

## اثر آنزیم، زمان و دما بر برخی ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده امعاواحشا کپور علف خوار

آتنا رفعتی نیا<sup>۱</sup>، لاله رومیانی<sup>۲\*</sup>

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

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۹/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۲/۲۸

### واژه‌های کلیدی

آنزیم

امعاواحشا

پروتئین هیدرولیز شده

کپور علف خوار

### چکیده

هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر آنزیم، زمان و دما بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده امعاواحشا کپور علف خوار (*Ctenopharyngodon idella*) بود. دو شاخص راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین‌های حاصله و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سه زمان ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه و سه دمای ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه 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، درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت و بیشترین مقدار این دو شاخص برای هر سه آنزیم در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمترین آنها نیز در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه مشاهده گردید. در بین ۳ آنزیم مورد بررسی، آلکالاز در شرایط دمایی یکسان و در زمان‌های مختلف نسبت به آنزیم‌های پپسین و فلاورزایم دارای بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری بود. آنزیم آلکالاز بیشترین بازیافت پروتئینی، درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه (۵۴/۵۲±۰/۱۱ درصد) و کمترین مقدار این پارامترها را نیز در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه نشان داد. باتوجه به راندمان بازیافت، درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آنزیم آلکالاز کارایی بالایی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی کپور علف خوار داشت.

### مقدمه

صنعت غذا یکی از بزرگ‌ترین تجارت‌های جهان است. گام‌های رشد این صنعت آن قدر زیاد است که باتوجه به 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 سالانه آبیان، بالغ بر

۱۳۲ میلیون تن می‌باشد (Ovissipour et al., 2009).

این میزان نسبتاً بالای صید جهانی و به دنبال آن صنایع عمل‌آوری، منجر به تولید حجم بالایی از مواد جانبی و غیرقابل استفاده گردیده که اکثراً بدون توجه به محیط زیست دورریخته می‌شوند (Bhaskar et al., 2008). از آنجاکه تولیدکنندگان فرآورده‌های دریایی به دلایل زیست‌محیطی قادر به دورریختن ضایعات خود به صورت مستقیم به دریا نمی‌باشند و برای

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

ترکیب شیمیایی بدن ماهی از گونه‌ای به گونه‌ای دیگر متفاوت است. اختلاف اصلی در ترکیب شیمیایی ماهی را باید در ارتباط با غذای دریافتی یا تغذیه ماهی دانست که شامل آب، پروتئین، لیپید، کربوهیدرات، ویتامین و مواد معدنی است (Boziaris, 2014). در دهه ۱۹۶۰ تحقیق‌های زیادی برای دستیابی به منابع پروتئینی ارزان قیمت مغذی جهت تغذیه جمعیت انسانی در حال رشد و نیز حیوانات صورت گرفت و در این راستا توجه زیادی به ضایعات معطوف شد (Bhaskar *et al.*, 2008). از طرفی، شیوع جنون گاوی در سال‌های اخیر، محققین را بر آن داشته است که پروتئین‌های دریایی هیدرولیز شده 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 هیدرولیز شده ماهیان، دارای کاربردهای وسیعی هستند، از جمله مواد مناسب برای درمان سرطان محسوب می‌شوند. از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالاست و می‌تواند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند (Mahmoud, 1994). هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی به دست آوردن حداکثر باز یافت اجزاء قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا (درجه هیدرولیز و میزان پروتئین بالا) در آنهاست. آنزیم‌های مورد استفاده به منظور 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 هیدرولیز شده، درجه هیدرولیزاسیون می‌باشد که

میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسیدهای آزاد، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیزاسیون می‌باشد (Slizyte *et al.*, 2005).

باتوجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان، تأمین منابع پروتئینی بسیار حائز اهمیت می‌باشد، از این رو مطالعه‌های بسیاری روی روش‌های تولید پروتئین انجام شده و یا در حال انجام است که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌های مهرگان‌نیکو و همکاران (۱۳۹۲) روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس<sup>۱</sup> و اثر متغیرهای دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان درجه هیدرولیز و فعالیت ضد اکسایشی اشاره کرد که ثابت شد پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی داشته باشد. شعبانپور و همکاران (۱۳۹۶) روی اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه حرارت 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 ۵۴/۶ درجه سانتی‌گراد و با درجه هیدرولیز ۳۳/۵ درصد به دست آمد. همچنین مطالعه‌های اوپسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) روی بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین از امعاواحشا ماهی<sup>۲</sup> نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به صورت معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین و درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از آنزیم‌های پروتامکس<sup>۳</sup> و فلاورزایم<sup>۴</sup> بود. بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از امعاواحشا ماهی<sup>۲</sup> زردباله با آنزیم پروتامکس توسط پزشک و همکاران (۱۳۹۶) مورد مطالعه قرار گرفت و ثابت شد آنچه بر پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر دارد ویژگی‌های ذاتی پروتئین هیدرولیز شده است. Bhaskar و

<sup>1</sup> *Carassius carassius*

<sup>2</sup> *Thunnus albacares*

<sup>3</sup> Protomax

<sup>4</sup> Flavourzyme

AOAC (۲۰۰۲) انجام شد. ۵۰ گرم از نمونه درون ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت ۲:۱ به آن اضافه گردید و با همزن دیجیتال (مدل ۷۰۰، ساخت ایران) به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه و سپس ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد.

#### تولید پروتئین هیدرولیزشده

تولید پروتئین هیدرولیزشده به روش Ovisipour و همکاران (۲۰۱۲) انجام شد. پس از خروج نمونه از یخچال و انجمادزدایی، ۵۰ گرم از نمونه‌ها درون ارلن‌مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت ۲:۱ به ارلن‌مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتال به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. امعاوحشا پخته‌شده با یک بافر سدیم فسفات، کاملاً مخلوط و pH با اضافه کردن هیدروکسید سدیم (NaOH) ۰/۲ نرمال و توسط دستگاه pH متر (مدل Metrohm 691، ساخت سوئیس) در محدوده ۷ تا ۸/۵ کنترل شد. نمونه‌ها در دستگاه آنکوباتور متحرک در دماهای ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای آزمایش مقایسه بین آنزیم‌ها در دماهای ارائه‌شده، برای تولید پروتئین هیدرولیزشده با دور ثابت ۲۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد و پس از ۱۰ دقیقه که دمای نمونه‌ها به دمای موردنظر رسید آنزیم‌ها (۱ درصد میزان پروتئین) با میکروسمپلر و ترازوی دیجیتال اضافه شدند و پس از هر نمونه‌گیری (زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۶۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیزشده طبق روش Krisstinson و Rasco (۲۰۰۰b) با استفاده از یخ، سرد شد و با استفاده از سانتریفیوژ با دور  $8000 \times g$  در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت نمونه‌ها با استفاده از سرنگ جمع‌آوری شد و پروتئین هیدرولیزشده در فریزر نگهداری و سپس با

Mahendrakar (۲۰۰۸) بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز توسط یک پروتئاز تجاری خنثی از امعاوحشا ماهی کپور هندی<sup>۱</sup> اشاره کرد. بنابراین باتوجه به پتانسیل بالای تولید پروتئین هیدرولیزشده آبیان در کشور، رسیدن به این مهم ضروری می‌باشد. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثر آنزیم، زمان و دما بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیزشده امعاوحشا ماهی کپور علف‌خوار<sup>۲</sup> بود. ماهی فوق یکی از مهم‌ترین گونه‌های پرورشی در ایران محسوب می‌شود که ۲۵ تا ۳۵ درصد تولید ماهیان گرمابی را به خود اختصاص می‌دهد. سازمان خواروبار جهانی گزارش کرد که از کل ۱۶۷/۲ میلیون تن تولید آبی‌پروری، ۲۰/۹ میلیون تن مربوط به ضایعات آبی‌پروری بوده است (FAO, 2018) که باتوجه به حجم عظیم این ضایعات می‌توان در صنعت غذا از آن بهره جست.

#### مواد و روش‌ها

ماهی کپور علف‌خوار با میانگین وزنی ۲ کیلوگرم در آبان ماه از بازار ماهی‌فروشان اهواز تهیه و با ظروف یونولیتی در کنار یخ به آزمایشگاه منتقل گردید. امعاوحشا ماهی جداشده شامل بخش‌های موجود در داخل شکم ماهی و با استفاده از یک میکسر صنعتی کاملاً چرخ و مقداری از نمونه‌های چرخ‌شده به منظور تعیین ترکیب شیمیایی (جهت تعیین میزان پروتئین اولیه) برداشته شد و مابقی در بسته‌های پلاستیکی به صورت ۵۰ گرمی که با ترازوی دیجیتال توزین شده بسته‌بندی گردید و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

#### هیدرولیز آنزیمی

به منظور هیدرولیز آنزیمی امعاوحشا ماهی کپور علف‌خوار از آنزیم‌های آلکالاز<sup>۳</sup>، پپسین<sup>۴</sup> و فلاورزایم<sup>۵</sup> (شرکت نووزایم، دانمارک) استفاده شد. تمام آنزیم‌ها تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعیین فعالیت آنزیم‌ها با استفاده از روش

<sup>۱</sup> *Catla catla*

<sup>۲</sup> *Ctenopharyngodon idella*

<sup>۳</sup> Alkalase

<sup>۴</sup> Pepsin

<sup>۵</sup> Flavourzyme

استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (Chris)، مدل 101521، ساخت تایوان) در دمای ۶۰- تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد قرار داده تا به صورت پودر درآیند.

#### اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

برای محاسبه این شاخص، بعد از پایان فرایند هیدرولیز (حداکثر ۱/۵ ساعت)، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۲۰ درصد با نسبت برابر به مایع رویی افزوده و محلول حاصل با دور ۶۷۰۰ گرم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در واقع طی این عمل پروتئین‌های شکسته‌شده از پروتئین‌های سالم جدا شدند. نیتروژن موجود در مایع رویی جدید (محلول ۱۰ درصد تری‌کلرواستیک‌اسید که حاوی پپتیدهای هیدرولیز شده است) به روش بیورت سنجیده و درجه هیدرولیز طبق رابطه (۱) مورد محاسبه قرار گرفت (Hoyle & Memitt, 1994).

رابطه (۱)

$$\text{درجه هیدرولیزاسون} = \frac{\text{نیتروژن در محلول ۱۰ درصد اسیدتری کلرواستیک}}{100 \times (\text{میزان نیتروژن در نمونه})}$$

در رابطه (۱)، درجه هیدرولیزاسیون برای تعیین میزان باندهای شکسته‌شده استفاده می‌شود. برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفوتومتر (مدل DR 6000، ساخت آمریکا) از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

#### مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

به ۰/۰۰۲ گرم محلول مهارکنندگی رادیکال آزاد (DPPH)<sup>۱</sup>، ۵۰ سی‌سی محلول متانول ۷۰ درصد اضافه و سپس ۵۰ میکرولیتر از نمونه جدا و به آن ۵ سی‌سی محلول DPPH اضافه شد. بعد از ماندن در دمای اتاق به مدت ۲۰ دقیقه جذب نمونه در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری و طبق رابطه (۲) فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد محاسبه قرار گرفت.

#### رابطه (۲)

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

برای به دست آوردن استاندارد ۱۰ میلی‌گرم اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید (EDTA)<sup>۲</sup> به ۱۰ سی‌سی متانول اضافه شد (Shimada et al., 1992).

#### اندازه‌گیری راندمان بازیافت نیتروژن

میزان بازیافت نیتروژن طبق رابطه (۳) مورد محاسبه قرار گرفت (James, 1995).

#### رابطه (۳)

$$A/B = \text{راندمان بازیافت نیتروژن}$$

در رابطه (۳)، A: میزان نیتروژن در پروتئین هیدرولیز شده و B: میزان نیتروژن در نمونه می‌باشد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌های به دست آمده با ۳ تکرار از طریق نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام پذیرفت. جهت بررسی وجود یا عدم وجود اختلاف معنی‌دار بین مقادیر حاصل از هر شاخص از آنالیز واریانس دوطرفه (ANOVA) و مقایسه میانگین صفت‌ها با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۵ درصد انجام گردید. جدول‌ها و نمودارها به کمک نرم‌افزار Microsoft Excel نسخه ۲۰۰۷ رسم شدند.

#### نتایج و بحث

##### بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط

##### آنزیم‌های تجاری در دما و زمان مختلف

مطابق جدول (۱)، در دماهای هیدرولیز ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، بازیافت پروتئین در زمان‌های هیدرولیز با اختلاف معنی‌دار مقادیر متفاوتی را نشان دادند ( $P < 0.05$ ). بیشترین درجه بازیافت پروتئین امعاواحشا کپور علف‌خوار برای هر سه آنزیم در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمترین در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه حاصل گردید (جدول ۱، ۲ و ۳).

<sup>2</sup> Ethylenediaminetetraacetic Acid

<sup>1</sup> 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

نشان دادند که افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش راندمان بازیافت نیتروژنی و کاهش طول زنجیره پپتیدی گردید ( $P < 0.05$ ). اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی نتایج حاصل از بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیزشده امعاوحشا ماهی‌تن 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 (۱۳۹۱) در بررسی نتایج حاصل از مقایسه پروتئین هیدرولیزشده امعاوحشا و سر ماهی فیتوفاگ<sup>۲</sup> با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی بعد از زمان‌های ۲ و ۴ ساعت نشان دادند که محصول تولیدشده توسط آلکالاز (تیمار ۱) بعد از ۴ ساعت به‌طور معنی‌داری از لحاظ پروتئین بالاتر از تیمار ۲ (آنزیم‌های داخلی) بود. باتوجه‌به نتایج می‌توان آنزیم آلکالاز را نسبت به آنزیم‌های داخلی برتر دانست.

راندمان بازیافت پروتئینی نشان‌دهنده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های یک ماده می‌باشد، که به خصوصیات ماده 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 (۱)، (۲) و (۳) در شرایط یکسان دمایی و در زمان‌های مختلف بیشترین میزان بازیافت پروتئین برای آنزیم آلکالاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه معادل  $54/52 \pm 0/11$  درصد و کمترین آن مربوط به آنزیم فلاورزایم در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵ دقیقه معادل  $37/50 \pm 0/12$  درصد به‌دست آمد. مقایسه آنزیم‌های به‌کاررفته در واکنش هیدرولیزاسیون جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده از لحاظ راندمان بازیافت پروتئین، نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) بین آنزیم‌های شاخص است. شکرپور رودباری و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی نتایج حاصل از بررسی شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازه مولکولی پروتئینی گوشت کوسه چانه‌سفید<sup>۱</sup>

جدول ۱ - نتایج بازیافت پروتئین امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
	۶۰	۳۰	۱۵
آلکالاز	$42/61 \pm 0/43^{aA}$	$32/52 \pm 0/24^{bA}$	$25/28 \pm 0/09^{cA}$
پپسین	$40/29 \pm 0/33^{aB}$	$31/39 \pm 0/15^{bB}$	$24/60 \pm 0/19^{cB}$
فلاورزایم	$37/50 \pm 0/12^{aC}$	$30/56 \pm 0/09^{bC}$	$22/38 \pm 0/07^{cC}$

حروف کوچک (a, b, c) و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ (A, B, C) و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۲ - نتایج بازیافت پروتئین امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
	۶۰	۳۰	۱۵
آلکالاز	$48/82 \pm 0/13^{aA}$	$34/15 \pm 0/14^{bA}$	$30/25 \pm 0/09^{cA}$
پپسین	$47/10 \pm 0/12^{aB}$	$33/23 \pm 0/04^{bB}$	$28/52 \pm 0/03^{cB}$
فلاورزایم	$45/58 \pm 0/10^{aC}$	$33/43 \pm 0/15^{bC}$	$27/52 \pm 0/14^{cC}$

حروف کوچک (a, b, c) و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ (A, B, C) و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

<sup>2</sup> Hypophthalmichthys molitrix

<sup>1</sup> Carcharhinus dussumieri

جدول ۳ - نتایج بازیافت پروتئین امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد

زمان هیدرولیز (دقیقه)			نوع آنزیم	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)
۶۰	۳۰	۱۵		
۵۴/۵۲±۰/۱۱ <sup>aA</sup>	۴۲/۰۷±۰/۱۵ <sup>bA</sup>	۳۳/۶۴±۰/۰۶ <sup>cA</sup>	آلکالاز	۵۵
۵۰/۲۸±۰/۰۳ <sup>aB</sup>	۴۱/۰۸±۰/۱۳ <sup>bB</sup>	۳۱/۴۱±۰/۱۲ <sup>cB</sup>	پپسین	
۴۸/۸۱±۰/۱۳ <sup>aC</sup>	۴۰/۱۳±۰/۱۵ <sup>bC</sup>	۲۹/۲۷±۰/۱۱ <sup>cC</sup>	فلورزایم	

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. حروف بزرگ (A, B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

همان‌طور که نتیجه 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<sup>۲</sup> آنزیم آلکالاز در فرایند هیدرولیز نسبت به سایر آنزیم‌ها دانست (Ovissipour *et al.*, 2009; 2012).

درجه هیدرولیزاسیون امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دما و زمان مختلف مطابق جدول (۴)، (۵) و (۶)، در دماهای هیدرولیز ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، نتایج هیدرولیز در زمان‌های هیدرولیز با اختلاف معنی‌دار، مقادیر متفاوتی را نشان دادند. همان‌طور که جدول (۴) نشان می‌دهد، بیشترین درجه هیدرولیزاسیون امعاوحشا کپور علف‌خوار برای هر سه آنزیم در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمترین در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه حاصل گردید.

یاسمی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی نتایج حاصل از مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاوحشا ماهی کپور سرگنده<sup>۱</sup> 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 ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمترین آن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ 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 (۲۰۱۲) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق بهینه‌سازی هیدرولیز آنزیمی پروتئین از امعاوحشا ماهی‌تن زردباله نشان دادند که پروتئین هیدرولیز شده از امعاوحشا، نسبتاً دارای سطح پروتئین بالا و سطح چربی پایین است. به‌علاوه نسبت بازده پروتئین هیدرولیز شده از امعاوحشا در محدوده ۲/۸۵-۵/۳۵ بود.

جدول ۴ - نتایج هیدرولیز امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

زمان هیدرولیز (دقیقه)			نوع آنزیم	دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)
۶۰	۳۰	۱۵		
۱۸/۳۸±۰/۱۶ <sup>aA</sup>	۱۵/۴۱±۰/۱۳ <sup>bA</sup>	۱۰/۳۲±۰/۰۴ <sup>cA</sup>	آلکالاز	۳۵
۱۶/۴۴±۰/۰۷ <sup>aB</sup>	۱۳/۳۳±۰/۰۷ <sup>bB</sup>	۹/۳۰±۰/۰۸ <sup>cB</sup>	پپسین	
۱۵/۴۲±۰/۱۳ <sup>aC</sup>	۱۱/۷۶±۰/۱۰ <sup>bC</sup>	۶/۵۹±۰/۲۰ <sup>cC</sup>	فلورزایم	

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. حروف بزرگ (A, B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

<sup>2</sup> Proteolytic

<sup>1</sup> *Aristichthys nobilis*

جدول ۵ - نتایج هیدرولیز امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)			دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)
	۶۰	۳۰	۱۵	
آلكالاز	۲۲/۲۷±۰/۰۸ <sup>aA</sup>	۲۰/۴۵±۰/۱۲ <sup>bA</sup>	۱۵/۳۴±۰/۰۶ <sup>cA</sup>	۴۵
پپسین	۲۰/۳۸±۰/۰۷ <sup>aB</sup>	۱۷/۴۰±۰/۱۵ <sup>bB</sup>	۱۴/۵۵±۰/۱۰ <sup>cB</sup>	
فلاورزایم	۲۲/۲۷±۰/۰۸ <sup>aC</sup>	۱۶/۸۸±۰/۰۷ <sup>bC</sup>	۱۴/۷۶±۰/۰۷ <sup>cC</sup>	

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ (A, B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۶ - نتایج هیدرولیز امعاوحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)			دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)
	۶۰	۳۰	۱۵	
آلكالاز	۲۵/۴۹±۰/۱۱ <sup>aA</sup>	۲۳/۳۳±۰/۱۲ <sup>bA</sup>	۱۸/۸۲±۰/۱۴ <sup>cA</sup>	۵۵
پپسین	۲۳/۳۶±۰/۱۲ <sup>aB</sup>	۱۹/۴۳±۰/۱۵ <sup>bB</sup>	۱۷/۵۰±۰/۱۷ <sup>cB</sup>	
فلاورزایم	۲۲/۲۹±۰/۱۶ <sup>aC</sup>	۲۰/۷۶±۰/۱۷ <sup>bC</sup>	۱۶/۳۲±۰/۱۱ <sup>cC</sup>	

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.  
حروف بزرگ (A, B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

هیدرولیزشده امعاوحشا ماهی تُن زردباله با استفاده از آنزیم‌های تجاری (آلكالاز، پروتامکس و فلاورزایم) نشان دادند که پروتئین هیدرولیزشده توسط آلكالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیزشده بود ( $P < 0.05$ ).

حسینی و همکاران (۱۳۹۱) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق مقایسه پروتئین هیدرولیزشده امعاوحشا و سر ماهی فیتوفاگ با استفاده از آنزیم آلكالاز و آنزیم‌های داخلی بعد از زمان‌های ۲ و ۴ ساعت نشان دادند که محصول تولیدشده توسط آلكالاز (تیمار ۱) بعد از ۴ ساعت به‌طور معنی‌داری از لحاظ درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از تیمار ۲ (آنزیم‌های داخلی) بود. نتایج نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیزاسیون افزایش پیدا کرد. یاسمی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی نتایج راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاوحشا ماهی کپور سرگنده با استفاده از آنزیم (آلكالاز، پاپائین و پروتامکس) نشان دادند که با افزایش زمان و دمای هیدرولیز، درجه هیدرولیزاسیون افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که در بین ۳ آنزیم مورد بررسی آلكالاز در شرایط دمایی یکسان و در زمان‌های مختلف نسبت به آنزیم‌های پاپائین و

نتایج مربوط به درجه هیدرولیزاسیون آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در این مطالعه، باتوجه‌به جدول (۲) نشان می‌دهد که با افزایش زمان فرایند هیدرولیزاسیون، درجه 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. درجه هیدرولیزاسیون در هر سه آنزیم مورد بررسی در این مطالعه با افزایش زمان و دمای هیدرولیز افزایش یافت به‌طوری‌که کمترین درجه هیدرولیزاسیون برای هر سه آنزیم در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه مربوط به آنزیم فلاورزایم و بیشترین آن، توسط آنزیم آلكالاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه ثبت گردید. شکرپور رودباری و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق اثر شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازه مولکولی پروتئینی گوشت کوسه چانه‌سفید نشان دادند که افزایش زمان هیدرولیز، موجب افزایش درجه هیدرولیز گردید ( $P < 0.05$ ). اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) در بررسی نتایج حاصل از خواص پروتئین‌های

مربوط می‌شود) کاهش یابد. از طرف دیگر شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت‌کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد (Kristinsson & Rasco, 2000b).

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

مطابق جدول (۷)، (۸) و (۹)، در دماهای هیدرولیز ۳۵، ۴۵ و ۵۵ درجه 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 درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمترین در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه حاصل گردید.

پروتامکس دارای درجه هیدرولیزاسیون بیشتری است. بالاترین درجه هیدرولیزاسیون مربوط به آنزیم آلکالاز در ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه بود. Kristinsson و Rasco (۲۰۰۰b) در بررسی نتایج حاصل از تحقیق روی ویژگی‌های بیوشیمیایی و کاربردی پروتئین هیدرولیزشده عضله ماهی آزاد آتلانتیک<sup>۱</sup> توسط پروتئازهای قلیایی مختلف نشان دادند که افزایش زمان واکنش هیدرولیز و دمای هیدرولیز به صورت هم‌زمان، باعث افزایش درجه هیدرولیزاسیون می‌شود. باتوجه به 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 درجه هیدرولیزاسیون میزان شکسته‌شدن باندهای پپتیدی است و مفهوم شدت هیدرولیزاسیون به خواص حساسیت‌زای پروتئین‌ها

جدول ۷ - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
	۱۵	۳۰	۶۰
آلکالاز	۲۷/۳۲±۰/۰۳ <sup>aA</sup>	۲۸/۶۴±۰/۰۸ <sup>bA</sup>	۳۰/۲۵±۰/۰۴ <sup>aA</sup>
پپسین	۲۶/۲۱±۰/۰۴ <sup>bB</sup>	۲۷/۷۳±۰/۰۸ <sup>bB</sup>	۲۹/۲±۰/۰۵ <sup>aB</sup>
فلاورزایم	۲۶/۲۶±۰/۰۸ <sup>cC</sup>	۲۷/۲۶±۰/۰۷ <sup>bC</sup>	۲۸/۷۴±۰/۰۶ <sup>aC</sup>

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. حروف بزرگ (A, B, C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

جدول ۸ - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)		
	۱۵	۳۰	۶۰
آلکالاز	۲۸/۳۶±۰/۰۷ <sup>aA</sup>	۲۹/۷۶±۰/۰۸ <sup>bA</sup>	۳۲/۷۴±۰/۰۹ <sup>aA</sup>
پپسین	۲۷/۴۶±۰/۰۷ <sup>bB</sup>	۲۹/۲۵±۰/۰۶ <sup>bB</sup>	۳۱/۴۲±۰/۰۸ <sup>aB</sup>
فلاورزایم	۲۷/۲۶±۰/۰۷ <sup>cC</sup>	۲۸/۸۴±۰/۰۷ <sup>bC</sup>	۳۱/۲۸±۰/۰۷ <sup>aC</sup>

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. حروف بزرگ (A, B, C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

<sup>1</sup> *Salmo salar*



جدول ۹ - نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) امعاواحشا کپور علف‌خوار توسط سه آنزیم تجاری در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد

نوع آنزیم	زمان هیدرولیز (دقیقه)			دمای هیدرولیز (درجه سانتی‌گراد)
	۶۰	۳۰	۱۵	
آلكالاز	۳۳/۶۶±۰/۰۵ <sup>aA</sup>	۳۱/۴۷±۰/۰۷ <sup>bA</sup>	۲۸/۶۶±۰/۰۶ <sup>cA</sup>	۵۵
پپسین	۳۲/۷۶±۰/۰۶ <sup>aB</sup>	۳۰/۳۱±۰/۰۶ <sup>bB</sup>	۲۸/۲۲±۰/۰۷ <sup>cB</sup>	
فلاورزایم	۳۱/۸۸±۰/۰۵ <sup>aC</sup>	۳۰/۳۷±۰/۰۶ <sup>bC</sup>	۲۷/۵۳±۰/۰۶ <sup>cC</sup>	

حروف کوچک (a, b, c و غیره) غیرمشابه در هر ردیف به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است. حروف بزرگ (A, B و C و غیره) غیرمشابه در هر ستون به مفهوم اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ است.

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 ببری سبز 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 نقطه مرکزی، قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده افزایش داشته و در این خصوص افزایش یا کاهش مدت زمان واکنش بی‌تأثیر بوده است. همچنین اثرات هم‌زمان مقدار آنزیم و دما نشان داد که در مقدار ثابت و کم آنزیم با افزایش دما، قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیزشده افزایش یافت. باتوجه به نتایج تحقیق حاضر و سایر مطالعه‌ها علت این امر را می‌توان چنین توجیه نمود که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده بستگی به آنزیم به‌کاررفته، ماده اولیه و شرایط به‌کار گرفته در آزمایش دارد. همچنین نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان بر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH تأثیرگذار است (Jun et al., 2010; Batista et al., 2010).

#### نتیجه‌گیری

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

به‌طورکلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده، بستگی به آنزیم به‌کاررفته، ماده اولیه و شرایط به‌کار گرفته‌شده در آزمایش دارد (Jun et al., 2010; Batista et al., 2004). رادیکال هیدروکسیل<sup>۱</sup>، 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 باتوجه به جدول (۳) 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 ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه مربوط به آنزیم پپسین و بیشترین آن توسط آنزیم آلكالاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه ثبت گردید.

شعبانپور و همکاران (۱۳۹۶) 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 منجر به تولید پروتئین هیدرولیزشده از ضایعات میگوی ببری سبز<sup>۲</sup> توسط آنزیم فلاورزایم گردید، نشان دادند که فرآورده‌های تولیدی، پاسخ بهتری به دفع رادیکال DPPH در مقایسه با قدرت

<sup>۱</sup> Hydroxyl radical

<sup>۲</sup> *Penaeus semisulcatus*

است، به طوری که با افزایش زمان هیدرولیز و درجه حرارت فعالیت آنتی اکسیدانی در تمامی آنزیم‌ها افزایش یافت ( $P < 0.05$ ). بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی برای هر سه آنزیم در درجه حرارت ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه به دست آمد و کمترین آن نیز در درجه حرارت ۳۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۱۵ دقیقه حاصل گردید. البته نتیجه‌گیری دقیق‌تر نیازمند بررسی پارامترهای دیگری نظیر مهار رادیکال آزاد ABTS، فعالیت آنتی اکسیدانی کل و قدرت احیاکنندگی آهن (III) است.

## منابع

- ۱- اویسی‌پور، م.ر.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع. و محمدنظری، ر. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیزشده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم‌های تجاری. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱(۶): ۶۸-۷۶.
- ۲- پزشک، س.، اجاق، س.م.، رضایی، م. و شعبانپور، ب. ۱۳۹۶. بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیزشده با فعالیت آنتی اکسیدانی از امعاء و احشای ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم پروتامکس. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۳(۱۲): ۹۹-۱۰۸.
- ۳- حسینی، ش.، غرقی، الف.، جمالزاده، ح.، صفری، ر. و حسینی، ش. ۱۳۹۱. مقایسه 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، ۳(۲۱): ۵۵-۶۲.
- ۴- شکرپور رودباری، ر.، معتمدزادگان، ع.، حسینی‌پور، س.ه. و اویسی‌پور، م.ر. ۱۳۸۹. اثر شدت هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی و اندازه مولکولی پروتئین گوشت کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*). نشریه فراوری و نگهداری مواد غذایی، ۲(۲): ۹۹-۱۱۰.
- ۵- شعبانپور، ب.، کردجری، م.، نظری، خ. و اسمعیلی خاریکی، م. ۱۳۹۶. اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا روی خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از میگو. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۱۴(۶۲): ۳۱-۴۵.
- ۶- مهرگان نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، م.، طاهری، ع.، اعلمی، م. و کمالی، ف. ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassius*). نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۴(۲): ۳۶۴-۳۵۱.
- ۷- یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.ر.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب. و امینی، ه. ۱۳۹۲. مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاء و احشای ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با استفاده از آنزیم. مجله علمی شیلات ایران، ۱(۲۲): ۱۵۶-۱۴۹.
- 8- AOAC. 2002. Official methods of Analysis of AOAC International (17<sup>th</sup> ed.). Md, Gaithersburg, USA association of official analytical chemistry.
- 9- 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.
- 10- 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.
- 11- 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.
- 12- Boziaris, I.S. 2014. Sea food processing. Wiley Blackwell. 479p.

- 13-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.
- 14-FAO. 2018. The state of world fisheries and aquaculture. 227p.
- 15-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.
- 16-Hoyle, N.T., & Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*clupea harengus*). Journal of Food Science, 59(1): 76-79.
- 17-James, C.S. 1995. Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic and Professional.
- 18-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.
- 19-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.
- 20-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.
- 21-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.
- 22-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.
- 23-Mahmoud, M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of hydrolysates in nutritional products. Food Technology, 48(10):89-95.
- 24-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.
- 25-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.
- 26-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.
- 27-Slizytè, 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.

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

Atena Rafatinia<sup>1</sup>, Laleh Roomiani<sup>2\*</sup>

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