JRIFST
مقالهٔ کامل پژوهشی

www.journals.rifst.ac.ir
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1397، جلد 7، شماره 3، صفحات 280-269
Doi: 10.22101/JRIFST.2018.10.20.733

اثر آنزیم، زمان و دما بر برخی ویژگی‌های پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا کپور علف‌خوار

آتنا رفعتی نیا[1]، لاله رومیانی[2*]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
2- استادیار، گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران
* نویسندهٔ مسئول (l.roomiani@yahoo.com)

تاریخ دریافت: 1396/09/19
تاریخ پذیرش: 1397/02/28

واژه‌های کلیدی
آنزیم
امعاواحشا
پروتئین هیدرولیزشده
کپور علف‌خوار

چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر آنزیم، زمان و دما بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا کپور علف‌خوار (*Ctenopharyngodon idella*) بود. دو شاخص راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های حاصله و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه زمان 15، 30 و 60 دقیقه و سه دمای 35، 45 و 55 درجهٔ سانتی‌گراد و بین سه آنزیم آلکالاز، فلاورزایم و پپسین مورد مقایسه قرار گرفت. برای تمام آنزیم‌های مورد استفاده با افزایش زمان و دمای هیدرولیز میزان بازیافت پروتئینی، درجهٔ هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت و بیشترین مقدار این دو شاخص برای هر سه آنزیم در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه و کمترین آنها نیز در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه مشاهده گردید. در بین 3 آنزیم مورد بررسی، آلکالاز در شرایط دمایی یکسان و در زمان‌های مختلف نسبت به آنزیم‌های پپسین و فلاورزایم دارای بازیافت پروتئینی و درجهٔ هیدرولیز و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود. آنزیم آلکالاز بیشترین بازیافت پروتئینی، درجهٔ هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه (0/11±54/52 درصد) و کمترین مقدار این پارامترها را نیز در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه نشان داد. باتوجه‌به راندمان بازیافت، درجهٔ هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم آلکالاز کارایی بالایی جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات ماهی کپور علف‌خوار داشت.

مقدمه

صنعت غذا یکی از بزرگ‌ترین تجارت‌های جهان است. گام‌های رشد این صنعت آن‌قدر زیاد است که باتوجه‌به جمعیت روبه‌رشد جهان بسیار سریع‌تر نیز شده است. مصرف مواد غذایی توسط مردم جهان نه تنها از لحاظ امنیت، بلکه باید از لحاظ کیفیت و سلامت نیز مناسب باشد (Gan *et al*., 2010). براساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانهٔ آبزیان، بالغ بر 132 میلیون تن می‌باشد (Ovissipour *et al*., 2009). این میزان نسبتاً بالای صید جهانی و به‌دنبال آن صنایع عمل‌آوری، منجربه‌تولید حجم بالایی از مواد جانبی و غیرقابل استفاده گردیده که اکثراً بدون توجه به محیط‌زیست دورریخته می‌شوند (Bhaskar *et al*., 2008). ازآنجاکه تولیدکنندگان فراورده‌های دریایی به‌دلایل زیست‌محیطی قادر به دورریختن ضایعات خود به‌صورت مستقیم به دریا نمی‌باشند و برای

پالایش این مواد باید هزینهٔ زیادی را متحمل شوند، بنابراین یافتن یک روش مناسب به‌عنوان جایگزینی برای دورریختن این مواد امری ضروری است (Kristinsson & Rasco, 2000a).

ترکیب شیمیایی بدن ماهی از گونه‌ای به گونهٔ دیگر متفاوت است. اختلاف اصلی در ترکیب شیمیایی ماهی را باید درارتباط‌با غذای دریافتی یا تغذیهٔ ماهی دانست که شامل آب، پروتئین، لیپید، کربوهیدرات، ویتامین و مواد معدنی است (Boziaris, 2014). در دههٔ 1960 تحقیق‌های زیادی برای دست‌یابی به منابع پروتئینی ارزان‌قیمت مغذی جهت تغذیهٔ جمعیت انسانی درحال‌رشد و نیز حیوانات صورت گرفت و دراین‌راستا توجه زیادی به ضایعات معطوف شد (Bhaskar *et al.*, 2008). ازطرفی، شیوع جنون گاوی در سال‌های اخیر، محققین را بر آن داشته است که پروتئین‌های دریایی هیدرولیزشده را جایگزین پروتئین‌های حیوانی کرده و به مردم معرفی نمایند (Liaset *et al.*, 2003). عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل‌آوری آبزیان شامل امعاواحشا، پوست، فلس، ستون مهره و استخوان‌های تنه می‌باشد. امعاواحشا ماهیان یکی از مهم‌ترین ضایعات آنها و سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع و پروتئین می‌باشد (Bhaskar & Mahendrakar, 2008). پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ ماهیان، دارای کاربردهای وسیعی هستند، ازجمله مواد مناسب برای درمان سرطان محسوب می‌شوند. ازطرف‌دیگر به‌دلیل کوتاه‌بودن زنجیرهٔ پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالاست و می‌توانند به‌عنوان مکمل پروتئینی در تغذیهٔ انسان، دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند (Mahmoud, 1994). هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی به‌دست‌آوردن حداکثر بازیافت اجزاء قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا (درجهٔ هیدرولیز و میزان پروتئین بالا) در آنهاست. آنزیم‌های مورد استفاده به‌منظور هیدرولیز آنزیمی، شامل آنزیم‌های گیاهی، جانوری و میکروبی می‌باشند. آنزیم‌های میکروبی در مقایسه با آنزیم‌های گیاهی و جانوری، دارای مزایای بیشتری هستند (Diniz & Martin, 1997). از مهم‌ترین فاکتورهای مورد بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیزشده، درجهٔ هیدرولیزاسیون می‌باشد که میزان شکسته‌شدن باندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیزشده، ازجمله میزان اسیدهای آزاد، میزان انحلال‌پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولیدشده، وابسته به شدت و درجهٔ هیدرولیزاسیون می‌باشد (Slizyte *et al.*, 2005).

باتوجه‌به افزایش روزافزون جمعیت جهان، تأمین منابع پروتئینی بسیار حائز اهمیت می‌باشد، ازاین‌رو مطالعه‌های بسیاری روی روش‌های تولید پروتئین انجام‌شده و یا درحال‌انجام است که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌های مهرگان‌نیکو و همکاران (1392) روی پروتئین هیدرولیزشدهٔ ماهی کاراس[1] و اثر متغیرهای دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان درجهٔ هیدرولیز و فعالیت ضداکسایشی اشاره کرد که ثابت شد پروتئین هیدرولیزشدهٔ ماهی کاراس می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی داشته باشد. شعبانپور و همکاران (1396) روی اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه‌حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از میگو کار کردند و به این نتیجه رسیدند که بیشترین خصوصیت آنتی‌اکسیدانی در دمای 54/6 درجهٔ سانتی‌گراد و با درجهٔ هیدرولیز 33/5 درصد به‌دست آمد. همچنین مطالعه‌های اویسی‌پور و همکاران (1389) روی بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین از امعاواحشا ماهی‌تُن زردباله[2] نشان داد که پروتئین هیدرولیزشده توسط آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین و درجهٔ هیدرولیزاسیون بالاتر از آنزیم‌های پروتامکس[3] و فلاورزایم[4] بود. بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیزشده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از امعاواحشا ماهی‌تُن زردباله با آنزیم پروتامکس توسط پزشک و همکاران (1396) موردمطالعه قرار گرفت و ثابت شد آنچه بر پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر دارد ویژگی‌های ذاتی پروتئین هیدرولیزشده است. Bhaskar و

[1] *Carassius carassius*
[2] *Thunnus albacares*
[3] Protomax
[4] Flavourzyme

Mahendrakar (2008) بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز توسط یک پروتئاز تجاری خنثی از امعاواحشا ماهی کپور هندی[1] اشاره کرد. بنابراین باتوجه‌به پتانسیل بالای تولید پروتئین هیدرولیزشدهٔ آبزیان در کشور، رسیدن به این مهم ضروری می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر آنزیم، زمان و دما بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا ماهی کپور علف‌خوار[2] بود. ماهی فوق یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در ایران محسوب می‌شود که 25 تا 35 درصد تولید ماهیان گرمابی را به خود اختصاص می‌دهد. سازمان خواروبار جهانی گزارش کرد که از کل 167/2 میلیون تن تولید آبزی‌پروری، 20/9 میلیون تن مربوط به ضایعات آبزی‌پروری بوده است (FAO, 2018) که باتوجه‌به حجم عظیم این ضایعات می‌توان در صنعت غذا از آن بهره جست.

مواد و روش‌ها

ماهی کپور علف‌خوار با میانگین وزنی 2 کیلوگرم در آبان ماه از بازار ماهی‌فروشان اهواز تهیه و با ظروف یونولیتی در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. امعاواحشا ماهی جداشده شامل بخش‌های موجود در داخل شکم ماهی و با استفاده از یک میکسر صنعتی کاملاً چرخ و مقداری از نمونه‌های چرخ‌شده به‌منظور تعیین ترکیب شیمیایی (جهت تعیین میزان پروتئین اولیه) برداشته شد و مابقی در بسته‌های پلاستیکی به‌صورت 50 گرمی که با ترازوی دیجیتال توزین‌شده بسته‌بندی گردید و در دمای 20- درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند.

هیدرولیز آنزیمی

به‌منظور هیدرولیز آنزیمی امعاواحشا ماهی کپور علف‌خوار از آنزیم‌های آلکالاز[3]، پپسین[4] و فلاورزایم[5] (شرکت نووزایم، دانمارک) استفاده شد. تمام آنزیم‌ها تا زمان آزمایش در دمای 4 درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از روش AOAC (2002) انجام شد. 50 گرم از نمونه درون ارلن‌مایر 250 میلی‌لیتری ریخته و سپس 100 میلی‌لیتر آب‌مقطر به نسبت 2:1 به آن اضافه گردید و با همزن دیجیتالی (مدل 700، ساخت ایران) به‌مدت 2 دقیقه هموژنیزه و سپس 20 دقیقه در بن‌ماری با حرارت 85 درجهٔ سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد.

تولید پروتئین هیدرولیزشده

تولید پروتئین هیدرولیزشده به روش Ovissipour و همکاران (2012) انجام شد. پس از خروج نمونه از یخچال و انجمادزدایی، 50 گرم از نمونه‌ها درون ارلن‌مایر 250 میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان 100 میلی‌لیتر آب‌مقطر به نسبت 2:1 به ارلن‌مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت 2 دقیقه هموژنیزه شد. سپس به مدت 20 دقیقه در بن‌ماری با درجه‌حرارت 85 درجهٔ سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. امعاواحشا پخته‌شده با یک بافر سدیم فسفات، کاملاً مخلوط و pH با اضافه‌کردن هیدروکسید سدیم (NaOH) 0/2 نرمال و توسط دستگاه pHمتر (مدل Metrohm 691، ساخت سوئیس) در محدودهٔ 7 تا 8/5 کنترل شد. نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور متحرک در دماهای 35، 45 و 55 درجهٔ سانتی‌گراد برای آزمایش مقایسهٔ بین آنزیم‌ها در دماهای ارائه‌شده، برای تولید پروتئین هیدرولیزشده با دور ثابت 2000 دور در دقیقه قرار داده شد و پس از 10 دقیقه که دمای نمونه‌ها به دمای موردنظر رسید آنزیم‌ها (1 درصد میزان پروتئین) با میکروسمپلر و ترازوی دیجیتالی اضافه شدند و پس از هر نمونه‌گیری (زمان 15 و 30 دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان 60 دقیقه) به‌منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت 15 دقیقه در دمای 95 درجهٔ سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیزشده طبق روش Krisstinson و Rasco (2000b) با استفاده از یخ، سرد شد و با استفاده از سانتریفیوژ با دور 8000 xg در 10 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت نمونه‌ها با استفاده از سرنگ جمع‌آوری شد و پروتئین هیدرولیزشده در فریزر نگهداری و سپس با

[1] *Catla catla*
[2] *Ctenopharyngodon idella*
[3] Alkalase
[4] Pepsin
[5] Flavourzyme

استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Chris، مدل 101521،ساخت تایوان) در دمای 60- تا 70- درجهٔ سانتی‌گراد قرارداده تا به‌صورت پودر درآیند.

اندازه‌گیری درجهٔ هیدرولیز

برای محاسبهٔ این شاخص، بعد از پایان فرایند هیدرولیز (حداکثر 1/5 ساعت)، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید 20 درصد با نسبت برابر به مایع رویی افزوده و محلول حاصل با دور 6700 گرم در دمای 4 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. در واقع طی این عمل پروتئین‌های شکسته‌شده از پروتئین‌های سالم جدا شدند. نیتروژن موجود در مایع رویی جدید (محلول 10 درصد تری‌کلرواستیک‌اسید که حاوی پپتیدهای هیدرولیزشده است) به‌روش بیورت سنجیده و درجهٔ هیدرولیز طبق رابطهٔ (1) مورد محاسبه قرار گرفت (Hoyle & Memitt, 1994).

رابطهٔ (1)

درجهٔ هیدرولیزاسون
نیتروژن در محلول 10 درصد اسیدتری کلرواستیک) =
100 × (میزان نیتروژن در نمونه /

در رابطهٔ (1)، درجهٔ هیدرولیزاسیون برای تعیین میزان باندهای شکسته‌شده استفاده می‌شود. برای رسم منحنی استاندارد و به‌دست‌آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل DR 6000، ساخت آمریکا) از سرم آلبومین گاوی به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

به 0/002گرم محلول مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH)[1] ، 50 سی‌سی محلول متانول 70 درصد اضافه و سپس 50 میکرولیتر از نمونه جدا و به آن 5 سی‌سی محلول DPPH اضافه شد. بعد از ماندن در دمای اتاق به مدت 20 دقیقه جذب نمونه در 517 نانومتر توسط اسپکتوفوتومتر اندازه‌گیری و طبق رابطهٔ (2) فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد محاسبه قرار گرفت.

رابطهٔ (2)

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

برای به‌دست‌آوردن استاندارد 10 میلی‌گرم اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید (EDTA)[2] به 10 سی‌سی متانول اضافه شد (Shimada *et al.*, 1992).

اندازه‌گیری راندمان بازیافت نیتروژنی

میزان بازیافت نیتروژن طبق رابطهٔ (3) مورد محاسبه قرار گرفت (James, 1995).

رابطهٔ (3)

راندمان بازیافت نیتروژنی=A/B

در رابطهٔ (3)، A: میزان نیتروژن در پروتئین هیدرولیزشده و B: میزان نیتروژن در نمونه می‌باشد.

تجزیه‌وتحلیل آماری

تجزیه‌وتحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده با 3 تکرار ازطریق نرم‌افزار SPSS نسخهٔ 17 انجام پذیرفت. جهت بررسی وجود یا عدم‌وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر حاصل از هر شاخص از آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) و مقایسهٔ میانگین صفت‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان 5 درصد انجام گردید. جدول‌ها و نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel نسخهٔ 2007 رسم شدند.

نتایج و بحث

بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط آنزیم‌های تجاری در دما و زمان مختلف

مطابق جدول (1)، در دماهای هیدرولیز 35، 45 و 55 درجهٔ سانتی‌گراد، بازیافت پروتئین در زمان‌های هیدرولیز با اختلاف معنی‌دار مقادیر متفاوتی را نشان دادند ($P<0/05$). بیشترین درجهٔ بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار برای هر سه آنزیم در درجه‌حرارت 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه و کمترین در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه حاصل گردید (جدول 1، 2 و 3).

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

[2] Ethylenediaminetetraacetic Acid

راندمان بازیافت پروتئینی نشان‌دهندهٔ توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های یک ماده می‌باشد، که به خصوصیات مادهٔ موردنظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیم بستگی دارد. بازیافت پروتئینی در هر سه آنزیم مورد بررسی در این مطالعه با افزایش زمان و دمای هیدرولیز افزایش یافت، به‌طوری‌که مطابق نتایج به‌دست‌آمده در جدول‌های (1)، (2) و (3) در شرایط یکسان دمایی و در زمان‌های مختلف بیشترین میزان بازیافت پروتئین برای آنزیم آلکالاز در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه معادل 54/52±0/11 درصد و کمترین آن مربوط به آنزیم فلاورزایم در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 15 دقیقه معادل 37/50±0/12 درصد به‌دست آمد. مقایسهٔ آنزیم‌های به‌کاررفته در واکنش هیدرولیزاسیون جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده از لحاظ راندمان بازیافت پروتئین، نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار ($P<0/05$) بین آنزیم‌های شاخص است. شکرپور رودباری و همکاران (1389) در بررسی نتایج حاصل از بررسی شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازهٔ مولکولی پروتئینی گوشت کوسهٔ چانه‌سفید[1] نشان دادند که افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش راندمان بازیافت نیتروژنی و کاهش طول زنجیرهٔ پپتیدی گردید ($P<0/05$). اویسی‌پور و همکاران (1389) در بررسی نتایج حاصل از بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا ماهی‌تُن زردباله با استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم) نشان دادند که پروتئین هیدرولیزشده توسط آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین و بازیافت نیتروژنی بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیزشده بود ($P<0/05$). نتایج همچنین نشان دادند که آنزیم آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر دارای بازیافت پروتئینی بیشتری است. حسینی و همکاران (1391) در بررسی نتایج حاصل از مقایسهٔ پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا و سر ماهی فیتوفاگ[2] با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بعد از زمان‌های 2 و 4 ساعت نشان دادند که محصول تولیدشده توسط آلکالاز (تیمار 1) بعد از 4 ساعت به‌طور معنی‌داری از لحاظ پروتئین بالاتر از تیمار 2 (آنزیم‌های داخلی) بود. باتوجه‌به نتایج می‌توان آنزیم آلکالاز را نسبت به آنزیم‌های داخلی برتر دانست.

جدول 1 - نتایج بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه) 15	30	60
35	آلکالاز	$25/28\pm0/09^{cA}$	$32/52\pm0/24^{bA}$	$42/61\pm0/43^{aA}$
	پپسین	$24/60\pm0/19^{cB}$	$31/39\pm0/15^{bB}$	$40/29\pm0/33^{aB}$
	فلاورزایم	$22/38\pm0/07^{cC}$	$30/56\pm0/09^{bC}$	$37/50\pm0/12^{aC}$

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.
حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

جدول 2 - نتایج بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 45 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه) 15	30	60
45	آلکالاز	$30/25\pm0/09^{cA}$	$34/15\pm0/14^{bA}$	$48/82\pm0/13^{aA}$
	پپسین	$28/52\pm0/03^{cB}$	$33/23\pm0/04^{bB}$	$47/10\pm0/12^{aB}$
	فلاورزایم	$27/52\pm0/14^{cC}$	$33/43\pm0/15^{bC}$	$45/58\pm0/10^{aC}$

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.
حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

[1] *Carcharhinus dussumieri*

[2] Hypophthalmichthys molitrix

جدول 3 - نتایج بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 55 درجهٔ‌سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
55	آلکالاز	33/64±0/06^{cA}	42/07±0/15^{bA}	54/52±0/11^{aA}
	پپسین	31/41±0/12^{cB}	41/08±0/13^{bB}	50/28±0/03^{aB}
	فلاورزایم	29/27±0/11^{cC}	40/13±0/15^{bC}	48/81±0/13^{aC}

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

یاسمی و همکاران (1392) در بررسی نتایج حاصل از مقایسهٔ راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاواحشا ماهی کپور سرگنده[1] با استفاده از آنزیم (آلکالاز، پاپائین و پروتامکس)، نشان دادند که با افزایش زمان و دمای هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی افزایش یافت. بیشترین میزان بازیافت پروتئین برای هر سه آنزیم در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه و کمترین آن در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه مشاهده شد. همچنین نتایج نشان دادند که در بین سه آنزیم مورد بررسی آلکالاز در شرایط دمایی یکسان و در زمان‌های مختلف نسبت به آنزیم‌های پاپائین و پروتامکس دارای بازیافت پروتئینی بیشتری است. Ovissipour و همکاران (2012) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین از امعاواحشا ماهی‌تُن زردباله نشان دادند که پروتئین هیدرولیزشده از امعاواحشا، نسبتاً دارای سطح پروتئین بالا و سطح چربی پایین است. به‌علاوه نسبت بازده پروتئین هیدرولیزشده از امعاواحشا در محدودهٔ 2/85-5/35 بود.

همان‌طورکه نتیجهٔ تحقیق حاضر و سایر مطالعه‌ها نشان می‌دهد، نتایج نشان‌دهنده تأثیرگذاری بیشتر آنزیم آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر در فرایند هیدرولیز می‌باشد که علت آن را می‌توان، بالابودن فعالیت پروتئولیتیکی[2] آنزیم آلکالاز در فرایند هیدرولیز نسبت به سایر آنزیم‌ها دانست (Ovissipour *et al.*, 2009; 2012).

درجهٔ هیدرولیزاسیون امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دما و زمان مختلف

مطابق جدول (4)، (5) و (6)، در دماهای هیدرولیز 35، 45 و 55 درجهٔ سانتی‌گراد، نتایج هیدرولیز در زمان‌های هیدرولیز با اختلاف معنی‌دار، مقادیر متفاوتی را نشان دادند. همان‌طورکه جدول (4) نشان می‌دهد، بیشترین درجهٔ هیدرولیزاسیون امعاواحشا کپور علف‌خوار برای هر سه آنزیم در درجه‌حرارت 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه و کمترین در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه حاصل گردید.

جدول 4 - نتایج هیدرولیز امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
35	آلکالاز	10/32±0/04^{cA}	15/41±0/13^{bA}	18/38±0/16^{aA}
	پپسین	9/30±0/08^{cB}	13/33±0/07^{bB}	16/44±0/07^{aB}
	فلاورزایم	6/59±0/20^{cC}	11/76±0/10^{bC}	15/42±0/13^{aC}

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

[1] *Aristichthys nobilis*

[2] Proteolytic

جدول 5 - نتایج هیدرولیز امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 45 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
45	آلکالاز	15/34±0/06^{cA}	20/45±0/12^{bA}	22/27±0/08^{aA}
	پپسین	14/55±0/10^{cB}	17/40±/15^{bB}	20/38±0/07^{aB}
	فلاورزایم	14/76±0/07^{cC}	16/88±0/07^{bC}	22/27±0/08^{aC}

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

جدول 6- نتایج هیدرولیز امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
55	آلکالاز	18/82±0/14^{cA}	23/33±0/12^{bA}	25/49±0/11^{aA}
	پپسین	17/50±0/17^{cB}	19/43±0/15^{bB}	23/36±0/12^{aB}
	فلاورزایم	16/32±0/11^{cC}	20/76±0/17^{bC}	22/29±0/16^{aC}

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

نتایج مربوط به درجهٔ هیدرولیزاسیون آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در این مطالعه، باتوجه‌به جدول (2) نشان می‌دهد که با افزایش زمان فرایند هیدرولیزاسیون، درجهٔ هیدرولیزاسیون که به معنی میزان شکسته‌شدن باندهای پپتیدی است (Mahmoud, 1994)، در تمامی آنزیم‌ها افزایش پیدا می‌کند، این در حالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز که همان شدت جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیرمحلول است (Liaset *et al.*, 2002)، کاسته می‌شود. درجهٔ هیدرولیزاسیون در هر سه آنزیم مورد بررسی در این مطالعه با افزایش زمان و دمای هیدرولیز افزایش یافت به‌طوری‌که کمترین درجهٔ هیدرولیزاسیون برای هر سه آنزیم در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه مربوط به آنزیم فلاورزایم و بیشترین آن، توسط آنزیم آلکالاز در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه ثبت گردید. شکرپور رودباری و همکاران (1389) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق اثر شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازهٔ مولکولی پروتئینی گوشت کوسهٔ چانه‌سفید نشان دادند که افزایش زمان هیدرولیز، موجب افزایش درجهٔ هیدرولیز گردید (P<0/05). اویسی‌پور و همکاران (1389) در بررسی نتایج حاصل از خواص پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا ماهی تُن زردباله با استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم) نشان دادند که پروتئین هیدرولیزشده توسط آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ درجهٔ هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیزشده بود (P<0/05).

حسینی و همکاران (1391) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق مقایسهٔ پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا و سر ماهی فیتوفاگ با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بعد از زمان‌های 2 و 4 ساعت نشان دادند که محصول تولیدشده توسط آلکالاز (تیمار 1) بعد از 4 ساعت به‌طور معنی‌داری از لحاظ درجهٔ هیدرولیزاسیون بالاتر از تیمار 2 (آنزیم‌های داخلی) بود. نتایج نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجهٔ هیدرولیزاسیون افزایش پیدا کرد. یاسمی و همکاران (1392) در بررسی نتایج راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاواحشا ماهی کپور سرگنده با استفاده از آنزیم (آلکالاز، پاپائین و پروتامکس) نشان دادند که با افزایش زمان و دمای هیدرولیز، درجهٔ هیدرولیزاسیون افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که در بین 3 آنزیم مورد بررسی آلکالاز در شرایط دمایی یکسان و در زمان‌های مختلف نسبت به آنزیم‌های پاپائین و

پروتامکس دارای درجهٔ هیدرولیزاسیون بیشتری است. بالاترین درجهٔ هیدرولیزاسیون مربوط به آنزیم آلکالاز در 55 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه بود. Kristinsson و Rasco (2000b) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق روی ویژگی‌های بیوشیمیایی و کاربردی پروتئین هیدرولیزشدهٔ عضلهٔ ماهی آزاد آتلانتیک[1] توسط پروتئازهای قلیایی مختلف نشان دادند که افزایش زمان واکنش هیدرولیز و دمای هیدرولیز به‌صورت هم‌زمان، باعث افزایش درجهٔ هیدرولیزاسیون می‌شود. باتوجه‌به نتایج تحقیق حاضر و سایر مطالعه‌ها علت این امر را می‌توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، تعداد باندهای پپتید در دسترس آنزیم کاهش پیدا می‌کند. همچنین از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاسته می‌شود که در مجموع موجب می‌شود که شدت هیدرولیز (منظور از درجهٔ هیدرولیزاسیون میزان شکسته‌شدن باندهای پپتیدی است و مفهوم شدت هیدرولیزاسیون به خواص حساسیت‌زای پروتئین‌ها مربوط می‌شود) کاهش یابد. ازطرف‌دیگر شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت‌کنندهٔ فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد (Kristinsson & Rasco, 2000b).

تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشدهٔ امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط آنزیم‌های تجاری در دما و زمان مختلف

مطابق جدول (7)، (8) و (9)، در دماهای هیدرولیز 35، 45 و 55 درجهٔ سانتی‌گراد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی در زمان‌های هیدرولیز با اختلاف معنی‌دار مقادیر متفاوتی را نشان دادند. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی امعاواحشا کپور علف‌خوار برای هر سه آنزیم (آلکالاز، پپسین و فلاورزایم) در درجه‌حرارت 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه و کمترین در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه حاصل گردید.

جدول 7 - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 35 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
35	آلکالاز	$27/32\pm0/03^{cA}$	$28/64\pm0/08^{bA}$	$30/25\pm0/04^{aA}$
	پپسین	$26/21\pm0/04^{cB}$	$27/73\pm0/08^{bB}$	$29/2\pm0/05^{aB}$
	فلاورزایم	$26/26\pm0/08^{cC}$	$27/26\pm0/07^{bC}$	$28/74\pm0/06^{aC}$

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.
حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

جدول 8 - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 45 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
45	آلکالاز	$28/36\pm0/07^{cA}$	$29/76\pm0/08^{bA}$	$32/74\pm0/09^{aA}$
	پپسین	$27/46\pm0/07^{cB}$	$29/25\pm0/06^{bB}$	$31/42\pm0/08^{aB}$
	فلاورزایم	$27/26\pm0/07^{cC}$	$28/84\pm0/07^{bC}$	$31/28\pm0/07^{aC}$

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.
حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

[1] *Salmo salar*

جدول 9 - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد

دمای هیدرولیز (درجهٔ سانتی‌گراد)	نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
		15	30	60
55	آلکالاز	28/66±0/06^{cA}	31/47±0/07^{bA}	33/66±0/05^{aA}
	پپسین	28/22±0/07^{cB}	30/31±0/06^{bB}	32/76±0/06^{aB}
	فلاورزایم	27/53±0/06^{cC}	30/37±0/06^{bC}	31/88±0/05^{aC}

حروف کوچک (a، b، c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.
حروف بزرگ (A، B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح 0/05 است.

به‌طورکلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده، بستگی به آنزیم به‌کاررفته، مادهٔ اولیه و شرایط به‌کارگرفته‌شده در آزمایش دارد (Jun *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2010). رادیکال هیدروکسیل[1]، یک اکسیدان اختصاصی برای لیپیدهاست و قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل توسط یک آنتی‌اکسیدان به‌طور مستقیم با پیشگیری از گسترش فرایند اکسیداسیون لیپیدها مرتبط است (Batista *et al.*, 2010). نتایج مربوط به قدرت دفع رادیکال‌های آزاد DPPH، با استفاده از آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در این مطالعه باتوجه‌به جدول (3) نشان می‌دهد که با افزایش زمان فرایند هیدرولیزاسیون، خواص آنتی‌اکسیدانی در تمامی آنزیم‌ها افزایش پیدا می‌کند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی در هر سه آنزیم مورد بررسی در این مطالعه با افزایش زمان و دمای هیدرولیز افزایش یافت. به‌طوری‌که کمترین فعالیت آن برای هر سه آنزیم در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه مربوط به آنزیم پپسین و بیشترین آن توسط آنزیم آلکالاز در دمای 55 درجهٔ سانتی‌گراد و زمان 60 دقیقه ثبت گردید.

شعبانپور و همکاران (1396) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق، اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه‌حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از میگو که منجربه‌تولید پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگوی ببری‌سبز[2] توسط آنزیم فلاورزایم گردید، نشان دادند که فراورده‌های تولیدی، پاسخ بهتری به دفع رادیکال DPPH در مقایسه با قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل و قدرت احیای آهن دارند. همچنین نشان دادند که کاربرد روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگوی ببری‌سبز روشی سودمند و دقیق می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیزشده حاصل از آنزیم فلاورزایم دارای مقادیر بالای پروتئین بوده و خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب دارد و می‌تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور به‌عنوان جایگزینی برای آرد ماهی پیشنهاد شود و همچنین می‌تواند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرد. اثرات هم‌زمان دما و زمان نشان می‌دهد با افزایش و کاهش دما از نقطهٔ مرکزی، قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده افزایش داشته و دراین‌خصوص افزایش یا کاهش مدت زمان واکنش بی‌تأثیر بوده است. همچنین اثرات هم‌زمان مقدار آنزیم و دما نشان داد که در مقدار ثابت و کم‌آنزیم با افزایش دما، قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده افزایش یافت. باتوجه‌به نتایج تحقیق حاضر و سایر مطالعه‌ها علت این امر را می‌توان چنین توجیه نمود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده بستگی به آنزیم به‌کاررفته، مادهٔ اولیه و شرایط به‌کارگرفته در آزمایش دارد. همچنین نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان بر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH تأثیرگذار است (Jun *et al.*, 2004; Batista *et al.*, 2010).

نتیجه‌گیری

نتایج نشان داد قدرت دفع رادیکال آزاد به‌طور معنی‌داری تحت‌تأثیر درجه‌حرارت و زمان هیدرولیز

[1] Hydroxyl radical
[2] *Penaues semisulcatus*

است، به‌طوری‌که با افزایش زمان هیدرولیز و درجه‌حرارت فعالیت آنتی‌اکسیدانی در تمامی آنزیم‌ها افزایش یافت ($P<0/05$). بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای هر سه آنزیم در درجه‌حرارت 55 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 60 دقیقه به‌دست‌آمد و کمترین آن نیز در درجه‌حرارت 35 درجهٔ سانتی‌گراد و در زمان 15 دقیقه حاصل گردید. البته نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیازمند بررسی پارامترهای دیگری نظیر مهار رادیکال آزاد ABTS، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی آهن (III) است.

منابع

اویسی‌پور، م.ر.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع. و محمدنظری، ر. (1389). بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله (*Thunnus albcares*) با استفاده از آنزیم‌های تجاری. *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، 1(6)، 76-68. doi:https://doi.org/10.22067/ifstrj.v6i1.4031.

پزشک، س.، اجاق، س.م.، رضایی، م. و شعبانپور، ب. (1396). بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیزشده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از امعا و احشای ماهی‌تُن زردباله (*Thunnus albcares*) با آنزیم پروتامکس. *مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*، 3(12)، 108-99.

حسنی، ش.، غرقی، الف، جمالزاده، ح.، صفری، ر. و حسینی، ش. (1391). مقایسهٔ پروتئین هیدرولیزشده از امعاء و احشاء و سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بافت. *مجله علمی شیلات ایران*، 3(21)، 62-55. doi:https://doi.org/10.22092/isfj.2017.110071

شکرپور رودباری، ر.، معتمدزادگان، ع.، حسینی‌پرور، س.ه. و اویسی‌پور، م.ر. (1389). اثر شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازهٔ مولکولی پروتئین گوشت کوسهٔ چانه‌سفید (*Carcharhinus dussumieri*). *نشریه فراوری و نگهداری مواد غذایی*، 2(2)، 110-99.

شعبانپور، ب.، کردجزی، م.، نظری، خ. و اسمعیلی خاریکی، م. (1396). اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه‌حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا روی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از میگو. *فصلنامه علوم و صنایع غذایی*، 14(62)، 45-31.

مهرگان‌نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، م.، طاهری، ع.، اعلمی، م. و کمالی، ف. 1392. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیزشدهٔ حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassius*). *نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی*، 4(2)، 364-351. doi:http://dx.doi.org/10.22101/jrifst.2014.03.01.245

یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.ر.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب. و امینی، ه. (1392). مقایسهٔ راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاواحشای ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با استفاده از آنزیم. *مجله علمی شیلات ایران*، 1(22)، 156-149. doi:https://doi.org/10.22092/ISFJ.2017.110110

AOAC. (2002). *Official methods of Analysis of AOAC International* (17th ed.). Md, Gaithersburg, USA association of official analytical chemistry.

Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., & Nunes, M.L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, *45*(1), 18-24. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2009.07.019

Bhaskar, N., & Mahendrakar, N.S. (2008). Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*catla catla*): optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technology*, *99*(10), 4105-4111. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.006

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R.G. (2008).Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, *99*(2), 335-343. doi:https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.12.015

Boziaris, I.S. (2014). Sea food processing. (pp. 479): Wiley Blackwell.

Diniz, F.M., & Martin, A.M. (1997). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*squalus acanthias*) protein. composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, *48*(3), 191-200. doi:https://doi.org/10.3109/09637489709012592

FAO. (2018). *The state of world fisheries and aquaculture*. (pp. 227).

Gan, C.Y., Manaf, N.H.A., & Latiff, A.A. (2010). Physico-chemical properties of alcohol precipitate pectin-like polysaccharides from *parkia speciosa* pod. *Food Hydrocolloids*, *24*(5), 471-478. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.11.014

Hasani, Sh., Ghoroghi, A., Jamalzadeh, H.R., Safari, R., & Hosseini, Sh. (2012). Comparison of produced fish protein hydrolysete from viscera and head of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using alcalase enzyme

and internal tissue enzymes. *Iranian Scientific Fisheries Journal, 3*(21), 55-62. doi:https://doi.org/10.22092/isfj.2017.110071 (in Persian)

Hoyle, N.T., & Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*clupea harengus*). *Journal of Food Science, 59*(1), 76-79. doi:https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x

James, C.S. (1995). *Analytical Chemistry of Foods*. Blackie Academic and Professional.

Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W.K. & Kim, S.K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology, 219*(1), 20-26. doi:https://doi.org/10.1007/s00217-004-0882-9

Kristinsson, H.G., & Rasco, B.A. (2000a). Biochemical and functional properties of atlantic salmon (*salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48*(3), 657-666. doi:https://doi.org/10.1021/jf990447v

Kristinsson, H.G., & Rasco, B.A. (2000b). Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in Food Science and Nutrition, 40*(1):43-81. doi:https://doi.org/10.1080/10408690091189266

Liaset, B., Julshamn, K., & Espe, M. (2003). Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with protamex™. *Process Biochemistry, 38*(12), 1747-1759. doi:https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00251-0

Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E. & Espe, M. (2002). Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*salmo salar*, L.) frames by protamex™ protease. *Process Biochemistry, 37*(11), 1263-1269. doi:https://doi.org/10.1016/S0032-9592(02)00003-1

Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of hydrolysates in nutritional products. *Food Technology, 48*(10), 89-95.

Mehregan Nikoo, A., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Taheri, A., Alami, M., & Kamali, F. (2013). Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius*). *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology, 4*(2), 351-364. doi:http://dx.doi.org/10.22101/jrifst.2014.03.01.245 (in Persian)

Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., & Mohammad Nazari, R. (2010). Investigating the properties of hydrolyzed proteins of tuna fish viscera by commercial enzymes. *Iranian Food Science and Technology, 6*, 76-68. doi:https://doi.org/10.22067/ifstrj.v6i1.4031 (in Persian)

Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from persian sturgeon (*acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry, 115*(1), 238-242. doi:https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. (2012). Chemical and biochemical hydrolysis of persian sturgeon (*acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology, 5*(2), 460-465. doi:https://doi.org/10.1007/s11947-009-0284-x

Pezeshk, S., Ojagh, S.M., Rezaei, M., & Shabanpour, B. (2017). Optimization of protein hydrolysates with antioxidant activity of viscera Yellowfin tuna *Thunnus albacares* with the protamex enzyme. Iranian *Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 3*(12), 99-108. (in Persian)

Shabanpour, B., Krdjzy, M., Nazari, K., & Esmaeili Khariki, M. (2017). The effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on the antioxidant properties of bioactive peptides derived from shrimp. *Journal of Food Science and Technology Innovation, 14*(62), 31-44. (in Persian)

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., & Nakamura, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of agricultural and Food Chemistry, 40*(6), 945-948. doi:https://doi.org/10.1021/jf00018a005

Shokrpour Roodbari, R., Motamedzadegan, A., Hosseiniparvar, S.H., & Ovissipour, M.R. 2012. The effect of the extent of enzymetic hydrolysis on nitrogen recovery and protein molecular size of white cheek shark meat hydrolysate. *Electronic Journal of Food Processing, 2*(2), 99-110. (in Persian)

Slizytė, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., & Rustad, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry, 40*(6), 2021-2033. doi:https://doi.org/10.1016/j.procbio.2004.07.016

Yasemi, M, Ghomi Marzdashti, M.R., Darnahal, T., Mohammadzadeh, B., & Amini, H. 2013. Yelid of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) by using enzymes. *Iranian Scientific Fisheries Journal, 22*, 149-156. doi:https://doi.org/10.22092/ISFJ.2017.110110 (in Persian)

The Effect of Enzyme, Time and Temperature on the Properties of Hydrolyzed Protein of Viscera Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*)

Atena Rafatinia[1], Laleh Roomiani[2*]

1-M.Sc. in Department of Food and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2-Assistant Professor in Department of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

* Corresponding author (l.roomiani@yahoo.com)

Abstract

The purpose of this study was to investigate the effect of enzyme kind, time and temperature on the properties of viscera (*Ctenopharyngodon idella*) hydrolyzed proteins. In this study, viscera was subjected to hydrolysis by alkalase, pepsin and flavourzyme commercial enzymes. Recycling efficiency and degree of hydrolysis obtained proteins and antioxidant activity DPPH in different conditions of the hydrolysis process at 15, 30, 60 min and three temperatures of 35, 45, 55 °C and between three enzymes with three replicates reviewed and compared. To investigate the existence or absence of significant differences between the values of each index, two-way analysis of variance and comparison of mean traits were used by Duncan test. For all enzymes used in this study, by increasing the time and temperature of hydrolysis, the amount of protein recovery and degree of hydrolysis and antioxidant activity increased, and the highest of these two indices for all three enzymes at 55 °C and in the time was 60 min and the lowest was observed at 35 °C and at 15 min. Also, the results showed that among the three enzymes studied, alkalase was similar in temperature to different pepsin and flavourzyme enzymes, with protein recovery and higher degree of hydrolysis and antioxidant activity. The highest protein digestion was related to the alkalase enzyme at 55 °C and 60 min (54.52±0.11%), and the lowest was obtained at 35 °C and 15 min. The results showed that the use of alkalase enzyme to produce hydrolyzed protein from grass carp was better in terms of recycling efficiency and degree of hydrolysis and antioxidant activity.

Keywords: Enzyme, Viscera, Hydrolyzed protein, Grass carp