتیدهای فعال را آزاد کند (۲۶). مور و همکاران نشان دادند که اندازه و غلظت پروتئین به وضوح بر قدرت کاهندگی تأثیر می‌گذارد (۵۲). قدرت کاهندگی آهن بالاتر در غلظت‌های بیش‌تر را می‌توان به محتوای بالای پپتیدهای اهداکننده الکترون یا هیدروژن نسبت داد (۵۳). تفاوت بین قدرت‌های کاهندگی در هیدرولیزات به‌دست آمده با پیش‌تیمارهای مختلف ممکن است به وجود پپتیدهای خاص و توالی و ترکیب اسیدهای آمینه نسبت داده شود. پیش‌تیمارهای مختلف بسته به اثر تیمار منجر به تولید توالی‌های مختلف پپتید، ترکیبات و اندازه‌های مختلف می‌شوند، بنابراین فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی را متفاوت می‌کنند (۵۴).

جدول ۶- ارزیابی قدرت کاهش دگی یون آهن (III) (FRAP) در غلظت های مختلف (بر حسب میزان جذب) پروتئین هیدرولیز شده ریزجلبک کلرلا (*C. vulgaris*).

Table 6. Evaluation of the iron (III) ion reducing power (FRAP) at different concentrations (based on the absorption rate) of hydrolyzed protein of the microalgae *Chlorella (C. vulgaris)*.

پروتئین هیدرولیز شده با اولتراسوند Ultrasound Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده با مایکروویو Microwave Hydrolyzed Protein	پروتئین هیدرولیز شده Hydrolyzed Protein	غلظت (میلی گرم/میلی لیتر) Concentration (mg/ml)
0.152±0.01 ^{Af}	0.143±0.00 ^{Bf}	0.113±0.01 ^{Cg}	0.1
0.166±0.01 ^{Af}	0.146±0.00 ^{ABf}	0.126±0.01 ^{Bfg}	0.2
0.226±0.02 ^{Ae}	0.190±0.01 ^{Be}	0.146±0.00 ^{Cf}	0.3
0.266±0.01 ^{Ae}	0.213±0.00 ^{Be}	0.176±0.02 ^{Ce}	0.4
0.446±0.03 ^{Ad}	0.363±0.02 ^{Bd}	0.330±0.02 ^{Bd}	0.5
0.786±0.03 ^{Ac}	0.736±0.02 ^{Bc}	0.700±0.01 ^{Bc}	0.6
0.943±0.02 ^{Ab}	0.903±0.01 ^{Bb}	0.862±0.02 ^{Cb}	0.7
1.053±0.04 ^{Aa}	1.006±0.04 ^{Ba}	0.890±0.01 ^{Ba}	0.8

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف بزرگ متفاوت (A, B و C) در هر سطر نشان دهنده تفاوت معنی دار بین تیمارهای مختلف می باشند. حروف کوچک متفاوت (a, b, c, d, e, f, g و h) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی دار بین غلظت های مختلف می باشد (P<0.05).

Mean ± standard deviation of three replicates, different capital letters in row indicate significant differences among treatments, different small letters in column indicate significant differences among concentrations (P<0.05)

می شوند. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه می توان بیان کرد که با استفاده از روش های ترکیبی می توان خاصیت آنتی اکسیدانی را بهبود بخشید و استفاده از پیش تیمار اولتراسوند بیشترین اثر را بر افزایش درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی داشت.

سپاسگزاری

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۳-۱۴۰۲-۰۵ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می شود.

نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد که فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ریزجلبک کلرلا ولگاریس وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش می یابد. هم چنین به کارگیری روش های نوین پیش تیمار مانند اولتراسوند و مایکروویو باعث دستیابی به درجه هیدرولیز بالاتر نسبت به شرایط بدون پیش تیمار می شوند. بنابراین با توجه به هزینه بالای آنزیم، این روش ها می توانند منجر به مصرف مقدار کم تر آنزیم برای دستیابی به درجه هیدرولیز مطلوب گردند. هم چنین این روش های پیش تیمار باعث افزایش عملکرد آنتی اکسیدانی نیز

منابع

- 1.Khan, M. I., Shin, J. H., & Kim, J. (2018). The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable industry for biofuels, feed, and other products. *Microbial Cell Factories*, 17(36), 1-21.
- 2.Nova, P., Martins, A. P., Teixeira, C., Abreu, H., Silva, J. G., Silva, A. M., & Gomes, A. M. (2020). Foods with microalgae and seaweeds fostering consumers health: A review on scientific

- and market innovations. *Journal of Applied Phycology*, 32(4), 1789-1802.
3. Andler, S., & Goddard, J. (2018). Transforming food waste: how immobilized enzymes can valorize waste streams into revenue streams. *Npj Science of Food*, 2(19), 304-311.
 4. Soto-Sierra, L., Wilken, L. R., Mallawarachchi, S., & Nikolov, Z. L. (2021). Process development of enzymatically-generated algal protein hydrolysates for specialty food applications. *Algal Research*, 55(36), 1043-10451.
 5. Plaza, M., Cifuentes, A., & Ibáñez, E. (2008). In the search of new functional food ingredients from algae. *Trends in food science & Technology*, 19(1), 31-39.
 6. Lordan, S., Ross, R. P., & Stanton, C. (2011). Marine bioactives as functional food ingredients: potential to reduce the incidence of chronic diseases. *Marine Drugs*, 9(6), 1056-1100.
 7. Ibáñez, E., & Cifuentes, A. (2013). Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 703-709.
 8. Dai, L., Bergfreund, J., Reichert, C. L., Fischer, P., & Weiss, J. (2019). Shear rheological properties of acid hydrolyzed insoluble proteins from *Chlorella protothecoides* at the oil-water interface. *Journal of Colloid and Interface Science*, 551(6), 297-304.
 9. Buono, S., Langellotti, A. L., Martello, A., Rinna, F., & Fogliano, V. (2014). Functional ingredients from microalgae. *Food & Function*, 5(8), 1669-1685.
 10. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35(4), 265-278.
 11. Garcia-Vaquero, M., O'Doherty, J. V., Tiwari, B. K., Sweeney, T., & Rajauria, G. (2019). Enhancing the extraction of polysaccharides and antioxidants from macroalgae using sequential hydrothermal-assisted extraction followed by ultrasound and thermal technologies. *Marine Drugs*, 17(8), 457-467.
 12. Kadam, S. U., Álvarez, C., Tiwari, B. K., & O'Donnell, C. P. (2017). Extraction and characterization of protein from Irish brown seaweed *Ascophyllum nodosum*. *Food Research International*, 99(3), 1021-1027.
 13. Ursu, A. V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157(6), 134-139.
 14. Barba, F. J., Grimi, N., & Vorobiev, E. (2015). New approaches for the use of non-conventional cell disruption technologies to extract potential food additives and nutraceuticals from microalgae. *Food Engineering Reviews*, 7(1), 45-62.
 15. Vernes, L., Abert-Vian, M., El Maâtaoui, M., Tao, Y., Bornard, I., & Chemat, F. (2019). Application of ultrasound for green extraction of proteins from spirulina. Mechanism, optimization, modeling, and industrial prospects. *Ultrasonics Sonochemistry*, 54(4), 48-60.
 16. Pagano, I., Campone, L., Celano, R., Piccinelli, A. L., & Rastrelli, L. (2021). Green non-conventional techniques for the extraction of polyphenols from agricultural food by-products: A review. *Journal of Chromatography A*, 165(9), 462-473.
 17. Hildebrand, G., Poojary, M. M., O'Donnell, C., Lund, M. N., Garcia-Vaquero, M., & Tiwari, B. K. (2020). Ultrasound-assisted processing of *Chlorella vulgaris* for enhanced protein extraction. *Journal of Applied Phycology*, 32(8), 1709-1718.
 18. Letellier, M., & Budzinski, H. (1999). Microwave assisted extraction of organic compounds. *Analisis*, 27(3), 259-270.
 19. Dahmoune, F., Nayak, B., Moussi, K., Remini, H., & Madani, K. (2015). Optimization of microwave-assisted extraction of polyphenols from *Myrtus*

- communis* L. leaves. *Food Chemistry*, 166(3), 585-595.
20. Chew, K. W., Chia, S. R., Lee, S. Y., Zhu, L., & Show, P. L. (2019). Enhanced microalgal protein extraction and purification using sustainable microwave-assisted multiphase partitioning technique. *Chemical Engineering Journal*, 367(3), 1-8.
 21. Bleakley, S., & Hayes, M. (2021). Functional and bioactive properties of protein extracts generated from *Spirulina platensis* and *Isochrysis galbana* T-Iso. *Applied Sciences*, 11(9), 3964-3975.
 22. Wang, T., Jónsdóttir, R., & Ólafsdóttir, G. (2010). Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. *Food Chemistry*, 116(1), 240-248.
 23. Heo, S. J., Lee, K. W., Song, C. B., & Jeon, Y. J. (2003). Antioxidant activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae*, 18(1), 71-81.
 24. Kose, A., & Oncel, S. (2015). Properties of microalgal enzymatic protein hydrolysates: Biochemical composition, protein distribution and FTIR characteristics. *Biotechnology Reports*, 6(2), 137-143.
 25. Heo, S. J., Park, E. J., Lee, K. W., & Jeon, Y. J. (2005). Antioxidant activities of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Bioresource Technology*, 96(14), 1613-1623.
 26. Ketnawa, S. & Liceaga, A. (2017). Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), 582-591.
 27. Kangsanant, S., Murkovic, M., & Thongraung, C. (2014). Antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate: effect of ultrasonic pretreatment and ultrasonic assisted enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(8), 1932-1938.
 28. AOAC, (2000). Official Methods of Analysis, Washington, DC. USA, Association of Analytical Chemists.
 29. Hoyle, N., & Merritt, J. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1), 129-139.
 30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265-275.
 31. Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
 32. Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.
 33. Chew, Y. L., Lim, Y. Y., Omar, M., & Khoo, K. S. (2008). Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. *LWT - Food Science and Technology*, 41(6), 1067-1072.
 34. Umego, E. C., He, R., Ren, W., Xu, H., & Ma, H. (2021). Ultrasonic-assisted enzymolysis: Principle and applications. *Process Biochemistry*, 100(2), 59-68.
 35. Margenat, A., Fabregat, C., & Jorba, M. (2023). Microwave-assisted extraction combined with enzymatic pre-treatment for *Chlorella vulgaris* protein solubilization. Research Square, 1-11.
 36. Pekkoh, J., Ruangrit, K., Pumas, C., Duangjan, K., Chaipoot, S., Phongphisutthinant, R., & Srinuanpan, S. (2023). Transforming microalgal *Chlorella* biomass into cosmetically and nutraceutically protein hydrolysates using high-efficiency enzymatic hydrolysis approach. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 13(7), 6299-6315.
 37. Morris, H. J., Almarales, A., Carrillo, O., & Bermúdez, R. C. (2008). Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic

- protein hydrolysates. *Bioresource Technology*, 99(16), 7723-7729.
38. Bahari, A. N., Saari, N., Salim, N., & Ashari, S. E. (2020). Response factorial design analysis on papain-generated hydrolysates from *Actinopyga lecanora* for determination of antioxidant and antityrosinase activities. *Molecules*, 25(11), 2663.
39. Schlegel, K., Sontheimer, K., Hickisch, A., Wani, A. A., Eisner, P., & Schweiggert-Weisz, U. (2019). Enzymatic hydrolysis of lupin protein isolates-Changes in the molecular weight distribution, technofunctional characteristics and sensory attributes. *Food Science & Nutrition*, 7(8), 2747-2759.
40. Uluko, H., Li, H., Cui, W., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., & Lv, J. (2013). Response surface optimization of angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates in vitro after ultrasound pretreatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 20(3), 133-139.
41. Resendiz-Vazquez, J. A., Ulloa, J. A., Urías-Silvas, J. E., Bautista-Rosales, P. U., Ramírez-Ramírez, J. C., Rosas-Ulloa, P., & González-Torres, L. J. (2017). Effect of high-intensity ultrasound on the technofunctional properties and structure of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*) seed protein isolate. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37(7), 436-444.
42. Rejasse, B., Lamare, S., Legoy, M. D., & Besson, T. (2007). Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(5), 519-527.
43. Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18(9), 1138-1146.
44. Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry*, 67(4), 46-54.
45. He, R., Girgih, A. T., Malomo, S. A., Ju, X., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 219-227.
46. 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*, 31(4), 288-296.
47. 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*, 123(1), 4373-4384.
48. Noman, A., Qixing, J., Xu, Y., Abed, S. M., Obadi, M., Ali, A. H., & Xia, W. (2020). Effects of ultrasonic, microwave, and combined ultrasonic-microwave pretreatments on the enzymatic hydrolysis process and protein hydrolysate properties obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), 13292.
49. Wu, H. C., Chen, H. M., & Shiau, C. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food research international*, 36(10), 949-957.
50. Samaranayaka, A., & Li-Chan, E. (2008). Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). *Food Chemistry*,

- 107(2), 768-776.
51. Pires, C., Clemente, T., & Batista, I. (2013). Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(4), 771-780.
52. Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: A review. *Food Research International*, 39(9), 945-963.
53. 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.
54. Chalamaiyah, M., Jyothirmayi, T., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Hemalatha, R., & Kumar, B. D. (2013). Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Research International*, 52(1), 221-229.

