



بهینه سازی شرایط هیدرولیز و نوع پروتئاز بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) با استفاده از روش سطح پاسخ

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

۱- دانش آموخته 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 فرآورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

۴- استادیار گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های 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 فرآورده‌های غذایی، دارویی و طبیعی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۱/۲۰

کلمات کلیدی:

آنتی اکسیدان،

آلکالاز،

پانکراتین،

پروتئین هیدرولیز شده،

هوور مسقطی

DOI: 10.22034/FSCT.20.144. 131

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.144.8.2

* مسئول مکاتبات:

Sadeghiaz@yahoo.com

اکسیداسیون در اندام‌های زنده باعث بیماری‌های خطرناکی از جمله سرطان و در مواد غذایی باعث فساد و ضررهای اقتصادی سنگین می‌گردد. آنتی اکسیدان‌های سنتزی عوارض نامطلوب و خطرناکی بر سلامتی انسان دارند، از این رو شناسایی ترکیبات ضداکسایشی طبیعی از نیازهای اصلی صنعت مواد غذایی است. در صنایع فرآوری ماهی‌ها حدود ۵۰-۷۰٪ ماهی اولیه که منابع بالقوه‌ای از ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای مانند آمینو اسیدهای ضروری هستند به‌عنوان ضایعات تولید می‌شود. بنابراین یافتن راهی جهت استفاده‌ی بهینه از این ضایعات و تولید ترکیبات سلامتی‌بخش با ارزش افزوده‌ی بالا مانند پپتیدهای زیست فعال از اهمیت زیادی برخوردار است. در این پژوهش به بررسی تاثیر شرایط هیدرولیز (زمان: ۳۰-۳۰۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۳-۵ درصد) و نوع پروتئاز (آلکالاز و پانکراتین) بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های ضداکسایشی (مهار رادیکال DPPH، شلاته کنندگی یون آهن، مهار رادیکال نیتریک اکسید، ظرفیت ضداکسایشی کل و احیاء کنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی با استفاده از روش سطح پاسخ پرداخته شد. نتایج نشان داد که شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین ویژگی‌های ضداکسایشی با آلکالاز و پانکراتین به ترتیب عبارت بودند از: زمان هیدرولیز ۱۴۶/۹ و ۱۷۱/۶۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۴ و ۲/۱۷ درصد؛ در این شرایط درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی تولیدی ۲۵/۱۲ درصد و ۲۰/۳۵ درصد محاسبه شد. مقایسه ویژگی‌های ضداکسایشی هیدرولیز شده‌های تولیدی با هردو پروتئاز نشان داد که آنزیم آلکالاز منجر به تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص ضداکسایشی قوی‌تری نسبت به پانکراتین شد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که پروتئین هیدرولیز شده امعاء احشا ماهی هوور مسقطی با استفاده از آنزیم آلکالاز به‌عنوان یک محصول سلامتی بخش و با ارزش افزوده قابلیت کاربرد در تولید محصولات غذایی فراسودمند و مکمل‌های سلامتی بخش استفاده نمود.

۱- مقدمه

رادیکال‌های آزاد نقش اساسی در اکسیداسیون لیپیدها و تجزیه اسیدهای چرب غیر اشباع دارند که منجر به وقوع رنسیدیتی و کاهش عمر انبارمانی بسیاری از مواد غذایی می‌گردند (۱). از سوی دیگر رادیکال‌های آزاد باعث تغییر در DNA، پروتئین و دیگر مولکول‌های درون سلولی می‌شوند که در نتیجه منجر به بروز بیماری‌های خطرناکی همچون، بیماری‌های قلبی-عروقی، اختلالات سیستم عصبی، دیابت و حتی آلزایمر می‌گردند. بنابراین جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد و وقوع اکسیداسیون در بدن و مواد غذایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در حال حاضر برخی از ترکیبات ضد اکسایشی سنتزی مانند ¹BHT و ²BHA و ³PG به‌طور معمول جهت مقابله با رادیکال‌های آزاد در مواد غذایی و سیستم‌های بیولوژیکی استفاده می‌شوند؛ اما به‌دلیل پتانسیل بیماری‌زایی آنها کاربرد این ترکیبات در صنایع غذایی با محدودیت رو به رو است (۲). این مساله باعث افزایش توجه به شناسایی ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی همچون پتیدهای زیست فعال شده است (۳). مصرف آنتی اکسیدان‌های طبیعی با افزایش پتانسیل ضد اکسایشی بدن باعث افزایش سطح سلامتی انسان می‌گردد (۴). همچنین این ترکیبات منجر به تاخیر اکسیداسیون لیپیدی در مواد غذایی می‌شوند که علاوه بر بهبود کیفیت تغذیه‌ای محصولات غذایی به پایداری، رنگ، طعم و بافت آنها نیز کمک می‌کنند (۵-۷). مطالعات نشان داده است که پتیدهای زیست فعال معمولاً حاوی ۲۰-۲۰۰ آمینواسید هستند و دارای ویژگی‌های سلامتی بخشی متعددی می‌باشند از جمله: ضد فشار خون (۸)، آنتی اکسیدان (۹)، ضد باکتری (۱۰) و تنظیم کننده سیستم ایمنی (۱۱). به‌طور کلی پتیدهای زیست فعال می‌توانند در حین فرآوری مواد غذایی با هیدرولیز خود به

خودی پروتئین‌های غذایی با استفاده از آنزیم‌های هضم کننده درون زا و یا با فراهم کردن شرایط هیدرولیز و با استفاده از پروتئازهای تجاری تولید شوند. علاوه بر این، پتیدهای زیست فعال می‌توانند در حین هضم گوارشی ماده غذایی بلعیده شده آزاد شوند. مطالعات نشان داده است که نوع آنزیم پروتئاز، شرایط هیدرولیز و منبع پروتئینی نقش مهمی در خواص سلامتی بخش پتیدهای حاصل دارند (۱۲). در سال‌های اخیر پتیدهای زیست فعال از منابع گیاهی و حیوانی مختلفی مانند شنبلیله (۱۳)، هسته پرتقال (۱۴) و گوشت مرغ (۱۵) تولید شده‌اند. در این میان، پتیدهای ضد اکسایشی تولید شده از ضایعات فرآوری آبزیان همچون سر ماهی ساردین (۱۶)، پوست و امعاء و احشا سپیداج^۴ (۱۷)، پوست و سر ماهی کت چرمی^۵ (۱۸) مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند چرا که مشخص شده است که این پتیدها پتانسیل سلامتی بخشی قابل توجهی دارند و قابلیت کاربرد مناسبی در تولید محصولات فراسودمند دارند. از سوی دیگر در صنایع فرآوری ماهی‌ها تنها از گوشت سفید آنها در تولید کنسرو ماهی استفاده می‌شود و حدود ۷۰-۵۰٪ ماهی اولیه (سر، امعاء و احشاء، استخوان، پوست، کبد و گوشت تیره) که منابع بالقوه‌ای از ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای مانند پروتئین‌ها و آمینو اسیدهای ضروری هستند به‌عنوان ضایعات به‌دور ریخته می‌شوند که منجر به آلودگی محیط زیست و ضررهای اقتصادی سنگین به تولید کنندگان می‌شود. با در نظر گرفتن محدودیت منابع بیولوژیکی، آلودگی محیط زیست و صرفه اقتصادی واحدهای فرآوری آبزیان، یافتن راه حلی برای مدیریت و استفاده بهتر از این ضایعات و تبدیل آنها به فرآورده‌هایی با ارزش افزوده بالا امری ضروری است. امعاء و احشا ماهی یکی از مهمترین محصولات جانبی صنایع فرآوری آبزیان است که حاوی فراکسیون‌های ارزشمند

4- cuttlefish
5 -leatherjacket

1- n-propyl gallate
2 -Butylated hydroxytoluene
3 -Butylated hydroxyanisole

از الک با مش ۴۰ عبور داده شدند. در نهایت نمونه‌های حاصل در کیسه‌های پلی اتیلنی در فریزر ۲۰- درجه سانتی گراد برای انجام آزمون‌های بعدی نگهداری شدند (۲۱).

۳-۲- چربی‌گیری

به‌منظور چربی‌زدایی، پودرها به نسبت ۱:۱۰ (وزنی/ حجمی) با هگزان مخلوط و به مدت ۵ ساعت در دمای اتاق 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 (۲۱).

۴-۲- 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 همزده شد. سپس محلول حاصل در $7000 \times \text{rpm}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ و سوپرناتانت حاصل جمع آوری شد. سپس pH سوپرناتانت به pH=۴ (pH ایزوالکتریک) تنظیم و به‌منظور ترسیب پروتئین‌ها، در $8000 \times \text{rpm}$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت رسوب پروتئینی حاصل با آب مقطر دو بار شسته شد و در $7000 \times \text{rpm}$ به مدت ۵ دقیقه مجدداً سانتریفیوژ 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 (۲۲).

۵-۲- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

ایزوله پروتئینی حاصل در غلظت (w/v) ۵ درصد در بافر فسفات ۰/۲M، مولار pH=۷/۴ برای پانکراتین و pH=۸ برای آلکالاز حل و جهت هیدراته شدن کامل آن به مدت ۳۰ در دمای محیط همزده شد. سپس در انکوباتور شیکر دار با دور rpm ۲۰۰ در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد برای پانکراتین و ۵۰ درجه سانتی گراد برای آلکالاز قرار داده شد. آنزیم به

پروتئینی و لپیدی و همچنین ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشد (۱۹). سالانه در جهان حدود ۴ میلیون تن ماهی تون صید می‌شود که در این میان هوور مسقطی با نام علمی *Katsuwonus pelamis* بالاترین میزان صید را دارد و عمدتاً برای تولید کنسرو ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد؛ بنابراین بخش زیادی از ضایعات کارخانجات کنسروماهی را تشکیل می‌دهد (۲۰). بنابراین با توجه به موارد بیان شده، هدف از این پژوهش بررسی تاثیر زمان هیدرولیز و نوع پروتئاز (آلکالاز و پانکراتین) بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های ضداکسایشی (فعالیت مهار رادیکال DPPH^۱، احیاء کنندگی یون آهن، شلاته‌کنندگی یون آهن، مهار رادیکال نیتریک اکسید و ضداکسایشی کل) پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی بود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پانکراتین، آلکالاز، 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

ابتدا هیدرولیز شده‌های حاصل در آب مقطر (۱۰mg/ml) حل شدند سپس، ۱/۵ml میلی لیتر از هر نمونه با ۱/۵ میلی لیتر از محلول اتانولی DPPH (۰/۱۵mM) مخلوط و به مدت ۲۰ ثانیه ورتکس شدند. در مرحله بعد، مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی نگهداری و سپس در ۴۰۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. جذب محلول سوپرناتانت در طول موج ۵۱۷nm خوانده شد (۱۸). درصد مهار رادیکال آزاد DPPH با استفاده از فرمول ۲ محاسبه گردید:

$$I (\%) = \left[\frac{A_{blank} - A_{sample}}{A_{blank}} \right] \times 100 \quad (2)$$

۲-۸-۲- تعیین قدرت احیاءکنندگی یون آهن

برای تعیین قدرت احیاءکنندگی یون آهن نمونه‌های هیدرولیز شده، ۰/۵ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (در غلظت ۱۰mg/ml) با ۰/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲M (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 ۲۵۰۰rpm 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 ۷۰۰nm پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط، خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش نشان دهنده افزایش قدرت احیاءکنندگی است (۲۳).

۲-۸-۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

برای ارزیابی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، ۱ میلی لیتر نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۴۰mg/ml) با ۰/۰۵ میلی لیتر محلول دی کلرید آهن (۲Mm) و ۱/۸۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر مخلوط شد. سپس، ۰/۱ میلی لیتر محلول فروزین (۵Mm) افزوده و مخلوط به شدت هم‌زده شد. جذب پس از ۱۰ دقیقه نگهداری مخلوط در دمای محیط در ۵۶۲ nm خوانده شد (۲۴). از آب دوبار تقطیر به عنوان نمونه شاهد استفاده شد. فعالیت شلاته‌کنندگی نمونه‌ها با استفاده از معادله ۳ محاسبه گردید:

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 سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفته و با استفاده از حمام آب یخ تا دمای محیط خنک شدند. سپس نمونه‌ها با دور ۸۰۰۰ ×rpm 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 (۱۳).

۲-۶- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

اندازه‌گیری میزان رطوبت، پروتئین، خاکستر و چربی با استفاده از روش AOAC 2000، انجام شد (۲۲).

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 ۱۰۰۰۰rpm و به مدت ۱۰min سانتریفوژ شد. مقدار پروتئین موجود در سوپرناتانت حاوی تری کلرواستیک اسید ۰/۲۲ M با روش برادفورد تعیین گردید (۹). در نهایت، درجه هیدرولیز با استفاده از فرمول ۱ تعیین شد:

(۱)

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

۲-۸-۲- بررسی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز

شده

۲-۸-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

ظرفیت ضد اکسایشی 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

۳-۱- ترکیبات شیمیایی

میزان خاکستر، رطوبت و پروتئین پودر چربی‌گیری نشده و چربی‌گیری شده و ایزوله پروتئین حاصل در جدول ۱ ذکر گردیده است. میزان چربی در پودر چربی‌گیری نشده ۲۱/۲۵ درصد بود که پس از چربی‌گیری و استخراج پروتئین به ترتیب به ۷/۰۶ و ۴/۱۰ درصد کاهش یافت. همچنین میزان رطوبت و خاکستر هم روند کاهشی داشته و پس از استخراج پروتئین به ترتیب از ۸/۰۳ و ۸/۴ درصد به ۵/۲ و ۳/۱۵ درصد تقلیل پیدا کردند. از سوی دیگر میزان پروتئین در پودر چربی‌گیری نشده ۴۳/۷۵ درصد بود که پس از فرآیند استخراج به ۸۷/۵ درصد افزایش 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. 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. 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 pH=۱۰ باشد. از سوی دیگر

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

۲-۸-۴- ظرفیت ضد اکسایشی کل

این روش بر مبنای احیاء مولبدن ۶ ظرفیتی به مولبدن ۵ ظرفیتی می‌باشد که با تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولبدن در محیط اسیدی همراه است. در این روش ۰/۱ میلی لیتر از نمونه حل شده در آب مقطر (غلظت ۱۰ mg/ml) با ۱ میلی لیتر از معرف (اسیدسولفوریک M ۰/۶، فسفات سدیم ۲۸ M و آمونیوم مولبدات ۴ mM) در لوله اپندورف ریخته و به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب ۹۰ درجه سانتی گراد 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 (۱۳).

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 سانتی گراد 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:

$$\text{NO chelating activity} = \frac{(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}})}{A_{\text{control}}} \times 100 \quad (۴)$$

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،

املاح معدنی حذف می شوند [۱۳].

کاهش میزان خاکستر نیز می تواند به دلیل فرآیند استخراج پروتئین باشد که بسیاری از ترکیبات آلی غیر پروتئینی و

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

رادیکال DPPH با متغیرهای فرآیند هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به ترتیب از معادله های (۵) و (۶) تبعیت می کند.

فعالیت مهار رادیکال DPPH

$$= +49.86 + 1.66 A + 4.60 B - 0.47 AB - 11.05 A^2 - 8.10 B^2 \quad (5)$$

فعالیت مهار رادیکال DPPH

$$= +37.25 + 3.62 A + 5.10 B + 1.03 AB - 3.89 A^2 - 4.89 B^2$$

۲-۳- 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 ۲، ذکر شده است. اثر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و متغیرهای A^2 و B^2 بر فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های حاصل از فعالیت هر دو آنزیم آلکالاز و پانکراتین معنی دار بود، درحالی که تاثیر متغیر AB تنها بر فعالیت ضد اکسایشی هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز معنی دار بود ($p < 0.05$). رابطه ی فعالیت مهار رادیکال DPPH با متغیرهای مستقل درجه دوم و میزان ضریب همبستگی در مورد هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز و پانکراتین به ترتیب ۰/۹۹۹۵ و $R^2 = 0.9521$ بود که حاکی از توانایی بالای مدل در پیش بینی تاثیر متغیرهای فرآیند بر فعالیت مهار رادیکال DPPH می باشد. از سوی دیگر معنی دار نبودن شاخص عدم برازش^۱، حاکی از این امر است که مدل به خوبی توانسته تغییرات در مقدار داده ها را توصیف کند. رابطه ی مهار

1- Lack of fit

Table 2. ANOVA of DPPH radical scavenging activity and Total antioxidant capacity of protein hydrolysate with alcalase and pancreatin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with alcalase				
ANOVA of DPPH radical scavenging activity				
Model	1026.18	5	<0.0001	49.86
	0.489	5	0.0026	37.25
A-time	22.02	1	<0.0001	1.66
	104.91	1	0.0058	3.62
B- E/S	169.00	1	<0.0001	4.60
	207.91	1	0.0013	5.10
AB	0.88	1	0.0328	-0.47
	4.22	1	0.3968	1.03
A²	688.92	1	<0.0001	-11.05
	85.38	1	0.0088	-3.89
B²	370.29	1	<0.0001	-8.10
	134.80	1	0.0034	-4.89
Lac of fit	0.49	3	0.0828	
	24.59	3	0.0651	
ANOVA of total antioxidant capacity				
Model	0.35	5	0.0004	0.93
	2.94	5	0.0111	0.46
A-time	3.606	1	0.1884	-0.021
	1.71	1	0.0027	-0.46
B- E/S	0.29	1	<0.0001	0.19
	0.010	1	0.6882	-0.036
AB	3.721	1	0.1826	0.031
	2.916	1	0.8288	-0.027
A²	0.047	1	0.0027	-0.092
	1.21	1	0.0056	0.46
B²	1.565	1	0.3619	0.017
	0.15	1	0.1614	0.16
Lac of fit	6.568	3	0.2238	
	0.28	3	0.0625	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

فعالیت ضد اکسایشی تا ۵۰/۴ درصد شد و افزایش بیشتر غلظت آنزیم باعث کاهش توانایی هیدرولیز شده‌های حاصل در مهار رادیکال DPPH گشت. با توجه به نمودار در زمان هیدرولیز ۱۷۳/۴۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۸ درصد، بیشترین میزان فعالیت ضد اکسایشی به میزان ۵۰/۵۵ درصد حاصل می‌شود. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از فعالیت پانکراتین (شکل B۱)، در زمان‌های هیدرولیز ثابت و کمتر از ۱۶۵ دقیقه، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۳ درصد باعث افزایش

با توجه به شکل ۱ A، در مقادیر ثابت آنزیم (کمتر از ۱/۷۵ درصد)، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۲ دقیقه باعث افزایش توانایی هیدرولیز شده‌های حاصل در مهار رادیکال DPPH به میزان ۴۸/۱۲ شد اما در مقادیر آنزیم بالاتر از ۱/۷۵ افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۲ دقیقه باعث افزایش فعالیت ضد اکسایشی تا ۵۰/۴ درصد شد و افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر منفی داشت. از سوی دیگر، در زمان‌های ثابت هیدرولیز افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد باعث افزایش

کنندگی رادیکال محلول در چربی DPPH دارد. به طور کلی مطالعات نشان داده است که نوع پروتئاز و میزان درجه هیدرولیز تاثیر قابل توجهی بر خواص ضد اکسایشی پپتیدهای زیست فعال دارد [۲۴].

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

ظرفیت ضد اکسایشی کل

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل روشی در جهت ارزیابی قدرت ضد اکسایشی کل یک ترکیب می باشد که شامل قدرت ضد اکسایشی ترکیبات محلول در چربی و آب است. این روش بر مبنای احیای مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی است که منجر به تشکیل کمپلکس سبز رنگ فسفومولیبدن در محیط اسیدی می گردد [۳۰]. با توجه به نتایج تجزیه واریانس ظرفیت ضد اکسایشی کل ذکر شده در جدول ۲، تنها تاثیر متغیر A^2 بر ظرفیت ضد اکسایشی کل هر دو هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز و پانکراتین معنی دار بود و غلظت آنزیم تنها بر فعالیت ضد اکسایشی هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز و زمان هیدرولیز بر فعالیت ضد اکسایشی کل هیدرولیز شده های حاصل از پانکراتین تاثیر معنی دار داشت ($p < 0.05$). آنالیز سطح پاسخ نشان داد که پارامترهای واکنش با ظرفیت آنتی اکسیدانی کل هر دو هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز و پانکراتین رابطه ای درجه دوم داشتند که به ترتیب ضریب رگرسیون آنها $R^2 = 0.9785$ و $R^2 = 0.9128$ بود. عدم معنی دار بودن شاخص عدم برازش نیز نشان از توانایی بالای مدل در پیش بینی دامنه ی مقادیر مورد بررسی است. رابطه ی ظرفیت ضد اکسایشی کل با متغیرهای مورد بررسی در هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به ترتیب از رابطه ی (۷) و (۸) پیروی می کند.

(۷)

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

$$= +0.93 - 0.021 A + 0.19 B \\ + 0.031 AB - 0.092 A^2 + 0.017 B^2$$

فعالیت مهار رادیکال DPPH تا ۳۶/۱۰ درصد شد اما در زمان های هیدرولیز بیشتر از ۱۶۵ دقیقه، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۳ درصد باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی تا ۳۹/۶ درصد گشت. از سوی دیگر در غلظت های ثابت آنزیم با افزایش زمان تا ۲۳۰ دقیقه، فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های پانکراتین افزایش یافت اما در زمان های هیدرولیز بیشتر، افزایش غلظت آنزیم تاثیر منفی بر فعالیت ضد اکسایشی داشت. به طور کلی با توجه به نمودار بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH (۳۹/۴۵ درصد) در زمان هیدرولیز ۲۳۵/۶۴ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۴۰ درصد حاصل می شود. مشابه با این یافته ها اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹) با هیدرولیز ضایعات ماهی قزل آلا به مدت ۱۸۰ دقیقه گزارش کردند که فعالیت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده حاصل به ۴۰ درصد افزایش یافت اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیر منفی بر این خاصیت داشت [۲۶]. همچنین در تطابق با این یافته ها کاوه و همکاران (۱۳۹۸) گزارش کردند که در هیدرولیز پروتئین شنبلیله با پانکراتین، افزایش غلظت آنزیم تا ۲ درصد باعث افزایش توانایی ضد اکسایشی هیدرولیز شده های حاصل شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر منفی داشت [۲۷]. احتمالاً افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز باعث پیشرفت فرآیند هیدرولیز و تاثیر پروتئازها بر پپتیدهای آنتی اکسیدان تولیدی و تخریب آنها می گردد که این امر منجر به کاهش توانایی ضد اکسایشی با افزایش زمان هیدرولیز می گردد [۲۸]. از سوی دیگر کاهش فعالیت مهار رادیکال DPPH با افزایش غلظت آنزیم می تواند ناشی از هیدرولیز بیش از حد باشد که باعث رهایش کامل آمینواسیدهای هیدروفیل که این امر برهمکنش آمینواسیدهای فعال را با رادیکال محلول در چربی DPPH با مشکل مواجه می کند [۲۹]. بیشتر بودن فعالیت مهار رادیکال DPPH هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز نسبت به پانکراتین نشان از تاثیر بسیار مطلوب آنزیم آلکالاز به عنوان یک اندوپپتیداز نسبت به پانکراتین در رهایش پپتیدهایی با قابلیت مهار

(۸)

ظرفیت آنتی اکسیدانی کل

$$= +3.26 - 0.021 A - 0.72 B \\ - 3.20 AB + 5.08 A^2 + 0.21 B^2$$

با توجه به شکل C۱، در مقادیر ثابت غلظت آنزیم با افزایش زمان هیدرولیز با آنزیم آلکالاز تا ۱۶۵ دقیقه، ظرفیت ضد اکسایشی کل کمی افزایش یافت اما افزایش بیشتر زمان تأثیری منفی در پی داشت. به طور کلی تغییرات ظرفیت ضد اکسایشی کل با تغییر زمان هیدرولیز ناچیز بود که این امر حاکی از عدم معنی دار بودن زمان هیدرولیز بر ظرفیت ضد اکسایشی هیدرولیز شده های حاصل از آلکالاز است (جدول ۲). از سوی دیگر در مقادیر ثابت زمان هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تأثیر مثبتی بر ظرفیت ضد اکسایشی کل داشت و با افزایش غلظت آنزیم از ۰/۸۶ درصد تا ۲/۶۳ درصد، ظرفیت ضد اکسایشی کل افزایش یافت. با توجه به نمودار بیشترین ظرفیت ضد اکسایشی کل (جذب در ۶۹۵ نانومتر، ۱/۱۴) در هیدرولیز آلکالاز در زمان ۱۶۸ دقیقه، غلظت آنزیم ۲/۶۳ درصد حاصل شد. از سوی دیگر همانطور که در شکل D۱، مشاهده می شود به طور کلی زمان تأثیری منفی بر ظرفیت ضد اکسایشی کل هیدرولیز شده های حاصل از پانکراتین داشت، به طوریکه در تمامی غلظت های ثابت

آنزیم، افزایش زمان باعث کاهش ظرفیت ضد اکسایشی کل هیدرولیز شده ها شد اما همانطور که پیش تر ذکر شد تأثیر غلظت آنزیم بر ظرفیت ضد اکسایشی کل هیدرولیز شده های حاصل از پانکراتین معنی دار نبود. بیشترین ظرفیت ضد اکسایشی کل (۱/۵ جذب در ۶۹۵ نانومتر) در هیدرولیز با آنزیم پانکراتین در زمان هیدرولیز ۷۳/۲۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۰/۸۸ درصد حاصل شد. به طور کلی می توان نتیجه گرفت که آنزیم های پانکراتین و آلکالاز با هیدرولیز باندهای پپتیدی موجود در پروتئین امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی قادر به رهایش پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی بوده اند که باعث تبدیل رادیکال های آزاد به ترکیباتی پایدار شده و در نهایت منجر به افزایش ظرفیت آنتی اکسیدانی کل شده است. اما افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز و یا غلظت آنزیم منجر به تشدید فرآیند هیدرولیز و در نتیجه هیدرولیز پپتیدهای با خاصیت الکترون دهندگی شده است. در این راستا پانکراتین عملکرد بهتری در تولید پپتیدهایی با خاصیت الکترون دهندگی داشت. این نتایج در تطابق با یافته های کاوه و همکاران (۲۰۲۲) در هیدرولیز پروتئین شنبلیله و مظلومی و همکاران (۱۳۹۸) در هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال بود [۳۱ و ۹].

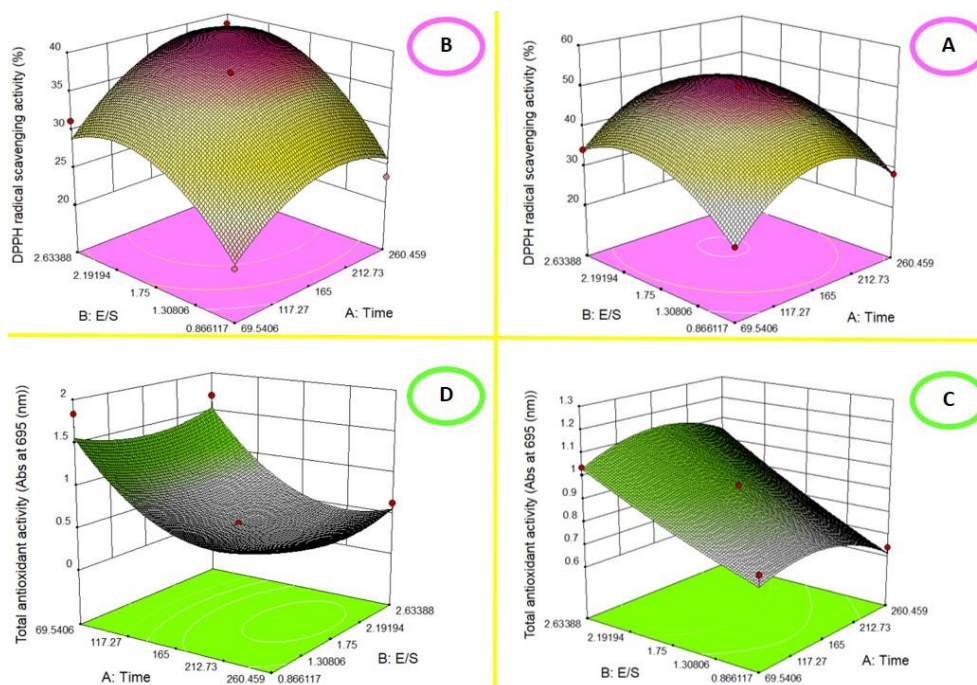


Figure 1- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity of protein hydrolysate of skipjack viscera (A and C: hydrolysis with alcalase, B and D: hydrolysis with pancreatin)

ضریب رگرسیون و معنی دار نشدن فاکتور عدم برآزش نشان-
دهنده‌ی توانایی مناسب مدل جهت پیش‌بینی تاثیر متغیرهای
فرآیند می‌باشد. فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید و
متغیرهای فرایند هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به‌ترتیب از
رابطه‌ی (۹) و (۱۰) پیروی می‌کنند.

(۹)

فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید

$$= +58.26 - 0.31 A + 7.77 B \\ - 0.33 AB - 17.50 A^2 - 12.20 B^2$$

(۱۰)

فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید

$$= +45.61 + 2.71 A + 7.04 B \\ - 0.31 AB - 9.55 A^2 - 11.03 B^2$$

۳-۴- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر
فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید

نیتریک اکسید، یک رادیکال آزاد است که از طریق
اکسیداسیون آرژنین به سیترویلین به وسیله‌ی نیتریک اکسید-
سنتتاز تولید می‌شود [۳]. نتایج تجزیه واریانس ذکر شده در
جدول ۳ نشان می‌دهد که تاثیر متغیرهای غلظت آنزیم، A^2 و
 B^2 بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های
حاصل از آلکالاز و پانکراتین معنی‌دار بود و متغیرهای زمان
هیدرولیز و AB تاثیر معنی‌داری نداشتند ($p < 0.05$). فعالیت
مهار رادیکال نیتریک اکسید با پارامترهای واکنش رابطه‌ای از
نوع درجه دوم با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9994$ برای
هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز و $R^2 = 0.817$ برای
هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین داشت. بالا بودن

Table 3. ANOVA of NO radical scavenging activity and reducing power of protein hydrolysate with alcalase and pancreatin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with alcalase				
Hydrolysis with pancreatin				

ANOVA of NO radical scavenging activity						
Model	2520.63	5	<0.0001	58.26		
		1389.32	5	0.0186	45.61	
A-time	0.78	1	0.1639	-0.31		
		58.93	1	0.2436	2.71	
B- E/S	482.60	1	<0.0001	7.77		
		396.89	1	0.0186	7.04	
AB	0.44	1	0.2785	-0.33		
		0.38	1	0.9192	-0.31	
A²	1729.66	1	<0.0001	-17.50		
		514.73	1	0.0113	-9.55	
B²	839.99	1	<0.0001	-12.20		
		687.62	1	0.0063	-11.03	
Lac of fit	1.39	3	0.0803			
		168.58	3	0.0743		
ANOVA of reducing power						
Model	0.10	5	0.0077	0.84		
		0.092	5	0.026	0.75	
A-time	7.73	1	0.0854	0.031		
		5.38	1	0.1982	-0.026	
B- E/S	0.030	1	0.0082	0.062		
		0.039	1	0.0102	0.070	
AB	6.25	1	0.9539	1.25		
		0.022	1	0.0294	-0.075	
A²	0.028	1	0.0096	-0.07		
		0.020	1	0.0362	-0.059	
B²	0.056	1	0.0022	-0.099		
		0.012	1	0.0786	-0.046	
Lac of fit	8.092	3	0.0623			
		0.012	3	0.0839		

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

۱۶۵/۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۲ درصد حاصل شد. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین (شکل ۲ B)، در غلظت‌های ثابت آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید شد اما افزایش بیشتر زمان باعث کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها گشت اما همانطور که در جدول ۳ بیان شد تاثیر زمان معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). از سوی دیگر در زمان‌های ثابت هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد، توانایی هیدرولیز شده‌های پانکراتین در مهار رادیکال نیتریک اکسید افزایش و با افزایش بیشتر غلظت آنزیم کاهش یافت. به‌طور کلی با توجه به نمودار بیشترین فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید (۴۶/۵ درصد) در غلظت آنزیم ۲/۱۶ درصد و زمان هیدرولیز ۱۶۴/۵ دقیقه حاصل گشت. مطالعات نشان داده

همانطور که در شکل ۲ A مشاهده می‌شود، در زمان‌های ثابت هیدرولیز، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۴ درصد منجر به افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های آلکالاز شد اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیر منفی در پی داشت. از سوی دیگر همانطور که در جدول ۳ ذکر شد تاثیر زمان بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز معنی‌دار نبود اما به‌طور کلی در غلظت‌های ثابت آنزیم، افزایش زمان تا ۱۶۵ دقیقه باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید شد اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز باعث کاهش این ویژگی ضد اکسایشی هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز شد. به‌طور کلی بر اساس نمودار بیشترین فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز (۵۹/۵ درصد) در زمان

معنی داری از خود نشان دادند. از سوی دیگر متغیر B^2 تنها بر هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز و متغیر AB تنها بر هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین تاثیر معنی داری از خود نشان دادند ($p < 0.05$). قدرت احیاء کنندگی یون آهن هر دو هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز و پانکراتین با پارامترهای واکنش رابطه‌ای درجه دوم و به ترتیب با ضریب رگرسیون $R^2 = 0.9252$ و $R^2 = 0.8825$ داشت. فاکتور عدم برازش نیز معنی دار نشد که حاکی از توانایی مناسب مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای فرآیند می‌باشد. آنالیز واریانس نشان داد که رابطه‌ی قدرت احیاء کنندگی یون آهن و متغیرهای فرآیند هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به صورت رابطه‌ی (۱۱) و (۱۲) می‌باشد.

(۱۱)

قدرت احیاء کنندگی یون آهن

$$= +0.84 + 0.031 A + 0.062 B + 1.25 AB - 0.070 A^2 - 0.099 B^2$$

(۱۲)

قدرت احیاء کنندگی یون آهن

$$= +0.75 - 0.026 A + 0.070 B - 0.075 AB - 0.059 A^2 - 0.046 B^2$$

با توجه به شکل C_2 ، در زمان‌های ثابت هیدرولیز افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد، باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز شد اما افزایش بیشتر تاثیری منفی در پی داشت. در غلظت ثابت آنزیم نیز، افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۹۰ دقیقه باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی یون آهن شد اما افزایش بیشتر زمان از این قدرت کاست. اما همانطور که در جدول ۳ ذکر شده است، تاثیر زمان بر این ویژگی ضد اکسایشی هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز معنی دار نیست ($p > 0.05$). در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین (شکل D_2)، در مقادیر ثابت غلظت آنزیم، افزایش زمان تا ۱۹۵ دقیقه باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی یون آهن شد اما افزایش بیشتر

است که رادیکال آزاد نیتریک اکسید در واکنش نیتروژن با گونه‌های فعال اکسیژن تولید می‌شوند و باعث بیماری‌های خطرناک از جمله دیابت، پوکی استخوان، سرطان و بیماری‌های قلبی و عروقی می‌شود [۳۲]. مشابه با این نتایج لی و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی تاثیر هشت نوع پروتئاز (فلاورزیم، نوترئاز، پروتامکس، آلکالاز، پاپائین، پیپسین، تریپسین و α -کیموتریپسین) بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید پروتئین هیدرولیز شده حاصل از صدف *Ruditapes philippinarum* گزارش کردند که هیدرولیز شده حاصل از فعالیت آنزیم آلکالاز از توانایی مهار کنندگی بیشتری برخوردار بود [۳۴]. همچنین صادقی ماهونک و کاوه (۱۴۰۱) با هیدرولیز پروتئین کنجاله کدو با آنزیم آلکالاز بیان کردند که خاصیت آبدوستی پپتیدها با توانایی آنها در مهار رادیکال نیتریک اکسید رابطه‌ی مستقیم دارد و بیشترین میزان مهار رادیکال نیتریک اکسید را ۵۲/۱۸ درصد گزارش کردند [۸]. از سوی دیگر شریعت علوی و همکاران (۱۳۹۷) با هیدرولیز پروتئین دانه گوجه فرنگی با استفاده از آنزیم آلکالاز گزارش کردند که افزایش زمان تاثیر مثبتی بر فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید پروتئین هیدرولیز شده حاصل داشت اما افزایش غلظت آنزیم باعث کاهش این قابلیت شد [۳۳]. به طور کلی فعالیت مهار کنندگی رادیکال نیتریک اکسید پروتئین هیدرولیز شده به ترکیب آمینواسیدی، درجه هیدرولیز، نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز بستگی دارد [۱۳].

۳-۵- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر قدرت احیاء کنندگی یون آهن

آزمون احیاء کنندگی یون آهن، جهت ارزیابی میزان توانایی یک ترکیب در تبدیل یون Fe^{3+} به Fe^{2+} به کار می‌رود. نتایج تجزیه واریانس قدرت احیاء کنندگی یون آهن (جدول ۳) نشان می‌دهد که تاثیر زمان هیدرولیز بر هیچ یک از هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز یا پانکراتین تاثیر معنی دار نداشت در حالیکه متغیرهای غلظت آنزیم و A^2 بر تاثیر

زمان تأثیری منفی در پی داشت که این اثر منفی در غلظت-های آنزیم بیشتر از ۲/۲ درصد بسیار بیشتر بود. در زمان‌های ثابت و کمتر از ۱۸۵ دقیقه با افزایش غلظت آنزیم، قدرت احیاءکنندگی یون آهن افزایش یافت اما در زمان‌های بیشتر از ۱۸۵ دقیقه، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد تأثیر مثبتی بر قدرت احیاءکنندگی داشت اما در در غلظت‌های بیشتر آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز باعث کاهش قدرت هیدرولیز شده-های حاصل از پانکراتین در احیاءکنندگی یون آهن شد. به-طور کلی افزایش قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده در زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم مناسب را می‌توان به-دلیل رهایش آمینواسیدهایی با قدرت احیاء کنندگی بالا همچون متیونین، تریپتوفان و لیزین دانست [۲۴]. در تطابق با این یافته‌ها خانتافانت و همکاران (۲۰۱۱) با هیدرولیز پروتئین ماهیچه ماهی سرخو^۱ تأثیر مثبت افزایش زمان و درجه هیدرولیز بر قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل را گزارش کردند [۳۴]. همچنین احمدی و همکاران (۱۳۹۹)، با هیدرولیز پروتئین امعاء و احشا ماهی کپور با آنزیم آلکالاز بیان کردند که افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۸۰ دقیقه به‌طور معنی داری باعث افزایش قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل شد [۳۵]. به‌طور کلی مطالعات نشان داده است که ساختار، اندازه، ترکیب و توالی پپتیدها با گذشت زمان و پیشرفت فرآیند هیدرولیز تغییر می‌کند که این امر بر قدرت احیاء کنندگی هیدرولیز شده حاصل تأثیر به‌سزایی دارد [۱۶].

1 -Brown stripe red snapper

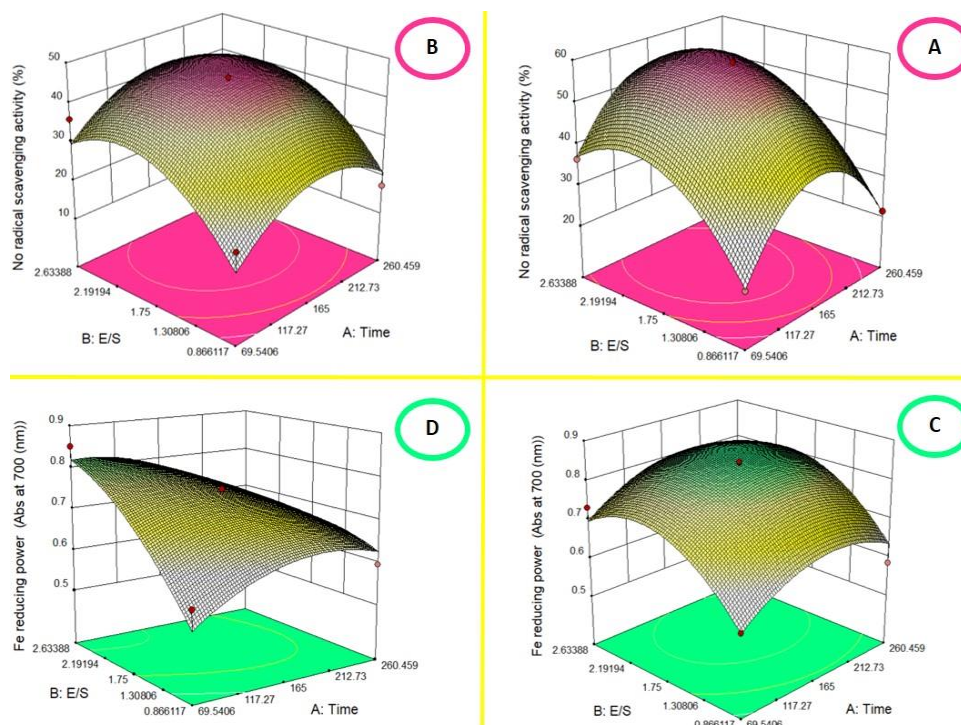


Figure 2- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on NO radical scavenging activity and reducing power of protein hydrolysate of skipjack viscera (A and C: hydrolysis with alcalase, B and D: hydrolysis with pancreatin)

ضریب رگرسیون $R^2=0.9821$ و $R^2=0.9999$ داشتند. معنی دار نشدن فاکتور عدم برازش نیز از توانایی بالای مدل در پیش‌بینی تاثیر متغیرهای فرآیند بر پاسخ مورد بررسی حکایت دارد. با توجه به نتایج آنالیز واریانس رابطه‌ی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن و متغیرهای فرآیند هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین به‌صورت رابطه‌ی (۱۳) و (۱۴) می‌باشد.

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

$$= +53.61 + 1.77 A + 5.37 B + 0.81 AB - 12.78 A^2 - 10.38 B^2$$

(۱۴)

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

$$= +59.41 + 6.92 A + 0.34 B + 1.81 AB - 6.57 A^2 - 2.80 B^2$$

۳-۶- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

یون Fe^{2+} به‌عنوان کاتالیزور در واکنش‌های اکسیداسیون فعالیت می‌کند که باعث تبدیل سریع آنیون سوپراکسید به رادیکال‌های خطرناک هیدروکسیل می‌شود. رادیکال‌های هیدروکسیل تولید شده می‌توانند با مولکول‌های زیستی واکنش داده و باعث آسیب سلول‌ها و بافت‌ها شوند [۳۶]. با توجه به نتایج تجزیه واریانس ذکر شده در جدول ۴، تمامی متغیرهای مورد بررسی بر فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز تاثیر معنی‌داری داشتند اما تنها متغیرهای زمان، A^2 و B^2 بر این خاصیت ضداکسایشی هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین تاثیری معنی‌داری از خود نشان دادند ($p < 0.05$). پارامترهای واکنش با فعالیت شلاته‌کنندگی هر دو هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز و پانکراتین رابطه‌ای درجه دوم و به‌ترتیب با

جایگاه‌های فعال آنزیم موجود برای هیدرولیز پروتئین، شکسته‌شدن پیوندهای پپتیدی بیشتر و در نهایت افزایش حلالیت پپتیدهای تولیدی نسبت داد که باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی پپتیدهای تولیدی گشته است [۳۷]. به‌طور کلی مهم‌ترین عواملی که بر قابلیت شلاته‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بستگی دارند عبارتند از: ماهیت و ترکیب منبع پروتئین، نوع پروتئاز مورد استفاده و میزان درجه هیدرولیز [۳۸]. این یافته‌ها مشابه با نتایج کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷)، مقصودلو و همکاران (۱۳۹۶) و جامدار و همکاران (۲۰۱۰) به ترتیب در هیدرولیز پروتئین ماهی دم زرد^۱، گرده زنبور عسل و بادام زمینی می‌باشد [۳۴، ۳۹ و ۴۰].

همانطور که در شکل ۳ A مشاهده می‌شود در زمان‌های ثابت با افزایش غلظت آنزیم تا ۱/۹ درصد میزان فعالیت شلاته-کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های حاصل از آلکالاز افزایش یافت اما افزایش بیشتر غلظت آنزیم تاثیری منفی داشت و منجر به کاهش توانایی هیدرولیز شده‌های آلکالاز در شلاته‌کردن یون آهن شد. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم، فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۷۰ دقیقه افزایش و با افزایش بیشتر زمان کاهش یافت. به‌طور کلی با توجه به نمودار، در هیدرولیز با آنزیم آلکالاز بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۵۴/۳۲ درصد) در زمان هیدرولیز ۱۷۸/۶۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۸ درصد حاصل شد. در هیدرولیز با آنزیم پانکراتین (شکل ۳ B)، در زمان‌های ثابت با افزایش غلظت آنزیم تغییر معنی‌داری در فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده ایجاد نشد. همانطور که در جدول ۴ ذکر شد، غلظت آنزیم تاثیر معنی‌داری بر فعالیت شلاته‌کنندگی هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین نداشت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم، افزایش زمان هیدرولیز تا ۲۱۰ دقیقه باعث افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی شد اما افزایش بیشتر زمان تاثیری منفی داشت. به‌طور کلی بیشترین میزان فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (۶۱/۳۸ درصد) با هیدرولیز با پانکراتین در زمان هیدرولیز ۲۱۷/۷۵ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۵ درصد حاصل شد. کاهش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز می‌تواند به‌دلیل کاهش کارایی آنزیم در تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان به‌دلیل تولید ترکیبات بازدارنده آنزیم طی هیدرولیز طولانی باشد؛ همچنین هیدرولیز پپتیدهای شلاته‌کننده یون آهن که در اوایل فرآیند هیدرولیز تولید شده‌اند، می‌تواند دلیل دیگری بر کاهش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن طی هیدرولیز در زمان‌های طولانی باشد [۲۶]. از سوی دیگر افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن هیدرولیز شده‌های تولیدی با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز تا ۱/۹ درصد را می‌توان به افزایش

1- yellow stripe trevally

Table 4. ANOVA of Fe chelating activity and degree of hydrolysis of protein hydrolysate with alcalase and pancreatin

	Sum of squares	df	P value	Coefficient estimate
Hydrolysis with alcalase				
Hydrolysis with pancreatin				
ANOVA of Fe chelating activity				
Model	1452.04	5	0.0001<	53.61
	645.69	5	0.0002	59.41
A-time	25.20	1	0.0001<	1.77
	383.39	1	0.0001<	6.92
B- E/S	230.59	1	0.0001<	5.37
	0.95	1	0.5533	0.34
AB	2.66	1	0.0005	0.81
	13.18	1	0.0643	1.81
A ²	922.51	1	0.0001<	-12.78
	243.54	1	0.0002	-6.57
B ²	608.59	1	0.0001<	-10.38
	44.18	1	0.0075	-2.80
Lac of fit	0.17	3	0.3000	
	11.76	3	0.1237	
ANOVA of degree of hydrolysis				
Model	514.81	5	0.0001<	24.42
	179.57	5	0.0432	22.37
A-time	97.37	1	0.0001<	3.49
	0.80	1	0.7420	-0.32
B- E/S	173.37	1	0.0001<	4.66
	0.75	1	0.7490	-0.31
AB	96.63	1	0.0001<	-4.92
	21.58	1	0.1303	-2.32
A ²	102.14	1	0.0001<	-4.25
	3.27	1	0.5127	0.76
B ²	88.46	1	0.0001<	-3.96
	127.62	1	0.0070	-4.75
Lac of fit	3.65	3	0.0504	
	32.84	3	0.0671	

*A: hydrolysis time B: enzyme to substrate ratio

۳-۷- تاثیر زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و نوع پروتئاز بر درجه هیدرولیز

۳-۷-۱- تاثیر زمان: نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که تمام متغیرهای مورد بررسی تاثیر معنی داری بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز داشتند اما تنها متغیر B² بر درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آنزیم پانکراتین تاثیر معنی دار داشت (p<0/05). درجه هیدرولیز با پارامترهای واکنش هر دو آنزیم آلکالاز و پانکراتین رابطه ای درجه دوم داشت که ضریب رگرسیون آنها به ترتیب عبارت بود از

$$R^2=0/8449 \text{ و } R^2=0/9927. \text{ از سوی دیگر معنی دار نشدن فاکتور عدم برازش نشان می دهد که مدل توانایی بالایی در پیش بینی تاثیر متغیرهای مورد بررسی بر پاسخ مورد نظر دارد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که رابطه ی متغیرهای فرایند هیدرولیز با آلکالاز و پانکراتین و درجه هیدرولیز به- ترتیب از رابطه ی (۱۵) و (۱۶) پیروی می کند.}$$

$$(15)$$

$$(16)$$

نتایج تجزیه واریانس (جدول ۴) نشان داد که تمام متغیرهای مورد بررسی تاثیر معنی داری بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آلکالاز داشتند اما تنها متغیر B² بر درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آنزیم پانکراتین تاثیر معنی دار داشت (p<0/05). درجه هیدرولیز با پارامترهای واکنش هر دو آنزیم آلکالاز و پانکراتین رابطه ای درجه دوم داشت که ضریب رگرسیون آنها به ترتیب عبارت بود از

$$\text{درجه هیدرولیز} = +22.37 - 0.32A - 0.31B - 2.32AB + 0.76A^2 - 4.75B^2$$

با توجه به شکل ۳ C، در زمان‌های ثابت و کمتر از ۲۲۰ دقیقه، با افزایش غلظت آنزیم درجه هیدرولیز افزایش یافت اما در زمان‌های بیشتر از ۲۲۰ دقیقه با افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۳ درصد درجه هیدرولیز افزایش اما با افزایش بیشتر غلظت آنزیم کاهش یافت. از سوی دیگر در غلظت‌های ثابت آنزیم، افزایش زمان تا ۲۴۰ دقیقه باعث افزایش درجه هیدرولیز شد اما افزایش بیشتر زمان هیدرولیز تاثیری منفی بر این پارامتر داشت. به‌طور کلی بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۲۵/۶۲ درصد) با آنزیم آلکالاز در زمان ۱۸۶/۲۰ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۳۲ درصد حاصل شد. در مورد هیدرولیز شده‌های حاصل از پانکراتین (شکل ۳ D)، در غلظت‌های ثابت آنزیم، تغییر زمان هیدرولیز تاثیر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز نداشت. از سوی دیگر در زمان‌های ثابت، افزایش غلظت آنزیم تا ۲/۲ درصد باعث افزایش درجه هیدرولیز شد و افزایش بیشتر تاثیر منفی داشت. اما به‌طور کلی این تغییرات محسوس نبودند چرا که با توجه به جدول ۴، تاثیر زمان و غلظت آنزیم بر درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت پانکراتین معنی‌دار نبود. بیشترین میزان درجه هیدرولیز (۲۳/۶۰ درصد)،

در زمان هیدرولیز ۷۱/۶۸ و غلظت آنزیم ۱/۹۵ درصد حاصل شد. بنابراین بیشترین میزان درجه هیدرولیز با استفاده از آنزیم آلکالاز حاصل شد. مشابه با این یافته‌ها کاوه و همکاران (۱۳۹۸) و کنگ و همکاران (۲۰۰۷) نیز به‌ترتیب با هیدرولیز پروتئین شنبلیله و گلوتن گندم گزارش کردند که میزان درجه هیدرولیز حاصل از آلکالاز بیشتر از پانکراتین بود [۴۱ و ۴۲]. کاهش میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان می‌تواند ناشی از هیدرولیز بیش از حد سوبسترای پروتئینی و تاثیر بازدارندگی پپتیدهای نهایی تولیدی باشد [۴۳]. از سوی دیگر کاهش میزان سرعت هیدرولیز آنزیمی می‌تواند ناشی از کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی موجود در جهت هیدرولیز و همچنین غیر فعال شدن آنزیم پروتئازی باشد [۴۴]. این نتایج مشابه با یافته‌های شرافت و همکاران (۲۰۱۳)، یو و همکاران (۲۰۰۹) و یاسمی و همکاران (۲۰۱۳) به‌ترتیب در هیدرولیز پروتئین ضایعات پس از پخت ماهی هوور، ماهی تیان و امعاء و احشا ماهی کپور سرگنده می‌باشد، که گزارش کردند میزان درجه هیدرولیز با افزایش بیش از حد زمان هیدرولیز کاهش یافت [۴۵-۴۷].

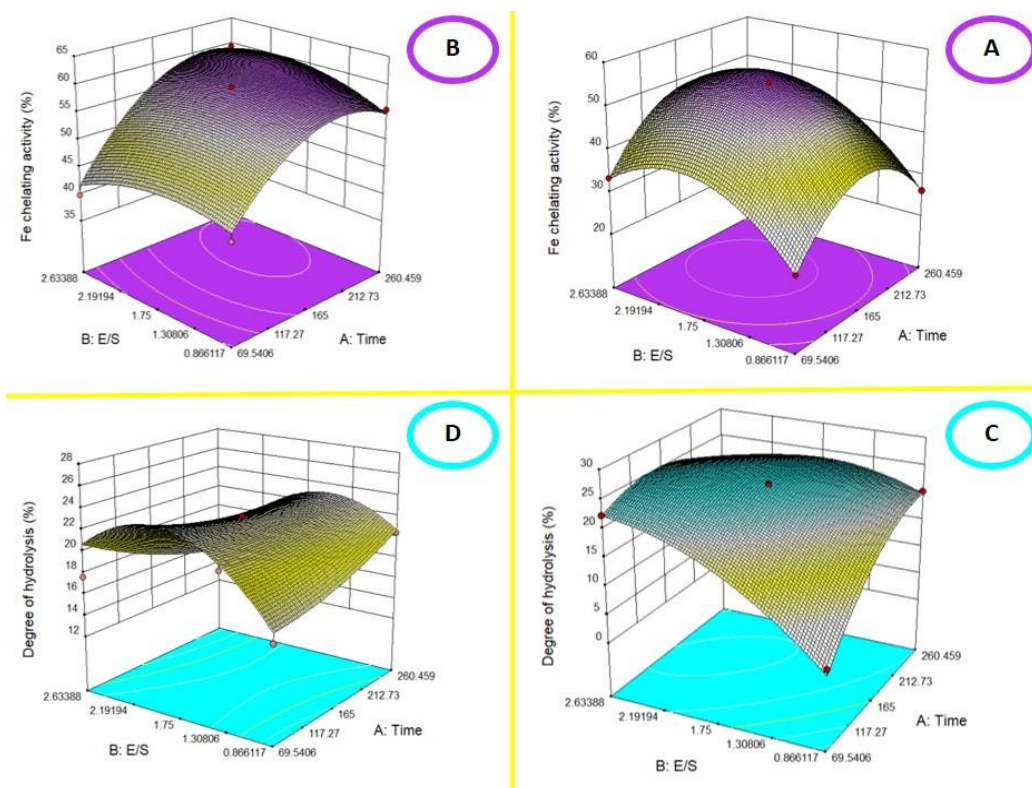


Figure 3- The effect of hydrolysis time, enzyme to substrate ratio and proteases type on Fe chelating activity and degree of hydrolysis of protein hydrolysate of skipjack viscera (A and C: hydrolysis with alcalase, B and D: hydrolysis with pancreatin)

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 (۴۹/۷۸ درصد)، ظرفیت ضد اکسایشی کل (۰/۹۷۱ جذب در ۶۹۵ نانومتر)، مهار رادیکال نیتریک اکسید (۵۸/۸۲ درصد)، احیاء کنندگی یون آهن (۰/۷۷۱ جذب در ۷۰۰ نانومتر) با آنزیم آلکالاز در زمان هیدرولیز ۱۴۶/۹ دقیقه و غلظت آنزیم ۱/۹۴ درصد و بیشترین میزان شلاته‌کنندگی یون آهن (۵۹/۴۶ درصد) با آنزیم پانکراتین در زمان هیدرولیز ۱۷۱/۶۷ دقیقه و غلظت آنزیم ۲/۱۷ درصد حاصل می‌شود. در این شرایط درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آلکالاز بیشتر از پانکراتین و به میزان ۲۴/۶۵ درصد پیش بینی شد. جهت ارزیابی اعتبار مدل، هیدرولیز تحت این شرایط انجام شد. فعالیت مهار رادیکال DPPH، ظرفیت ضد اکسایشی کل، مهار رادیکال

نیتریک اکسید، احیاء کنندگی یون آهن با آنزیم آلکالاز به ترتیب ۴۷/۵۶ درصد، ۰/۸۵۰ جذب در ۶۹۵ نانومتر، ۵۵/۸۲ درصد و ۰/۸۱۲ جذب در ۷۰۰ نانومتر و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده حاصل از پانکراتین ۶۰/۵۷ درصد محاسبه شد. درجه هیدرولیز حاصل از فعالیت آلکالاز نیز بیشتر از پانکراتین و به ترتیب به میزان ۲۵/۱۲ درصد و ۲۰/۳۵ درصد بود. این نتایج حاکی از توانایی بسیار خوب مدل جهت پیش‌بینی تاثیر متغیرهای زمان و غلظت آنزیم بر فرآیند هیدرولیز می‌باشد.

۴- نتیجه گیری

این پژوهش با هدف بررسی تاثیر شرایط هیدرولیز و نوع پروتئاز بر ویژگی‌های ضد اکسایشی و درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی صورت گرفت. نتایج نشان داد که ویژگی‌های

پپتیدها بستگی دارد. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشا ماهی هوور مسقطی توسط آنزیم آلکالاز در زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم از پتانسیل ضداکسایشی بسیار زیادی برخوردار است که قابلیت رقابت با ترکیبات ضداکسایشی سنتزی پر کاربرد در صنایع غذایی و استفاده در فرمولاسیون های غذایی جهت تولید محصولات فراسودمند را دارد.

۵- منابع

- [1] Amiri, S., Rajabi, M. (2022). An overview of the application of natural antimicrobial compounds from plant, animal and microbial origin in foods. *Journal of food science and technology*, 18(119):143-56.
- [2] Jafari, A., Esmaili, M., Amiri, S., Heidari, R. (2021). Rheological, antioxidant, physicochemical, and biochemical characterization of Iranian monofloral honeys. *Journal of Food and Bioprocess Engineering*, 4(1):43-52.
- [3] Amiri, S., Sowti Khiabani, M., Rezazadeh Bari, M., 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*, 16(91):65-79.
- [4] Radi, M., Shadikhah, S., Sayadi, M., Kaveh, S., Amiri, S., Bagheri, F. (2023). Effect of *Thymus vulgaris* Essential Oil-Loaded Nanostructured Lipid Carriers in Alginate-Based Edible Coating on the Postharvest Quality of Tangerine Fruit. *Food and Bioprocess Technology*, 16(1):185-98.
- [5] Rezazadeh-Bari, M., Najafi-Darmian, Y., Alizadeh, M., Amiri, S. (2019). Numerical optimization of probiotic Ayran production based on whey containing transglutaminase and Aloe vera gel. *Journal of food science and technology*, 56:3502-12.
- [6] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., 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):129-41.
- [7] Hashemi, SM., Abedi, E., Kaveh, S., Mousavifard, M. (2022). Hypocholesterolemic,

ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده تحت تاثیر نوع آنزیم، زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم می باشند. مقایسه فعالیت ضداکسایشی هیدرولیز شده های حاصل از فعالیت آلکالاز و پانکراتین نشان داد که آنزیم آلکالاز به عنوان یک اندوپپتیداز منجر به تولید پروتئین هیدرولیز شده با ویژگی های ضداکسایشی قوی تری نسبت به پانکراتین شد. مطالعات نشان داده است که ویژگی های ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده به شرایط هیدرولیز (دما، زمان و غلظت آنزیم)، درجه هیدرولیز و توالی و ترکیب آمینواسیدی

antidiabetic and bioactive properties of ultrasound-stimulated exopolysaccharide produced by *Lactiplantibacillus plantarum* strains. *Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre*, 28:100334.

[8] Sadeghi Mahoonak, AR., Kaveh, S. (2022). Assessment of ACE-inhibitory and Antioxidant Activities of the Peptide Fragments from Pumpkin Seeds. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 1] 7(3):45-56.

[9] Kaveh, S., Mahoonak, AS., Ghorbani, M., Jafari, SM. (2022). Fenugreek seed (*Trigonella foenum graecum*) protein hydrolysate loaded in nanosized liposomes: Characteristic, storage stability, controlled release and retention of antioxidant activity. *Industrial Crops and Products*, 182:114908.

[10] Muhiaddin, BJ., Rani, NF., Hussin, AS. (2020). Identification of antioxidant and antibacterial activities for the bioactive peptides generated from bitter beans (*Parkia speciosa*) via boiling and fermentation processes. *Lwt*. 131:109776.

[11] Wen, L., Jiang, Y., Zhou, X., Bi, H., Yang, B. (2021). Structure identification of soybean peptides and their immunomodulatory activity. *Food Chemistry*, 359:129970.

[12] 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), 75-90.

[13] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Jafari, M., 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), 77-87.

[14] Mazloomi, SN., Mahoonak, AS., Ghorbani, M., Houshmand, G. (2020). Physicochemical properties of chitosan-coated nanoliposome loaded with orange seed protein hydrolysate. *Journal of Food Engineering*, 280:109976.

[15] Kurozawa, LE., Park, KJ., Hubinger, MD. (2011). Spray drying of chicken meat protein hydrolysate: Influence of process conditions on powder property and dryer performance. *Drying Technology*, 29(2):163-73.

[16] Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food chemistry*, 118(3):559-65.

[17] Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M., 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):436-48.

[18] Chi, CF., Wang, B., Wang, YM., Zhang, B., Deng, SG. (2015). Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) heads. *Journal of functional foods*, 12:1-0.

[19] Hemung, BO., Chin, KB. (2014). Evaluation of pH-treated fish sarcoplasmic proteins on rheological properties of fish myofibrillar protein mediated by microbial transglutaminase. *International Journal of Food Science & Technology*, 49(10):2331-7.

[20] He, S., Franco, C., Zhang, W. (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1):289-97.

[21] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Erfani Moghadam, V., Ghorbani, M., Gholamhosseinpour, A., Raeisi, M. (2023). Evaluation the antioxidant properties of purified bioactive peptides from the wastes of skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) processing, by pepsin and trypsin digestive enzymes. *Journal of Food Science and Technology*, 20 (141):200-222

[22] Nurdiana, H., Siti, Mazlina MK., Siti Nor Fadhillah, M. (2008). Optimization of protein extraction from freeze dried fish waste using response surface methodology (RSM).

International Journal of Engineering and Technology. 5(1):48-56

[23] 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*, 15(3):99-112.

[24] Jamdar, SN., Rajalakshmi, V., Pednekar, MD., Juan, F., Yardi, V., Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food chemistry*, 121(1):178-84.

[25] Tsai, PJ., Tsai, TH., Yu, CH., Ho, SC. (2007). Comparison of NO-scavenging and NO-suppressing activities of different herbal teas with those of green tea. *Food chemistry*, 103(1):181-7.

[26] 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.

[27] 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), 103-122.

[28] Meshkinfar, N., Sadeghi Mahoonak, AR., Ziaifar, AM., Ghorbani, M., Kashani Nejad, M. (2014). Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Tabriz, Journal of Food Researches*, 24(2): 215-225.

[29] Zhu, K., Zhou, H., & Qian, H. (2006). Antioxidant and free radical-scavenging activities of wheat germ protein hydrolysates (WGPH) prepared with alcalase. *Process Biochemistry*, 41(6), 1296-1302.

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

[31] Mazloomi, S. N., Sadeghi Mahoonak, A., & 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), 343-356.

[32] Kaveh, S., Hashemi, S. M. B., Abedi, E., Amiri, M. J., & Conte, F. L. (2023). Bio-Preservation of Meat and Fermented Meat Products by Lactic Acid Bacteria Strains and

- Their Antibacterial Metabolites. *Sustainability*, 15(13), 10154.
- [33] 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) :137-151
- [34] Khantaphant, S., Benjakul, S., & 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), 1139-1148.
- [35] Ahmadi, H., Yeganeh, S., & Esmaeili Kharyeki, M. (2020). Investigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Journal of Fisheries*, 73(4), 593-606.
- [36] Oche, J. I., Johnson, T. O., Akinsanmi, A. O., Jaryum, K. H., & Francis, T. (2019). In vitro Antioxidant activity and inhibition of Fe 2+ and SNP lipid peroxidation of African mistletoes (*Tapinanthus globiferus*) from three selected host plants in Jos Plateau state Nigeria. *J. App. Life Sci. int*, 20(4), 1-10.
- [37] Kurozawa, L. E., Park, K. J., & Hubinger, M. D. (2008). Optimization of the enzymatic hydrolysis of chicken meat using response surface methodology. *Journal of Food Science*, 73(5), C405-C412.
- [38] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, 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), 75-88.
- [39] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & 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), 1317-1327.
- [40] 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), 227-240.
- [41] Kong, X., Zhou, H., & Qian, H. (2007). Enzymatic preparation and functional properties of wheat gluten hydrolysates. *Food Chemistry*, 101(2), 615-620.
- [42] Kaveh, S., Sadeghi Mahoonak, A., Ghorbani, M., Sarabandi K. (2020). Comparison of antioxidant properties of fenugreek seed protein hydrolyzed with alcalase and pancreatin. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 11(4), 77-88.
- [43] 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.
- [44] Guérard, F., Guimas, L., & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of molecular catalysis B: Enzymatic*, 19, 489-498.
- [45] Sherafat, N., Motamedzadegan, A., Safari, R. (2013). The effect of hydrolysis time of skipjack tuna waste after cooking with alcalase enzyme on recycling efficiency and molecular size of hydrolyzed proteins. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 5(3), 47-54.
- [46] You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., & 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), 235-240.
- [47] Yasemi. M., Ghomi Marzdashti. M., Darnahal. T., Mohammadzadeh. B., Amini. H. (2013). Yield of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) by using enzymes. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 22(1). 149-156.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage: www.fsct.modares.ir



Scientific Research

Evaluation the effect of hydrolysis conditions and type of protease on the degree of hydrolysis and antioxidant properties of the protein hydrolysate from the skipjack fish (*Katsuwonus pelamis*) viscera by the response surface methodology

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

¹ Ph.D. 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

Oxidation in living organs causes dangerous diseases, including cancer, and in food, it causes spoilage and heavy economic losses. Synthetic antioxidants have adverse and dangerous effects on human health, therefore identifying natural antioxidant compounds is one of the main needs of the food industry. In fish processing industries, about 50-70% of fish, which are potential sources of valuable nutritional com such as essential amino acids, are produced as waste. Therefore, finding a way to optimally use these wastes and produce healthy compounds with high added value such as bioactive peptides has great importance. In this research, the effect of hydrolysis conditions (time: 30-300 min and enzyme concentration 0.5-3 %) and type of protease (alcalase and pancreatin) on the degree of hydrolysis and antioxidant properties (DPPH radical scavenging activity, Fe chelating activity, nitric oxide radical inhibition, total antioxidant capacity and Fe reducing power) of protein hydrolysate from skipjack viscera was investigated using the response surface methodology. The results showed that the optimum conditions for achieving the most antioxidant properties with alcalase and pancreatin were: hydrolysis time of 146.9 and 171.67 minutes and enzyme concentration of 1.94 and 2.17%; in these conditions, the degree of hydrolysis of the produced protein hydrolysates was 25.12% and 20.35%, respectively. Comparing the antioxidant properties of hydrolysates produced by both proteases showed that the alcalase enzyme led to the production of protein hydrolysates with stronger antioxidant properties than pancreatin. Therefore, it can be concluded that the protein hydrolysate of the skipjack fish viscera using alcalase enzyme as a healthy and value-added product can be used in the production of functional products and health supplements.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/1/7

Accepted: 2023/2/9

Keywords:

Antioxidant,

Alcalase,

Pancreatin,

Protein hydrolysate,

Skipjack

DOI: 10.22034/FSCT.20.144.131

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.144.8.2

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