



بررسی خواص آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال تخلیص شده از ضایعات حاصل از فرآوری ماهی هوور
مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) با استفاده از آنزیم های گوارشی پپسین و تریپسین

شیما کاوه^۱، علیرضا صادقی ماهونک^{۲*}، وحید عرفانی مقدم^۳، محمد قربانی^۴، علی اکبر غلامحسین پور^۵، مجتبی رئیس^۶

۱- دانشجوی دکتری شیمی مواد غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳- استادیار مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۴- استادیار گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۵- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۶- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه جهرم

۷- دانشیار مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

چکیده

اطلاعات مقاله

در صنایع فرآوری ماهی ها ۷۰-۵۰٪ ماهی اولیه به عنوان ضایعات تولید می شوند درحالی که منابع غنی از پروتئین و آمینواسیدهای ضروری هستند. استفاده ی بهینه از این ضایعات و تولید ترکیبات با ارزش افزوده ی بالا که خواص سلامتی بخش قابل توجهی داشته باشند از چالش های مهم صنایع فرآوری ماهی ها است. در این پژوهش تاثیر شرایط هیدرولیز (زمان: ۳۰-۳۰۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۳-۵۰ درصد) و نوع پروتئاز (پپسین و تریپسین) بر درجه هیدرولیز و ویژگی های آنتی اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH، شلاته کنندگی یون آهن، مهار رادیکال نیتریک اکسید، ظرفیت ضد اکسایشی کل و احیاء کنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی با استفاده از روش سطح پاسخ ارزیابی شد. نتایج نشان داد که شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با بیشترین ویژگی های آنتی اکسیدانی با آنزیم های پپسین و تریپسین به ترتیب عبارت بودند از: زمان هیدرولیز ۱۷۹/۰۹ و ۱۴۳/۶۲ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۶۳ و ۱/۹۴ درصد؛ در این شرایط درجه هیدرولیز پروتئین های هیدرولیز شده ی حاصل از فعالیت تریپسین بیشتر از پپسین محاسبه شد. مقایسه ویژگی های آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده های حاصل از دو آنزیم مورد استفاده نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تریپسین از پتانسیل آنتی اکسیدانی قوی تری نسبت به پپسین برخوردار بود. بنابراین می توان بیان نمود که پروتئین هیدرولیز شده امعاء احشا ماهی هوور مسقطی با استفاده از آنزیم تریپسین به عنوان یک ترکیب سلامتی بخش و با ارزش افزوده بالا قابلیت کاربرد در تولید محصولات غذایی فراسودمند و مکمل های سلامتی بخش برای ورزشکاران و افراد سالمند را دارد.

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۳/۷

کلمات کلیدی:

آنتی اکسیدان،

پپسین،

پپتید زیست فعال،

تریپسین،

هوور مسقطی.

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.200

DOI: 20.1001.1.20088787.1402.20.141.13.1

* مسئول مکاتبات:

Sadeghiaz@yahoo.com

۱- مقدمه

امروزه مشخص شده است که بسیاری از بیماری های متابولیک با افزایش میزان التهاب بدن، اکسیداسیون سلولی، میزان گلوکز و فشار خون ارتباط دارند [۱]. اکسیداسیون نقش مفیدی در سلول ها ایفا می کند به این صورت که، گونه های فعال اکسیژن درون سلولی اکسیژن قادر به تنظیم و هدایت سیگنال چندین مسیر فعال سازی سیستم ایمنی در برابر التهاب هستند. با این حال، عدم تعادل گونه های فعال اکسیژن درون سلولی می تواند باعث آسیب سلولی شود که عوارض نامطلوب زیادی از جمله بیماری های قلبی عروقی را در دراز مدت در پی دارد [۲]. سالیان زیادی از ترکیبات آنتی اکسیدانی سنتزی برای کنترل تنش های اکسیداتیو استفاده می شده است، اما امروزه شناسایی اثرات نامطلوب و بیماری زایی آنها باعث کاربرد محدود این ترکیبات و تلاش برای شناسایی ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی شده است. در میان ترکیبات آنتی اکسیدانی طبیعی، پپتیدهای زیست فعال حاصل از پروتئین های غذایی معمولا حاوی ۲۰-۲ آمینواسید هستند که امروزه به طور گسترده ای خواص آنتی اکسیدانی آنها مورد مطالعه قرار گرفته است. این پپتیدها علاوه بر پتانسیل آنتی اکسیدانی دارای خواص سلامتی بخش گوناگونی از جمله ضد التهاب، ضد فشار خون و ضد میکروبی نیز هستند [۳]. از سوی دیگر در قرن بیست و یکم، غذا نه تنها به عنوان منبع مواد مغذی ضروری برای بدن، بلکه به عنوان منبعی برای ترکیبات زیست فعال که تأثیر مثبتی بر روی بدن دارند در نظر گرفته می شود [۴]. پروتئین های هیدرولیز شده به عنوان یکی از این منابع مغذی به شمار می آیند که منبعی از پپتیدهای زیست فعال با خواص سلامتی بخش چندگانه هستند است [۵]. پژوهش های مختلف نشان داده است که نوع آنزیم پروتئاز، شرایط هیدرولیز و منبع پروتئینی نقش مهمی در خواص سلامتی بخش پپتیدهای زیست فعال تولیدی دارند [۶]. منابع گیاهی و حیوانی زیادی برای تولید پروتئین هیدرولیز

شده و پپتیدهای زیست فعال مناسب هستند از جمله شنبلیله [۷]، شیر بز [۸] و ماش [۹] تولید شده اند اما در جهت کاهش هزینه محصول نهایی و مدیریت پایدار و مناسب منابع غذایی، اغلب پروتئین های هیدرولیز شده از ضایعات فرآوری صنایع غذایی تولید می شوند [۱۰]. صنایع فرآوری آبزیان به ویژه ماهی از صنایع تولید کننده با بیشترین میزان ضایعات محسوب می شود که افزایش تقاضا برای محصولات فرآوری شده ماهی، استفاده از ضایعات فرآوری را به یکی از دغدغه های اصلی تولید کنندگان تبدیل کرده است [۱۱]. اگرچه تعریف واضح و مشخصی برای ضایعات حاصل از فرآوری ماهی ها وجود ندارد اما حدود ۷۰-۵۰ درصد ماهی اولیه (سر، خارها، باله ها، پوست و امعاء و احشا ماهی) به عنوان ضایعات در نظر گرفته می شوند [۱۲]. سالانه در جهان حدود ۴ میلیون تن ماهی تون صید می شود که در این میان هوور مسقطی با نام علمی *Katsuwonus pelamis* از بالاترین میزان صید برخوردار است و بیشترین میزان مصرف را در تولید کنسرو ماهی دارد؛ بنابراین بخش زیادی از ضایعات کارخانجات کنسرو ماهی را تشکیل می دهد و گزینه مناسبی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده است [۱۳]. در سال های اخیر پروتئین های هیدرولیز شده با قابلیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی از ضایعات فرآوری ماهیان همچون سر ماهی ساردین [۱۴]، پوست و امعاء و احشا سپیداج^۱ [۱۵]، پوست و سر ماهی کت چرمی^۲ [۱۶] تولید شده است که پتانسیل کاربرد در تولید محصولات فراسودمند را دارند.

بنابراین با توجه به موارد بیان شده، هدف از این پژوهش بررسی تأثیر زمان هیدرولیز و نوع پروتئاز (پپسین و تریپسین) در تولید پپتید زیست فعال حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی و بررسی درجه هیدرولیز و ویژگی های آنتی اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال DPPH^۳،

1- cuttlefish

2- leatherjacket

3- 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl

احیاء کنندگی یون آهن، شلاته‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال نیتریک اکسید و آنتی اکسیدانی کل) آن بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پپسین، تریپسین، تری کلرواستیک اسید، DPPH، کوماسی بریلیانت بلو (G250)، فریک کلراید، پتاسیم فری سیانید، دی کلرید آهن و فروزین از شرکت مرک آلمان تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی نیز با درجه خلوص آزمایشگاهی از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد.

۲-۲- آماده‌سازی نمونه

ابتدا امعاء و احشاء ماهی هوور مسقطی حاصل از ضایعات فرآوری کارخانه ساحل صید کنارک (تحفه) با آب مقطر شسته و کاملاً چرخ شدند. سپس جهت غیرفعال کردن آنزیم‌های درونی ماهی، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد در بن ماری حرارت داده شده و به‌منظور کاهش دما، در حمام آب یخ به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. خشک کردن نمونه‌ها با قرار دادن در آون ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت انجام شد. در مرحله‌ی بعد نمونه‌ها آسیاب و از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. در نهایت نمونه‌های حاصل در کیسه‌های پلی اتیلنی در فریزر ۲۰- شدند [۱۷].

۲-۳- چربی‌گیری

به‌منظور چربی زدایی، پودرها به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۵ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد همزده شدند. سپس با استفاده از قیف بوختر هگزان جدا شده و در آون ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت خشک شدند. پودر حاصل مجدداً آسیاب و از الک با مش ۴۰ عبور داده شد [۱۶].

۲-۴- استخراج پروتئین

جهت استخراج پروتئین، پودر چربی‌گیری شده به نسبت ۱:۱۰ با آب مقطر مخلوط و pH آن با استفاده از سود ۱ نرمال به pH=۱۰ رسانده و به مدت ۱ ساعت با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد همزده شد. سپس محلول حاصل در ۷۰۰۰×rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ و سوپرناتانت حاصل جمع آوری شد. سپس pH سوپرناتانت به pH=۴ (pH ایزوالکتریک) تنظیم و به منظور ترسیب پروتئین‌ها، در ۸۰۰۰×rpm به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در نهایت رسوب پروتئینی حاصل با آب مقطر دو بار شسته شد و در ۷۰۰۰×rpm، به مدت ۵ دقیقه مجدداً سانتریفوژ گردید. ایزوله پروتئینی حاصل با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی خشک و تا زمان انجام آزمون‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۸].

۲-۵- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

ایزوله پروتئینی حاصل در غلظت (w/v) ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۲M مولار pH=۷/۴ برای تریپسین و pH=۲ برای پپسین حل و جهت هیدراته شدن کامل آن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. سپس در انکوباتور شیکر دار با دور rpm ۲۰۰ در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد. آنزیم به نسبت‌های ذکر شده در جدول ۱ به نمونه‌ها اضافه و هیدرولیز با توجه به زمان‌های مشخص شده در این جدول انجام شد. در نهایت برای غیرفعال‌سازی آنزیم، ارلن‌ها درون حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و با استفاده از حمام آب یخ تا دمای محیط خنک شدند. سپس نمونه‌ها با دور rpm ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت جدا و با استفاده از خشک کن انجمادی خشک گردید و تا انجام آزمون‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد [۱۹].

۲-۶- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه گیری میزان رطوبت، پروتئین، خاکستر و چربی با استفاده از روش AOAC 2000، انجام شد [۲۰].

۲-۷- تعیین درجه هیدرولیز

سوسپانسیون پروتئین هیدرولیز شده و تری کلرواستیک اسید (۰/۴۴M) در نسبت حجمی ۱:۱ مخلوط و به مدت ۱۵ min دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس، مخلوط در ۱۰۰۰ rpm و به مدت ۱۰ min سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش برادفورد تعیین گردید [۲۱]. در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول ۱ تعیین شد:

(۱)

$$\text{Degree of hydrolysis (\%)} = \frac{\text{protein in supernatant containing TCA}}{\text{protein in hydrolysate suspension}} \times 100$$

۲-۸- بررسی خصوصیات آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۲-۸-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ابتدا هیدرولیز شده‌های حاصل در آب مقطر (۱۰ mg/ml) حل شدند سپس، ۱/۵ ml میلی لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵ mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در مرحله بعد، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس در ۴۰۰۰ rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷ nm خوانده شد [۱۶]. درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول ۲ محاسبه گردید:

(۲)

۲-۸-۲- تعیین قدرت احیاء کنندگی یون آهن

برای تعیین قدرت احیاء کنندگی یون آهن نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۱۰ mg/ml) با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ M (pH=۶/۶) و ۰/۵ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید (W/V) ۱٪ مخلوط و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس، ۰/۵ میلی لیتر محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به مخلوط اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در نهایت، ۱ میلی لیتر سوپرناتانت با ۱ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر فریک کلراید (W/V) ۰/۱ درصد مخلوط گردید. جذب نمونه در ۷۰۰ nm پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاء کنندگی است [۲۲].

۲-۸-۳- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

برای ارزیابی فعالیت شلاته کنندگی یون آهن، ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰ mg/ml) با ۰/۵ میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (۲ Mm) و ۱/۸۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵ Mm) افزوده و مخلوط به شدت هم زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ nm خوانده شد [۲۳]. از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید:

$$\text{Chelating effect (\%)} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (۳)$$

۲-۸-۴- ظرفیت ضد اکسایشی کل

این روش بر مبنای احیاء مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن محلول می‌گردد. در این روش، ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۱۰ mg/ml) با ۱ میلی لیتر از معرف (اسید سولفوریک M

۳-۱- ترکیبات شیمیایی

میزان خاکستر، رطوبت و پروتئین پودر امعاء و احشا چربی‌گیری نشده، چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئین حاصل در جدول ۱ ذکر گردیده است. میزان پروتئین در پودر چربی‌گیری نشده ۴۳/۷۵ درصد بود که پس از فرآیند استخراج به ۸۷/۵ درصد افزایش یافت. افزایش پروتئین ایزوله‌ی حاصل نسبت به پودر امعاء و احشا اولیه علاوه بر کاهش میزان چربی طی فرآیند چربی‌گیری می‌تواند به دلیل حذف بخش زیادی از ترکیبات غیر پروتئینی در $\text{pH}=10$ باشد. میزان چربی در پودر چربی‌گیری نشده ۲۱/۲۵ درصد بود که پس از مراحل چربی‌گیری و استخراج پروتئین به- ترتیب به میزان ۷/۰۶ و ۴/۱۰ درصد کاهش یافت. میزان چربی پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پودر اولیه امعاء و احشا ماهی به‌طور معنی‌داری کمتر بود. کاهش میزان چربی می‌تواند، به دلیل فرآیندهای چربی‌گیری و استخراج پروتئین در pH ایزوالکتریک باشد. میزان کم چربی (کمتر از ۵ درصد) در ایزوله‌ی پروتئینی حاصل از کارایی خوب هگزان در چربی‌گیری از امعاء و احشا ماهی است. همچنین میزان رطوبت و خاکستر هم روند کاهشی داشته و پس از استخراج پروتئین به‌ترتیب از ۸/۰۳ و ۸/۴ درصد به ۵/۲ و ۳/۱۵ درصد تقلیل پیدا کردند. روند کاهش رطوبت طی فرآیند استخراج پروتئین نیز می‌تواند در نتیجه به‌کارگیری آون با دمای ۳۰ درجه‌ی سانتی‌گراد بعد از فرآیند چربی‌گیری به‌منظور خروج باقی مانده هگزان و همچنین به- کارگیری خشک کن انجمادی برای خشک کردن ایزوله‌ی پروتئینی باشد. از سوی دیگر کاهش میزان خاکستر نیز می‌تواند به‌دلیل فرآیند استخراج پروتئین باشد که بسیاری از ترکیبات آلی غیر پروتئینی و املاح معدنی حذف می‌شوند [۱۹].

۰/۶، فسفات سدیم ۲۸ Mm و آمونیوم مولیبدات ۴ mM) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در ۶۹۵ nm خوانده شد. از آب مقطر دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده گردید. جذب بیشتر نشان دهنده‌ی ظرفیت ضد اکسایشی کل بیشتر است [۲۴].

۲-۸-۵- فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید

به این منظور ۶۰ میکرولیتر سدیم نیترو پروکسید در بافر PBS با ۶۰ μl نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۱۰ mg/ml) مخلوط گردید. سپس در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵۰ min دقیقه انکوبه شد. سپس ۱۲۰ میکرولیتر از معرف گریس به آن اضافه و جذب محلول حاصل در ۵۴۶ nm خوانده شد [۲۵]. فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌ها با استفاده از معادله ۴ محاسبه گردید:

$$NO\ chelating\ activity = \frac{(A_{control} - A_{sample})}{A_{control}} \times 100$$

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

بهینه سازی شرایط هیدرولیز با نرم افزار Design expert نسخه ۷ و روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی انجام شد. متغیرهای مستقل زمان (۳۰-۳۰۰ دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۳-۵/۰ درصد) و پاسخ مورد بررسی قدرت احیاکنندگی یون آهن، فعالیت مهار رادیکال DPPH، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید و درجه هیدرولیز در نظر گرفته شدند. برای مقایسه میانگین چربی، رطوبت، خاکستر و پروتئین نیز از آزمون چند دامنه ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد. کلیه آزمون‌ها در سه تکرار انجام شد.

۳- نتایج و بحث

Table 1. chemical composition of Undefatted, defatted powder and protein isolate of

	Ash (%)	Fat (%)	Moisture (%)	Protein (%)
Undefatted powder	5.4± 0.16 ^a	21.25±0.12 ^a	8.03±0.35 ^a	43.75±0.12 ^c
Defatted powder	4.36± 0.12 ^b	7.06±0.11 ^b	7.2±0.26 ^b	61.25±0.16 ^b
Protein isolate	1.15± 0.11 ^c	4.10±0.23 ^c	5.3±0.25 ^c	87.5±0.24 ^a

Means with the same letters in each column show no significant difference at the 0.05 level

۳-۲- تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا، زمان و نوع پروتئاز

بر درجه هیدرولیز

نتایج تجزیه واریانس درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پپسین و تریپسین در (جدول ۲) نشان داده شده است. با توجه به نتایج تمام متغیرهای مورد بررسی به جز A^2 بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پپسین تاثیر معنی‌داری داشتند؛ از سوی دیگر بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تریپسین نیز تنها متغیر B^2 و AB تاثیر معنی‌داری نداشتند ($p < 0.05$). رابطه درجه هیدرولیز با پارامترهای واکنش هیدرولیز حاصل از هر دو آنزیم پپسین و تریپسین از نوع درجه دوم بود که ضریب رگرسیون آنها به‌ترتیب عبارت بود از $R^2 = 0.2199$ و $R^2 = 0.9530$. از سوی دیگر فاکتور عدم برازش^۱ در واکنش هیدرولیز با هر دو آنزیم معنی‌دار نشد که نشان از توانایی

بالای مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای مورد بررسی بر درجه هیدرولیز دارد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که رابطه‌ی متغیرهای مورد بررسی در فرآیند هیدرولیز با پپسین و تریپسین و درجه هیدرولیز به‌ترتیب از رابطه‌ی (۵) و (۶) تبعیت می‌کند.

(۵)

$$\text{درجه هیدرولیز} = +15.76 + 2.37 A + 2.33 B - 2.94 AB - 0.60 A^2 - 2.06 B^2$$

(۶)

$$\text{درجه هیدرولیز} = +18.09 + 4.19 A + 1.64 B - 1.32 AB - 1.74 A^2 - 1.94 B^2$$

1 -Lack of fit

Table 2. ANOVA of degree of hydrolysis of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin				
Hydrolysis with trypsin				
ANOVA of degree of hydrolysis				
Model	146.79	5	0.0025	15.76
	198.60	5	0.0085	18.09
A-time	44.84	1	0.0026	2.37
	140.37	1	0.0013	4.19
B- E/S	43.51	1	0.0028	2.33
	21.64	1	0.0422	1.64
AB	34.57	1	0.0045	-2.94
	6.92	1	0.2111	-1.32
A²	2.04	1	0.2885	-0.60
	17.02	1	0.0743	-1.74
B²	23.87	1	0.0097	-2.06
	21.28	1	0.0535	-1.94
Lac of fit	0.17	3	0.3647	
	16.48	3	0.0847	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

هیدرولیز شد اما در زمان‌های بیشتر هیدرولیز این افزایش شیب ثابتی داشت. به‌طور کلی بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۲۰/۳۳ درصد)، در زمان هیدرولیز ۲۴۷/۷۶ و غلظت آنزیم ۱/۷۵ درصد و کمترین میزان درجه هیدرولیز (۷/۵۲ درصد) در زمان هیدرولیز ۶۹/۸۶ دقیقه و غلظت آنزیم ۰/۸۹ درصد حاصل شد. بنابراین در مقایسه بین آنزیم‌های پپسین و تریپسین، بیشترین میزان درجه هیدرولیز با استفاده از آنزیم تریپسین حاصل شد. مطالعات نشان داده است که ثابت شدن شیب افزایش میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان می‌تواند به‌دلیل هیدرولیز بیش از حد سوبسترای پروتئینی و تاثیر بازدارندگی پپتیدهای تولیدی [۲۶]، کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس برای هیدرولیز و همچنین غیر فعال شدن آنزیم پروتئازی باشد [۲۷]. مشابه با این نتایج شرافت و همکاران (۲۰۱۳) با هیدرولیز پروتئین ضایعات پس از پخت ماهی هوور گزارش کردند که میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز کاهش یافت و به ۳ در صد رسید [۲۸]. از سوی دیگر یو و همکاران (۲۰۰۹) با هیدرولیز امعاء و احشا ماهی کپور سرگنده گزارش کردند که افزایش زمان

با توجه به شکل 1A، در زمان‌های ثابت، با افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۱۶ درصد، درجه هیدرولیز افزایش یافت و پس از آن با افزایش بیشتر غلظت آنزیم تا ۲/۸۶ درصد درجه هیدرولیز با شیب ثابتی افزایش پیدا کرد و به ۱۵/۸۶ درصد رسید. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم پپسین، افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش درجه هیدرولیز شد اما پس از ۲۱۲ دقیقه میزان افزایش شیب ثابتی داشت. به‌طور کلی بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۱۷/۳۰ درصد) با آنزیم پپسین در زمان هیدرولیز ۲۴۴/۲۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۶۵ درصد و کمترین میزان درجه هیدرولیز (۵/۸۷ درصد) در زمان ۷۳/۸۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۰/۸۸ درصد به‌دست آمد. در هیدرولیز با آنزیم تریپسین (شکل 1B)، در غلظت‌های ثابت آنزیم تا ۲/۱۶ درصد افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش درجه هیدرولیز تا ۱۸/۰۳ درصد شد اما در غلظت‌های بیشتر آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز باعث شد که درجه هیدرولیز با شیب ثابتی افزایش پیدا کند. از سوی دیگر در زمان‌های ثابت و کمتر از ۲۱۲ دقیقه هیدرولیز با آنزیم تریپسین نیز افزایش غلظت آنزیم باعث افزایش درجه

هیدرولیز تا ۲۰ ساعت باعث افزایش میزان درجه هیدرولیز از ۱۸ به ۳۳ درصد شد [۲۹].

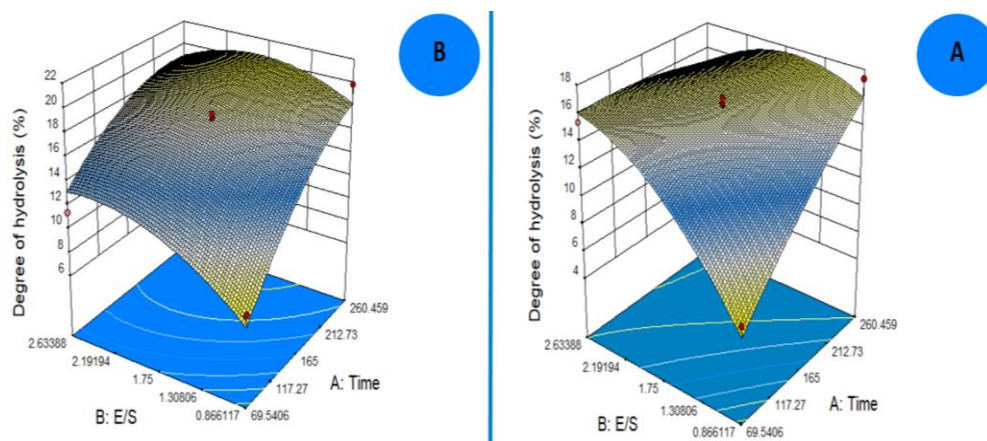


Figure 1- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on degree of hydrolysis of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

از پیپسین و تریپسین به ترتیب $R^2=0.9184$ و 0.9671 به دست آمد که حاکی از توانایی بالای مدل در پیش-بینی تاثیر متغیرهای فرآیند هیدرولیز با هر دو آنزیم پیپسین و تریپسین بر فعالیت مهار رادیکال DPPH می باشد. از سوی دیگر معنی دار نبودن شاخص عدم برازش نشان می دهد که مدل مورد نظر به خوبی توانسته تغییرات در مقدار داده ها را توصیف کند. رابطه ی مهار رادیکال DPPH با متغیرهای فرآیند هیدرولیز با پیپسین و تریپسین به ترتیب از معادله های (۷) و (۸) تبعیت می کند.

(۷)

$$DPPH = +42.91 + 2.01 A + 0.60 B + 0.55 AB - 7.57 A^2 - 8.25 B^2$$

(۸)

$$DPPH = +51.57 + 2.75 A + 3.08 B + 1.05 AB - 9.21 A^2 - 8.65 B^2$$

۳-۳- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع

پروتئاز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH

نتایج تجزیه ی واریانس تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر فعالیت مهار رادیکال DPPH در جدول ۳، ذکر شده است. متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های حاصل از فعالیت هر دو آنزیم پیپسین و تریپسین معنی دار بود و متغیر AB زمان تنها بر فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های حاصل از پیپسین معنی دار بود و سایر متغیرها بر هیدرولیز شده های حاصل از هردو آنزیم تاثیر معنی دار نداشتند ($p < 0.05$). فعالیت مهار رادیکال DPPH با متغیرهای مستقل مورد بررسی در هیدرولیز با هر دو آنزیم از نوع درجه دوم بود و میزان ضریب همبستگی در مورد هیدرولیز شده های حاصل

Table 3. ANOVA of DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin			Hydrolysis with trypsin	
Model	584.29	5	0.0010	42.91
	837.88	5	0.0095	51.57
A-time	32.30	1	0.0358	2.01
	60.36	1	0.1003	2.75
B- E/S	2.91	1	0.4314	0.60
	75.78	1	0.0738	3.08
AB	1.22	1	0.6032	0.55
	4.43	1	0.6089	1.05
A ²	323.46	1	0.0003	-7.57
	479.44	1	0.0024	-9.21
B ²	384.43	1	0.0002	-8.25
	422.20	1	0.0031	-8.65
Lac of fit	19.71	3	0.0711	
	24.59	3	0.0641	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

درصد کاهش یافت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم با افزایش زمان تا ۱۶۵ دقیقه، فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های تریپسین افزایش یافت و به ۴۹/۲۴ درصد رسید اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز، تاثیر منفی داشت. به‌طور کلی با توجه به نمودار بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH (۵۲/۰۶ درصد) در زمان هیدرولیز ۱۸۰/۷۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۶ درصد حاصل شد. تاثیر منفی افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز بر قابلیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به دلیل پیشرفت فرآیند هیدرولیز و تاثیر بیش از اندازه پروتئازها بر پپتیدهای آنتی اکسیدان تولیدی در مراحل اولیه و تخریب آنها باشد که باعث کاهش قابلیت پروتئین هیدرولیز در مهار رادیکال DPPH شده است [۳۰]. کاهش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده با افزایش غلظت آنزیم احتمالاً به دلیل هیدرولیز بیش از حد پروتئین توسط آنزیم است که منجر به رهایش کامل آمینواسیدهای آبدوست شده است که برهمکنش آمینواسیدهای فعال رها شده را با رادیکال محلول در چربی DPPH مشکل می‌کند [۳۱]. با توجه به اینکه هر دو آنزیم به‌کار رفته در این

با توجه به شکل 2A، در مقادیر ثابت آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده حاصل به میزان ۴۲/۸۴ درصد شد اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر منفی بر توانایی هیدرولیز شده‌های تولیدی در مهار رادیکال DPPH تا ۳۰/۰۹ درصد شد. از سوی دیگر، در زمان‌های ثابت هیدرولیز نیز افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH تا ۴۰/۷۸ درصد شد و افزایش بیشتر غلظت آنزیم باعث کاهش توانایی مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده حاصل گشت. به‌طور کلی بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH توسط آنزیم پپسین (۴۳/۰۲ درصد) در زمان هیدرولیز ۱۸۲/۹۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۷۵ درصد حاصل شد. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت تریپسین (شکل 2B)، در زمان‌های هیدرولیز ثابت، افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH تا ۵۱/۲۹ درصد شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر منفی بر قابلیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌های حاصل داشت به‌طوری‌که توانایی آنها در مهار رادیکال DPPH به ۴۱/۱۱

بیش از حد زمان هیدرولیز (بیش از ۱۸۰ دقیقه) را بر فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی قزل آلا گزارش دادند [۳۲]. همچنین مشابه با این نتایج کاوه و همکاران (۱۳۹۸) بیان کردند که افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده شنبلیله با آنزیم پانکراتین شد و افزایش بیشتر غلظت آنزیم باعث کاهش این قابلیت شد [۱۹].

پژوهش اندوپپتیداز بودند، بیشتر بودن فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین نسبت به پپسین می‌تواند حاکی از رهائش بیشتر پپتیدهایی با قابلیت مهار رادیکال محلول در چربی DPPH توسط تریپسین باشد. به‌طور کلی مطالعات مختلف نشان داده است که عوامل مختلفی بر قابلیت مهار رادیکال آزاد پروتئین هیدرولیز شده نقش دارد از جمله نوع پروتئاز، ترکیب آمینواسیدی و میزان درجه هیدرولیز [۲۳]. در تطابق با این نتایج اوئسی‌پور و همکاران (۲۰۰۹) نیز تاثیر منفی افزایش

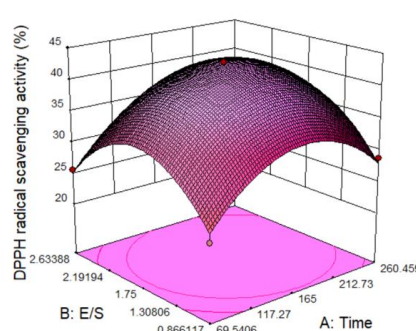
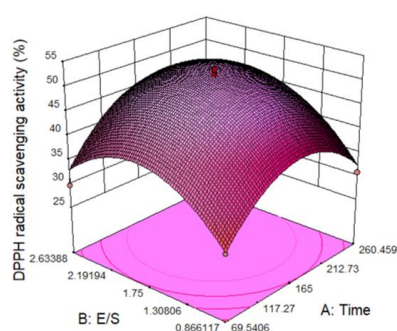


Figure 2- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

هیدرولیز شده حاصل از پپسین و تریپسین با پارامترهای واکنش رابطه‌ای از نوع درجه دوم داشتند و ضریب رگرسیون آنها به ترتیب عبارت بود از $R^2=0.8125$ و $R^2=0.8983$. فاکتور عدم برازش مدل تعریف شده برای هر دو هیدرولیز شده معنی‌دار نشد که از توانایی مناسب مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای فرآیند حکایت دارد. آنالیز واریانس نتایج نشان داد که رابطه‌ی قدرت احیاء کنندگی یون آهن و متغیرهای فرآیند در هیدرولیز با آنزیم‌های پپسین و تریپسین به‌صورت رابطه‌ی (۹) و (۱۰) می‌باشد.

(۹)

$$\text{قدرت احیاء کنندگی یون آهن} = +0.41 - 0.025 A + 0.045 B - 4.5 AB + 0.12 A^2 + 0.13 B^2$$

(۱۰)

$$\text{قدرت احیاء کنندگی یون آهن} = +0.46 - 0.079 A - 0.028 B - 2 AB - 0.10 A^2 - 0.12 B^2$$

۳-۴- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن

آزمون قدرت احیاء کنندگی یون آهن، جهت ارزیابی پتانسیل یک ترکیب آنتی اکسیدان در تبدیل یون Fe^{3+} به Fe^{2+} به کار می‌رود. نتایج تجزیه واریانس قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده در جدول ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج، متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از فعالیت هر ردو آنزیم پپسین و تریپسین تاثیر معنی‌داری داشتند و متغیر زمان تنها بر هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین تاثیر معنی‌دار داشت. سایر متغیرها بر قابلیت احیاء کنندگی هیچ یک پروتئین‌های هیدرولیز شده تاثیر معنی‌داری نداشتند ($p < 0.05$). قدرت احیاء کنندگی یون آهن هر دو

Table 4. ANOVA of Fe reducing power of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin			Hydrolysis with trypsin	
Model	0.16	5	0.0160	0.41
A-time	0.16	5	0.0467	0.46
B- E/S	0.050	1	0.2944	-0.025
AB	0.016	1	0.0494	-0.079
A ²	6.13	1	0.0906	0.045
B ²	8.1	1	0.4091	0.028
Lac of fit	1.6	1	0.8873	-4.5
	0.085	1	0.9651	-2
	0.057	1	0.0047	0.12
	0.096	1	0.0408	0.10
	0.081	1	0.0037	0.13
	0.018	3	0.0220	0.12
	0.038	3	0.0891	
			0.1130	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

افزایش بیشتر زمان تأثیری مثبت داشت به طوریکه اعث افزایش قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تریپسین تا ۰/۶۱۲ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) شد. در زمان‌های ثابت هیدرولیز با آنزیم تریپسین افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد باعث کاهش قدرت احیاء کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم باعث افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی تا ۰/۷۷۳ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) شد. به طور کلی بیشترین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن (۰/۷۸۵)، جذب در ۷۰۰ نانومتر) در هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین در زمان هیدرولیز ۷۱/۸۳ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۶۳ درصد حاصل شد. به طور کلی مطالعات نشان داده است که با گذشت زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز پروتئین‌ها ساختار، اندازه، ترکیب و توالی پپتیدهای زیست فعال حاصل دچار تغییر می‌شود که این امر تأثیر به سزایی بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن دارد [۱۴]. افزایش قدرت احیاء کنندگی

با توجه به شکل 3A، در زمان‌های ثابت هیدرولیز افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد، باعث کاهش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین شد اما با افزایش بیشتر غلظت آنزیم قدرت احیاء کنندگی افزایش یافت و به ۰/۷۰۵۵ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) رسید. از سوی دیگر در غلظت ثابت آنزیم پپسین، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه باعث کاهش قدرت احیاء کنندگی یون آهن شد و افزایش بیشتر زمان باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پپسین تا ۰/۵۸۱ (جذب در ۷۰۰ نانومتر) شد. به طور کلی بیشترین میزان قدرت احیاء کنندگی یون آهن (۰/۷۱۲)، جذب در ۷۰۰ نانومتر) در هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین در زمان هیدرولیز ۷۳/۲۱ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۶۰ درصد حاصل شد. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین (شکل 3B)، در مقادیر ثابت غلظت آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه باعث کاهش قدرت احیاء کنندگی یون آهن شد اما

پروتئین هیدرولیز شده در زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم مناسب می‌تواند به دلیل رهایش آمینواسیدهایی با قدرت احیاء کنندگی بالا همچون متیونین، تریپتوفان و لیزین مرتبط دانست. مطالعات نشان داده است که آنزیم پپسین ترجیحاً اتصالات مجاور آمینواسیدهای فنیل آلانین، تیروزین و تریپتوفان را می‌شکند، با شکسته شدن این پیوندهای پپتیدی و رهایش از ساختار اصلی پروتئین‌ها، وزن مولکولی آنها کم شده و سپس با پیشرفت فرایند تولید پپتیدهایی با توانایی اهداء الکترون برای احیاء یون آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی افزایش پیدا می‌کند در نتیجه منجر به افزایش

قدرت احیاء کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده می‌شود [۲۲]. این نتایج مشابه با یافته‌های خاتتافانت و همکاران (۲۰۱۱) و احمدی و همکاران (۱۳۹۹) در هیدرولیز پروتئین ماهیچه ماهی سرخو^۱ و امعاء و احشا ماهی کپور است [۳۴ و ۳۳]. همچنین مقصودلو و همکاران (۱۳۹۸) با هیدرولیز پروتئین گرده زنبور عسل با آنزیم پپسین گزارش کردند که هیدرولیز تا ۲/۵ ساعت باعث کاهش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل شد اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز باعث افزایش میزان خاصیت احیاء کنندگی شد [۳۵].

1-Brown stripe red snapper

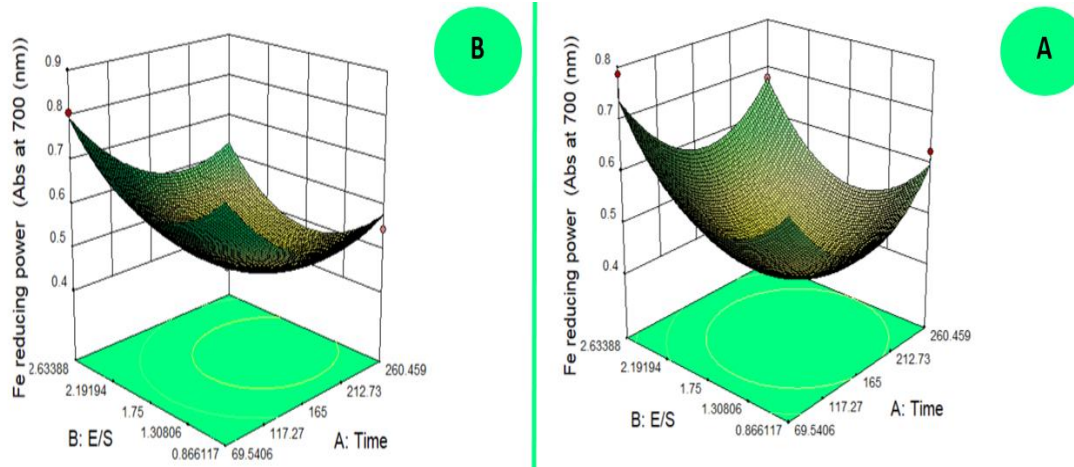


Figure 3- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on Fe reducing power of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

($p < 0.05$). پارامترهای واکنش با فعالیت شلاته‌کنندگی هر

دو هیدرولیز شده حاصل از پپسین و تریپسین رابطه‌ای درجه دوم و به‌ترتیب با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9407$ و $R^2 = 0.9291$ داشتند. معنی‌دار نشدن فاکتور عدم برازش نیز نشان‌دهنده توانایی بالای مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای فرآیند بر پاسخ مورد بررسی (شلاته‌کنندگی یون آهن) می‌باشد. با توجه به نتایج آنالیز واریانس رابطه‌ی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و متغیرهای فرآیند هیدرولیز با آنزیم‌های پپسین و تریپسین به‌صورت رابطه‌ی (۱۱) و (۱۲) می‌باشد.

(۱۱)

$$\text{فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن} = +35.71 - 2.44 A - 0.61 B + 2.64 AB - 1.10 A^2 + 4.26 B^2$$

(۱۲)

$$\text{فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن} = +40.38 + 0.72 A + 5.01 B - 0.36 AB - 4.80 A^2 + 1.55 B^2$$

۳-۵- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

در واکنش‌های اکسیداسیون یون Fe^{2+} به‌عنوان کاتالیزور فعالیت می‌کند که منجر به تبدیل سریع آنیون سوپراکسید به رادیکال‌های هیدروکسیل می‌گردد. رادیکال‌های هیدروکسیل تولیدی با مولکول‌های زیستی مجاور واکنش داده و باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌ها و بروز بیماری‌های خطرناک چون سرطان می‌شوند [۳۶]. نتایج تجزیه واریانس هیدرولیز با آنزیم‌های پپسین و تریپسین در جدول ۵ ذکر شده است؛ با توجه به این نتایج متغیرهای زمان، AB و B^2 بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین و متغیرهای غلظت آنزیم و A^2 بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تریپسین تاثیر معنی‌داری داشتند و سایر متغیرها تاثیر معنی‌داری نداشتند

Table 5. ANOVA of Fe chelating activity of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin				
Model	215.06	5	0.0044	35.71
	390.36	5	0.0067	40.38
A-time	47.64	1	0.0086	-2.44
	4.19	1	0.4398	0.72
B- E/S	2.96	1	0.3437	-0.61
	201.01	1	0.0021	5.01
AB	27.93	1	0.0238	2.64
	0.51	1	0.7814	-0.36
A²	6.78	1	0.1746	-1.10
	130.35	1	0.0055	-4.80
B²	102.43	1	0.001	4.26
	13.58	1	0.1916	1.55
Lac of fit	11.98	3	0.1697	
	29.61	3	0.0980	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

با افزایش بیشتر زمان کاهش یافت. به طور کلی بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۴۶/۳۳ درصد) با هیدرولیز با تریپسین در زمان هیدرولیز ۱۵۴/۶۸ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۵۷ درصد حاصل شد. تاثیر منفی افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن با احتمالاً به دلیل کاهش کارایی آنزیم در تولید پپتیدهایی با قابلیت آنتی اکسیدانی مناسب به دلیل رهاش ترکیبات بازدارنده آنزیم در طول هیدرولیز طولانی است؛ همچنین هیدرولیز و تجزیه پپتیدهایی با خاصیت مناسب شلاته‌کنندگی یون آهن تولید شده در اوایل فرآیند هیدرولیز می‌تواند دلیل دیگری بر تاثیر منفی هیدرولیز طی زمان‌های طولانی بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن باشد [۳۲]. تاثیر مثبت افزایش غلظت آنزیم بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به دلیل افزایش میزان جایگاه‌های فعال آنزیم موجود در محیط برای

با توجه به شکل 4A در زمان‌های ثابت هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین کاهش یافت افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر معنی‌داری بر آن نداشت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش زمان هیدرولیز روند کاهشی داشت. به-طور کلی با توجه به نمودار، در هیدرولیز با آنزیم پپسین بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۴۴/۱۵ درصد) در زمان هیدرولیز ۷۲/۳۱۶۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۰/۸۹ درصد حاصل شد. در هیدرولیز با آنزیم تریپسین (شکل 4B)، در زمان‌های ثابت با افزایش غلظت آنزیم فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین افزایش و

هیدرولیز پروتئین و در نتیجه شکستن بیشتر پیوندهای پپتیدی و افزایش حلالیت پپتیدهای تولیدی باشد که تاثیر مثبتی بر فعالیت شلاته‌کنندگی پپتیدهای حاصل دارند [۳۷]. به‌طور کلی مطالعات نشان داده است که عوامل زیادی بر فعالیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده تاثیر دارند که مهمترین این عوامل عبارتند از: ماهیت و ترکیب آمینواسیدی پروتئین اولیه، نوع آنزیم پروتئاز و میزان درجه هیدرولیز [۳۸]. این نتایج مشابه یافته‌های کاوه و همکاران

(۲۰۲۲) در هیدرولیز پروتئین دانه شنبلیله با آنزیم پپسین و تریپسین بود که گزارش کردند افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های تولیدی شد اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر معنی‌داری بر خاصیت شلاته‌کنندگی نداشت [۷]. همچنین این نتایج در تطابق با یافته‌های کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷)، بایرام و همکاران (۲۰۰۸) و جامدار و همکاران (۲۰۱۰) به ترتیب در هیدرولیز پروتئین ماهی دم زرد^۱، پروتئین آب پنیر و بادام زمینی می‌باشد [۳۹-۴۱].

1 -yellow stripe trevally

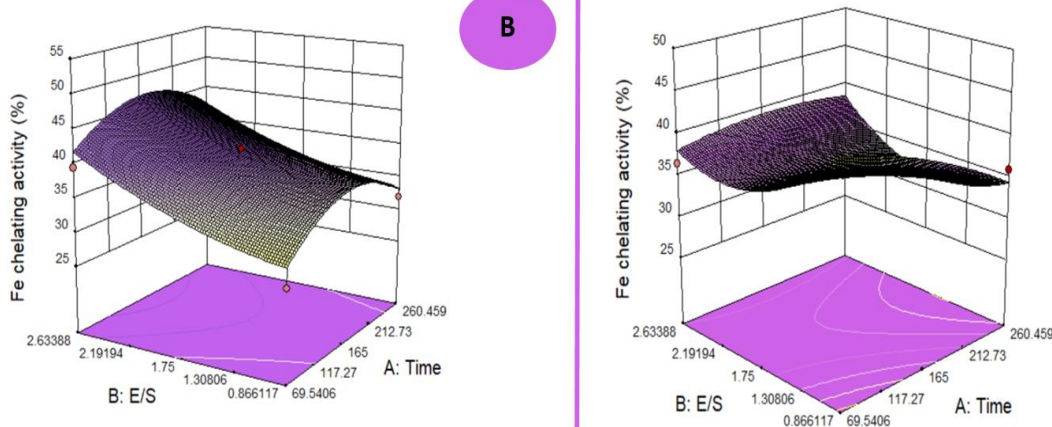


Figure 4- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on Fe chelating activity of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

ندادند ($p < 0.05$). پارامترهای واکنش با ظرفیت آنتی-اکسیدانی کل هر دو هیدرولیز شده‌های حاصل از پپسین و تریپسین رابطه‌ای درجه دوم به ترتیب با ضریب رگرسیون آنها $R^2 = 0.8557$ و $R^2 = 0.8844$ داشتند. عدم معنی دار بودن شاخص عدم برازش نیز نشان از توانایی بالای مدل در پیش‌بینی دامنه‌ی مقادیر مورد بررسی داشت. رابطه‌ی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل با متغیرهای مورد بررسی در هیدرولیز با پپسین و تریپسین به ترتیب از رابطه‌ی (۱۳) و (۱۴) پیروی می‌کند.

(۱۳)

$$\text{ظرفیت آنتی اکسیدانی کل} = +0.53 - 0.015 A + 0.012 B + 0.014 AB - 0.016 A^2 - 0.031 B^2$$

(۱۴)

$$\text{ظرفیت آنتی اکسیدانی کل} = +0.64 - 0.021 A + 0.016 B + 0.028 AB - 0.033 A^2 - 0.023 B^2$$

۳-۶- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز

بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

آزمون ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، قدرت ضد اکسایشی کل یک ترکیب را که شامل قدرت ضد اکسایشی هر دو نوع ترکیبات محلول در چربی و آب را ارزیابی می‌کند. این روش بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که باعث تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی می‌شود [۴۲]. نتایج تجزیه واریانس ظرفیت ضد اکسایشی کل در جدول ۶ ذکر شده است. در هیدرولیز با آنزیم پپسین تنها متغیر غلظت آنزیم و در مورد تریپسین تنها متغیر A^2 دارای تاثیر معنی‌داری بر ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های تولیدی بودند. سایر متغیرهای مورد بررسی تاثیر معنی‌داری از خود نشان

Table 6. ANOVA of total antioxidant activity of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin				
Model	9.28	5	0.0358	0.53
	0.016	5	0.0412	0.64
A-time	1.85	1	0.2892	-0.015
	3.47	1	0.1103	-0.021
B- E/S	1.08	1	0.0462	0.012
	2.10	1	0.1918	0.016
AB	7.29	1	0.4909	0.014
	3.25	1	0.1197	0.028
A²	1.4	1	0.3503	-0.016
	6.09	1	0.0403	-0.033
B²	5.3	1	0.1006	-0.031
	2.94	1	0.1344	-0.023
Lac of fit	6.56	3	0.9510	
	29.61	3	0.0678	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت تریپسین نداشت. این یافته تاییدی بر داده‌های نشان داده شده در جدول ۶ است که حاکی از عدم معنی دار بودن غلظت آنزیم بر ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تریپسین داشت. بیشترین ظرفیت ضداکسایشی کل (۰/۶۳۵ جذب در ۶۹۵ نانومتر) در هیدرولیز با آنزیم تریپسین در زمان هیدرولیز ۱۶۶/۷۵۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۳۹ درصد حاصل شد. بنابراین با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که آنزیم‌های پپسین و تریپسین با هیدرولیز پیوندهای پپتیدی موجود در پروتئین امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی باعث رهایش پپتیدهای الکترون‌دهنده شده‌اند که این پپتیدها قابلیت مناسبی در تبدیل رادیکال‌های آزاد به ترکیباتی پایدار داشته‌اند که در نهایت باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده تولیدی شده‌اند. از سوی دیگر افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز و یا غلظت آنزیم باعث افزایش نامناسب هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت الکترون دهنده‌گی شده است که در نتیجه ظرفیت آنتی

با توجه به شکل 5A، در مقادیر ثابت غلظت آنزیم با افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم پپسین تا ۱۶۵ دقیقه، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل تغییر معنی‌داری نداشت. اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد؛ به‌طوریکه پس از ۲۶۰ دقیقه هیدرولیز از ۰/۵۱ به ۰/۴۵ (جذب در ۶۹۵ نانومتر) کاهش یافت. از سوی دیگر در مقادیر ثابت زمان هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد باعث افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر منفی داشت. به‌طور کلی با توجه به نمودار بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر، ۰/۵۳۱) در هیدرولیز با پپسین در زمان ۹۶/۸۱ دقیقه، غلظت آنزیم ۱/۶۸ درصد حاصل شد. از سوی دیگر همانطور که در شکل 5B، مشاهده می‌شود افزایش زمان هیدرولیز در تمامی‌های غلظت‌های ثابت آنزیم باعث کاهش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هیدرولیز شده‌های حاصل شد. از سوی دیگر در زمان‌های ثابت هیدرولیز تغییرات غلظت آنزیم تاثیر معنی‌داری بر ظرفیت آنتی

شنبلیله و دانه خربزه ترکمنی بود. آنها گزارش کردند که افزایش بیش از حد زمان و غلظت آنزیم تاثیری منفی بر ظرفیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز شده‌های تولیدی داشت [۴۳ و ۲۲، ۷].

اکسیدانی کل کاهش یافته است. به طور کلی تریپسین عملکرد بهتری در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان از خود نشان داد. این نتایج مشابه با یافته‌های مظلومی و همکاران (۱۳۹۸)، کاوه و همکاران (۲۰۲۲) و الوند و همکاران (۱۴۰۲) به ترتیب در هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال، دانه

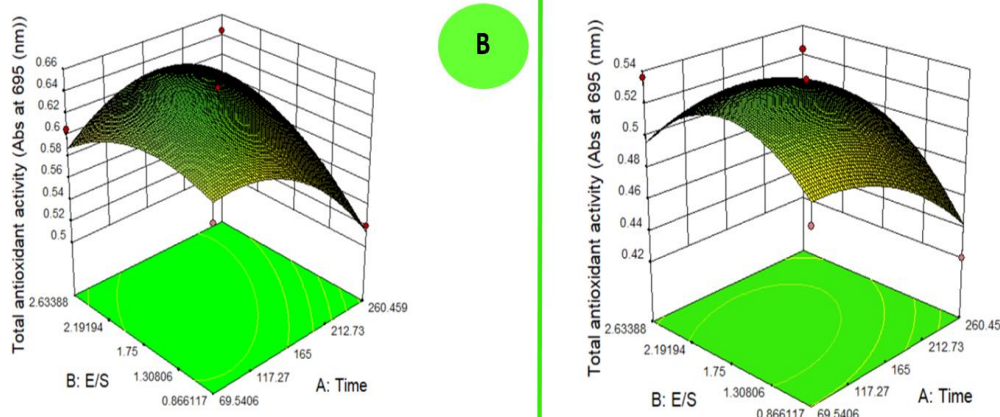


Figure 5- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on total antioxidant activity of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

($p < 0.05$). فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های تولیدی حاصل از پپسین و تریپسین با پارامترهای واکنش از نوع درجه دوم و به ترتیب با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9121$ و $R^2 = 0.8570$ بود. بالا بودن ضریب رگرسیون و معنی دار نشدن فاکتور عدم برازش نشان‌دهنده‌ی توانایی مناسب مدل جهت پیش‌بینی تاثیر متغیرهای فرآیند بر پاسخ مورد نظر می‌باشد. فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید و متغیرهای فرآیند هیدرولیز با پپسین و تریپسین به- ترتیب از رابطه‌ی (۱۵) و (۱۶) پیروی می‌کند.

(۱۵)

$$+53.52 + 3.23 A + 8.34 B + 11.23 AB - 15.27 A^2 - 9.48 B^2 = \text{فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید}$$

(۱۶)

$$+64.86 + 9.46 A + 8.28 B + 6.23 AB - 19.19 A^2 - 17.90 B^2 = \text{فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید}$$

۷-۳- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید

رادیکال آزاد نیتریک اکسید از طریق اکسیداسیون آرژنین به سیترولین توسط آنزیم نیتریک اکسید-سنتتاز تولید می‌شود [۴۴]. مطالعات نشان داده است که رادیکال آزاد نیتریک اکسید در واکنش نیتروژن با گونه‌های فعال اکسیژن تولید شده و باعث بیماری‌های خطرناکی همچون پوکی استخوان، دیابت، سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود [۴۵]. نتایج تجزیه واریانس ذکر شده در جدول ۷، تمام متغیرهای مورد بررسی به جز زمان هیدرولیز تاثیر معنی‌داری بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید پروتئین هیدرولیز شده حاصل از فعالیت پپسین داشتند. از سوی دیگر تنها تاثیر متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین معنی‌دار بود

Table 7. ANOVA of NO radical scavenging activity of protein hydrolysate with pepsin and trypsin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with pepsin			Hydrolysis with trypsin	
Model	2615.75	5	0.0113	53.52
	4426.90	5	0.0358	64.86
A-time	83.55	1	0.2543	3.23
	715.40	1	0.0791	9.46
B- E/S	556.18	1	0.0210	8.34
	548.12	1	0.1121	8.28
AB	504.68	1	0.0250	11.23
	155.38	1	0.3522	6.23
A ²	1317.46	1	0.0037	-15.27
	2079.745	1	0.0133	-19.19
B ²	507.68	1	0.0247	-9.48
	1809.04	1	0.0173	-17.90
Lac of fit	251.03	3	0.0691	
	738.13	3	0.0615	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید شد و با افزایش بیشتر غلظت آنزیم این قابلیت کاهش یافت. به طور کلی با توجه به نمودار بیشترین فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید (۴۶/۵ درصد) حاصل از فعالیت آنزیم تریپسین در غلظت آنزیم ۱/۹۴ درصد و زمان هیدرولیز ۲۰۰/۰۳۷ دقیقه حاصل شد. افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید با افزایش مناسب زمان هیدرولیز می‌تواند به دلیل افزایش هیدرولیز و در نتیجه خاصیت آبدوستی بیشتر پپتیدهای تولیدی باشد که مشخص شده است توانایی بیشتری در مهار رادیکال نیتریک اکسید دارند. به طور کلی فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید پروتئین‌های هیدرولیز شده به عوامل مختلفی از جمله ترکیب آمینواسیدی، میزان درجه هیدرولیز، نوع آنزیم به کار رفته در فرآیند هیدرولیز و شرایط هیدرولیز بستگی دارد [۴۶]. مشابه با یافته‌های این پژوهش شریعت علوی و همکاران (۱۳۹۷) با هیدرولیز پروتئین دانه گوجه فرنگی با آنزیم آلکالاز بیان کردند که با افزایش مناسب زمان هیدرولیز فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت اما افزایش

با توجه به شکل 6A، در زمان‌های ثابت هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های پیپسین شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم از توانایی مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های حاصل کاست. از سوی دیگر در غلظت ثابت آنزیم پیپسین، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه تاثیر مثبت و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر منفی بر قابلیت مهار رادیکال نیتریک اکسید داشت. به طور کلی بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید (۵۶/۷۲ درصد) هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت پیپسین در زمان هیدرولیز ۱۹۶/۵۴ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۲۶ درصد حاصل شد. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از تریپسین همانطور که در شکل 6B نشان داده شده است، در غلظت‌های ثابت آنزیم، با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۶۵ دقیقه، فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های تولیدی افزایش یافت و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر منفی بر این قابلیت داشت. از سوی دیگر در زمان‌های ثابت هیدرولیز با تریپسین افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۷۵ درصد

خاصیت آبدوستی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی بر میزان فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید آنها تاثیر مثبتی دارد [۴۶].

غلظت آنزیم تاثیری منفی بر این قابلیت داشت [۴۷]. همچنین در تطابق با این یافته‌ها صادقی ماهونک و کاوه (۱۴۰۱) با هیدرولیز پروتئین کنجاله کدو گزارش کردند که

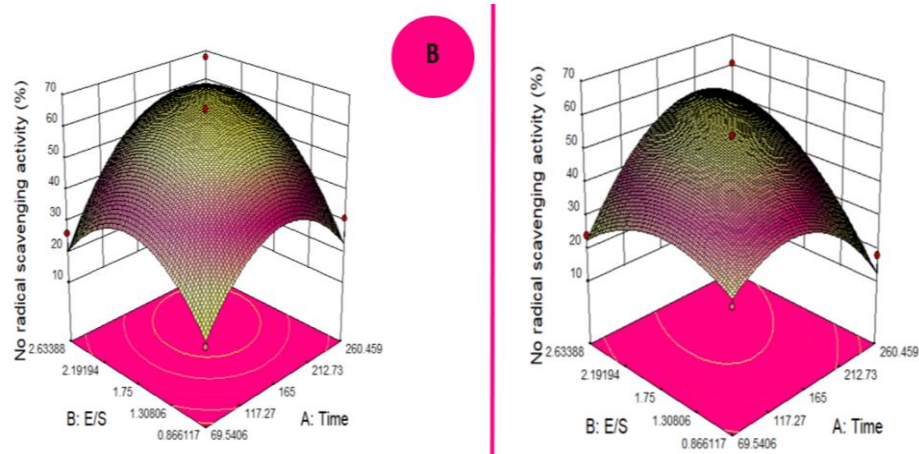


Figure 6- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on NO radical scavenging activity of protein hydrolysate of skipjack viscera (A: hydrolysis with pepsin, B: hydrolysis with trypsin)

تحت این شرایط انجام شد. فعالیت مهار رادیکال DPPH، ظرفیت ضد اکسایشی کل، مهار رادیکال نیتریک اکسید، احیاء کنندگی یون آهن و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن با آنزیم پپسین به ترتیب ۳۴/۲۵ درصد، ۵۸/۴۰ جذب در ۶۹۵ نانومتر، ۵۰/۲۴ درصد، ۶۳/۵۰ جذب در ۷۰۰ نانومتر و ۴۲/۵۱ درصد و با آنزیم تریپسین به ترتیب ۵۲/۳۵ درصد، ۵۸/۴۰ جذب در ۶۹۵ نانومتر، ۶۰/۳۵ درصد، ۵۲/۳۰ جذب در ۷۰۰ نانومتر و ۴۲/۴۷ درصد محاسبه شد. درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت تریپسین نیز بیشتر از پپسین و به ترتیب به میزان ۱۹/۲۵ درصد و ۱۵/۱۸ درصد به دست آمد. این نتایج حاکی از توانایی بسیار خوب مدل مورد بررسی جهت پیش‌بینی تاثیر متغیرهای زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم بر فرآیند هیدرولیز با آنزیم پپسین و تریپسین می‌باشد.

۴- نتیجه گیری

در این پژوهش تاثیر شرایط هیدرولیز (زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم) و نوع پروتئاز بر ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و

۳-۸- انتخاب تیمار بهینه و اعتبار سنجی مدل

پس از تجزیه و تحلیل داده‌ها، نرم افزار پیش بینی کرد که بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH (۳۵/۴۷ درصد)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۵۰/۹۰ جذب در ۶۹۵ نانومتر)، مهار رادیکال نیتریک اکسید (۵۴/۱۸ درصد)، احیاء کنندگی یون آهن (۵۸/۴۰ جذب در ۷۰۰ نانومتر) و شلاته کنندگی یون آهن (۳۹/۳۷ درصد) با آنزیم پپسین در زمان هیدرولیز ۱۷۹/۰۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۶۳ درصد حاصل می‌شود. از سوی دیگر بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH (۵۰/۷۱ درصد)، ظرفیت آنتی اکسیدانی کل (۶۴/۰۰ جذب در ۶۹۵ نانومتر)، مهار رادیکال نیتریک اکسید (۶۰/۳۲ درصد)، احیاء کنندگی یون آهن (۴۹/۰۰ جذب در ۷۰۰ نانومتر) و شلاته کنندگی یون آهن (۴۱/۱۵ درصد) با آنزیم تریپسین در زمان هیدرولیز ۱۴۳/۶۲ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۴ درصد حاصل شد. در این شرایط نرم افزار پیش‌بینی کرد که میزان درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت تریپسین بیشتر از پپسین و به ترتیب ۱۷/۳۹ و ۱۵/۹۳ درصد خواهد بود. جهت ارزیابی اعتبار مدل، هیدرولیز

حاصل از آنزیم تریپسین در زمان هیدرولیز ۱۴۳/۶۲ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۴ درصد، پتانسیل آنتی اکسیدانی بسیار مناسبی دارد که می‌تواند پس از انجام بررسی‌های بالینی و ارزیابی سمیت آن با ترکیبات آنتی اکسیدان سنتزی که کاربرد گسترده‌ای در صنایع غذایی دارند، رقابت کرده و به‌عنوان یک ترکیب با ارزش افزوده بالا در فرمولاسیون‌های غذایی جهت تولید محصولات فراسودمند و مکمل‌های غذایی ورزشکاران و افراد سالمند به کار رود.

۵- منابع

- [1] Hotamisligil, G.S. and Erbay, E., 2008. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. *Nature Reviews Immunology*, 8(12), pp.923-934.
- [2] Llanas-Cornejo, D. and Husi, H., 2017. CVD and Oxidative Stress. *Journal of Clinical Medicine*, 6(2), pp.E22-E22.
- [3] Lammi, C., Aiello, G., Boschini, G. and Arnoldi, A., 2019. Multifunctional peptides for the prevention of cardiovascular disease: A new concept in the area of bioactive food-derived peptides. *Journal of Functional Foods*, 55, pp.135-145.
- [4] Kraus, A., 2015. Development of functional food with the participation of the consumer. Motivators for consumption of functional products. *International Journal of Consumer Studies*, 39(1), pp.2-11.
- [5] Lorenzo, J.M., Munekata, P.E., Gomez, B., Barba, F.J., Mora, L., Perez-Santaescolastica, C. and Toldra, F., 2018. Bioactive peptides as natural antioxidants in food products—A review. *Trends in food science & technology*, 79, pp.136-147.
- [6] Yang, X.R., Zhao, Y.Q., Qiu, Y.T., Chi, C.F. and Wang, B., 2019. Preparation and characterization of gelatin and antioxidant peptides from gelatin hydrolysate of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) bone stimulated by in vitro gastrointestinal digestion. *Marine drugs*, 17(2), p.78.
- [7] Kaveh, S., Mahoonak, A.S., Ghorbani, M. and Jafari, S.M., 2022. Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes:

احشا ماهی هوور مسقطی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی سرشار از پپتیدهای آنتی اکسیدان است که با هیدرولیز در شرایط مناسب و با استفاده از آنزیم‌های پپسین و تریپسین می‌توان آنها را رها ساخت. ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی تحت تاثیر نوع آنزیم، زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم بود. مقایسه فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از فعالیت پپسین و تریپسین نشان داد که هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت تریپسین نسبت به پپسین از قابلیت آنتی اکسیدانی بیشتری برخوردار بودند. به‌طور کلی با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی

Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 182, p.114908.

[8] Du, X., Jing, H., Wang, L., Huang, X., Wang, X. and Wang, H., 2022. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT*, 159, p.113257

[9] Fadimu, G.J., Farahnaky, A., Gill, H. and Truong, T., 2022. Influence of ultrasonic pretreatment on structural properties and biological activities of lupin protein hydrolysate. *International Journal of Food Science & Technology*, 57(3), pp.1729-1738.

[10] Lafarga, T. and Hayes, M., 2014. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation, functionality and application as functional ingredients. *Meat science*, 98(2), pp.227-239.

[11] Rustad, T., 2003. Utilisation of marine by-products. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2(4), pp.458-463.

[12] Szymczak, M., 2017. Recovery of cathepsins from marinating brine waste. *International Journal of Food Science & Technology*, 52(1), pp.154-160.

[13] He, S., Franco, C. and Zhang, W., 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), pp.289-297.

- [14] Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. and Nasri, M., 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food chemistry*, 118(3), pp.559-565.
- [15] Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M. and Bougatef, A., 2013. Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 22(5), pp.436-448.
- [16] Chi, C.F., Wang, B., Wang, Y.M., Zhang, B. and Deng, S.G., 2015. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of functional foods*, 12, pp.1-10.
- [17] Chotikachinda, R., Tantikitti, C., Benjakul, S., Rustad, T. and Kumarnsit, E., 2013. Production of protein hydrolysates from skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) viscera as feeding attractants for A sian seabass (*Lates calcarifer*). *Aquaculture Nutrition*, 19(5), pp.773-784.
- [18] Nurdyayana, H., Mazlina, M.K.S. and Fadhilah, M.S.N., 2008. Optimization of protein extraction from freeze dried fish waste using response surface methodology (RSM). *International Journal of Engineering and Technology*, 5(1), pp.48-56.
- [19] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M. and Sarabandi, K., 2019. Optimization of factors affecting the antioxidant activity of fenugreek seed's protein hydrolysate by response surface methodology. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 14(1).
- [20] Horwitz, W., 1975. *Official methods of analysis* (Vol. 222). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- [21] Kruger, N.J., 2009. The Bradford method for protein quantitation. *The protein protocols handbook*, pp.17-24.
- [22] Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri tabarestani, H., Kaveh, S., 2023. Effect of enzyme type and hydrolysis time on antioxidant properties of hydrolyzed turkmen melon seed protein. *Journal of Innovation in Food Science and Technology (Iran)*, 15(3), pp. 99-112.
- [23] Kaveh, S., Sadeghi, M.A., Ghorbani, M., Jafari, M., Sarabandi, K., 2019. Optimization of production of antioxidant peptides using enzymatic hydrolysis of fenugreek seed. *Journal of Food Science and Technology*, 15 (84), pp. 75-88.
- [24] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A. and Sarabandi, K., 2020. The Effect of Solvent Type, Time and Extraction Method on the Chemical Compositions and Antioxidant Activity of Eggplant Peel Extract. *Karafan Quarterly Scientific Journal*, 17(2), pp.135-150.
- [25] Tsai, P.J., Tsai, T.H., Yu, C.H. and Ho, S.C., 2007. Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food chemistry*, 103(1), pp.181-187.
- [26] Richardson, T., and Hyslop, D.B. 1985. Enzymes. Ch. 6 in Food Chemistry, O.R. Fennema (Ed.), p. 371-476. Marcel Dekker, Inc., New York.
- [27] Guérard, F., Guimas, L. and Binet, A.J.J.O.M.C.B.E., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 19, pp.489-498.
- [28] Sherafat, N., Motamedzadegan, A. and Safari, R., 2013. The effect of hydrolyzing time on cooked tuna fish (Skipjack tuna) wastes by alcalase on protein recovery and the hydrolysate molecular weight. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5(3).
- [29] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B., 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 10(2), pp.235-240.
- [30] Kaveh, S., Sadeghi, M. A., Ghorbani, M., Jafari, S. M., & Sarabandi, K. 2020. Antioxidant Properties of Fenugreek Bioactive Peptides Prepared with Pancreatin Enzyme. *Food Engineering Research*, 18(2), pp.103-122.
- [31] Alvand, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Shahiri Tabarestani, H. and Kaveh, S., 2022. Comparison of the Antioxidant Properties of Hydrolyzed Turkmen Melon Seed Protein by Pancreatin and Alcalase. *Food Engineering Research*, 21(2), pp.75-90.
- [32] Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115(1), pp.238-242.
- [33] Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R., 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper

(Lutjanus vitta). *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), pp.1139-1148.

[34] Ahmadi, H., Yeganeh, S. and Esmaeili Kharyeki, M., 2020. Investigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Journal of Fisheries*, 73(4), pp.593-606.

[35] Maqsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M. and Toldra, F., 2018. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Bee Pollen Protein by Pepsin Based on Antioxidant and ACE Inhibitory Activity and Comparison with Those of Royal Jelly. *Research and Innovation in Food Science and Technology*, 7(1), pp.49-64.

[36] Oche, J.R.I., Johnson, T.O., Akinsanmi, A.O., Jaryum, K.H. and Francis, T., 2019. In vitro antioxidant activity and inhibition of Fe²⁺ and SNP lipid peroxidation of African Mistletoes (*Tapinanthus globiferus*) from three selected host plants in Jos Plateau State Nigeria. *Journal of Applied Life Sciences International*, 20(4), pp.1-10.

[37] Kurozawa, L.E., Park, K.J. and Hubinger, M.D., 2008. Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 73(5), pp.C405-C412.

[38] Pihlanto, A., 2006. Antioxidative peptides derived from milk proteins. *International dairy journal*, 16(11), pp.1306-1314.

[39] Maqsoudlou, A., Sadeghi Mahoonak, A. R., Mohebodini, H. 2018. Evaluation of the antioxidant properties Hydrolyzed protein of bee pollen. *Journal of food science and technology*, 73(14), pp. 227-240.

[40] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, 102(4), pp.1317-1327.

[41] Bayram, T., Pekmez, M., Arda, N. and Yalçın, A.S., 2008. Antioxidant activity of whey protein fractions isolated by gel exclusion chromatography and protease treatment. *Talanta*, 75(3), pp.705-709.

[42] Arabshahi-Delouee, S. and Urooj, A., 2007. Antioxidant properties of various solvent extracts of mulberry (*Morus indica* L.) leaves. *Food chemistry*, 102(4), pp.1233-1240.

[43] Mazloomi, S.N., Sadeghi Mahoonak, A. and Houshmand, G., 2019. Determination of optimum conditions for production of

antioxidant Peptides derived from hydrolysis of orange seed protein with alkalase enzyme. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(88), pp.343-356.

[44] Amiri, S., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M. and Alizadeh, M., 2019. Development of the antioxidant activity in cheese whey and milk permeate using *Lactobacillus acidophilus* LA5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12. *Journal of food science and technology (Iran)*, 16(91), pp.65-79.

[45] Ahn, C.B., Je, J.Y. and Cho, Y.S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49(1), pp.92-98.

[46] Sadeghi Mahoonak, A.R. and Kaveh, S., 2022. Assessment of ACE-inhibitory and Antioxidant Activities of the Peptide Fragments from Pumpkin Seeds. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 17(3), pp.45-56.

[47] Shariat alavi, M., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Alami, M., Mohammadzadeh, J., 2019. Determination of Optimum Conditions for Production of Hydrolyzed Protein with Antioxidant Capability and Decrease of Nitric Oxide from Tomato Wastes by Alcalas. *Journal of food science and technology (Iran)*, 15 (84), pp.137-151 Life Test Method Based On Physical and Antioxidant Analysis". In *E3S Web of Conferences*, 147.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Evaluation the antioxidant properties of purified bioactive peptides from the wastes of skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) processing, by pepsin and trypsin digestive enzymes

Shima kaveh¹, Alireza Sadeghi Mahoonak^{2*}, Vahid Erfanimoghadam^{3,4}, Mohammad Ghorbani⁵, Aliakbar Gholamhosseinpour⁶, Mojtaba Reisi⁷

1 Ph.D. candidate of food chemistry, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

2* Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

3 Assistant Professor, Food, Drug and Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

4 Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, School of Advanced Technologies in Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

5 Associate Professor, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.

6 Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Jahrom University, Jahrom, Iran.

7 Associate Professor, Food, Drug and Natural Products Health Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

ABSTRACT

In fish processing industries, 50-70% of primary fish are produced as waste, while they are rich sources of protein and essential amino acids. The optimal use of these wastes and the production of compounds with high added value that have significant health-giving properties is one of the important challenges of fish processing industries. In this research, the effect of hydrolysis conditions (time: 30-300 minutes and enzyme concentration 0.5-3%) and type of protease (pepsin and trypsin) on the degree of hydrolysis and antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, Fe chelating activity, No radical scavenging activity, total antioxidant capacity and Fe reducing power) of hydrolyzed protein obtained from Skipjack viscera were evaluated using response surface methodology. The results showed that the optimal conditions for the production of hydrolyzed protein with the maximum antioxidant properties with pepsin and trypsin enzymes were respectively: hydrolysis time of 179.09 and 143.62 minutes and enzyme concentration of 2.63 and 1.94 %; In this condition, the degree of hydrolysis of the hydrolyzed proteins resulting from the activity of trypsin was calculated to be higher than that of pepsin. Comparing the antioxidant properties of the hydrolysates obtained from the two enzymes used showed that the hydrolyzed protein obtained from trypsin had a stronger antioxidant potential than pepsin. Therefore, it can be stated that the hydrolyzed protein of the Skipjack viscera using trypsin enzyme as a health-giving supplement and with high added value can be used in the production of functional food products and health supplements for athletes and elderly people.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/4/19

Accepted: 2023/5/28

Keywords:

Antioxidant,
pepsin,
bioactive peptides,
trypsin,
Skipjack

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.200
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.141.13.1

*Corresponding Author E-Mail:
Sadeghiaz@yahoo.com