مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تولید سوسیس فراسودمند با استفاده از پروتئین های هیدرولیز شده هسته پرتقال به عنوان نگهدارنده طبیعی و با قابلیت کاهندگی نیتریک اکسید

نرگس مظلومی[۱،۲]؛ آتنا رمضانی[۱،۲]؛ بهناز مشرفی [*۳،۴]

۱- استادیار گروه تغذیه، دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲- مرکز تحقیقات سلامت فرآورده‌های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳- مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- کارشناس ارشد علوم تغذیه سازمان غذا و دارو، تهران، ایران

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۱

تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۰۸/۱۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۸/۲۱

کلمات کلیدی:

هسته پرتقال،

پپتیدهای زیست فعال،

آنتی اکسیدانی،

یون نیتریت،

سوسیس فراسودمند.

DOI: 10.48311/fsct.2026.83904.0

* مسئول مکاتبات:

samira.mazloomi@yahoo.com

چکیده

آرد چربی گیری شده هسته پرتقال، حدود ۲۶درصد پروتئین دارد و می‌تواند به عنوان منبع غنی و مقرون به صرفه برای تولید پروتئین‌ها و پپتیدهایی با منشاء گیاهی مورد استفاده قرار گیرد. در این مرحله از پژوهش ابتدا استخراج کنسانتره پروتئین با خلوص بالا صورت گرفت، سپس با استفاده از اثر آنزیم هیدرولیز کننده پپسین در نسبت آنزیم (۱تا ۳٪)و بازه زمانی (۲تا ۵ساعت)در دمای ۴۰-۳۰درجه سانتیگراد، پروتئین آرد چربی گیری شده هسته پرتقال هیدرولیز شد و شرایط بهینه برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای بهترین فعالیت مهارکنندگی یون نیتریت انتخاب شد. تیمار بهینه در شرایط دمایی، زمانی و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا که توسط نرم افزار پیشنهاد شده بود،(دمای۳۹/۲۷درجه سانتی‌گراد،زمان:۳/۵ساعت و نسبت ۲/۸۹درصد وزنی-وزنی آنزیم به سوبسترا با بیشترین فعالیت بازدارندگی یون نیتریت) تولید گردید که این مقدار ۹۳/۴۶درصد در قدرت بازدارندگی یون نیتریت بود. در مرحله بعدی تولید سوسیس ماهی حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال در محیط آزمایشگاهی و سپس اندیس پراکسید و فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه ها طی دوره نگهداری انجام شد. بطورکلی کاربرد پروتئین هیدرولیز شده در فرمولاسیون سوسیس ماهی نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده به‌طور معنی‌دار قادر به تاخیر اکسیداسیون لیپیدی طی دوره نگهداری میباشد و نیز نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال(افزایش غلظت آن از ۰/۵به ۲/۵درصد)به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌ها شد.نتایج حاصل نشان داد که فرمولاسیون سوسیس ماهی حاوی۱/۵درصد پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال به‌عنوان یک محصول با ارزش غذایی بالا و بدون نگهدارنده قابلیت تولید صنعتی و عرضه به بازار را دارد.

۱-مقدمه

امروزه هیدرولیز آنزیمی، رایج ترین روش جهت اصلاح ویژگی پروتئین‌های گیاهی و حیوانی در نظر گرفته می‌شود. این نوع هیدرولیز در مقایسه با هیدرولیز شیمیایی در شرایط ملایم‌تری انجام می‌شود و در نتیجه آسیب کمتری به سوبسترای پروتئینی وارد می‌کند. این روش جهت تولید پپتید به منظور غنی سازی نوشیدنی‌ها و مواد غذایی، تغذیه بیماران، تولید ترکیبات زیست فعال (بازدارنده‌های آنزیم‌های افزایش دهنده‌ی فشار خون و دیابت نوع دو، آنتی اکسیدان‌های طبیعی) در مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گرفته است. یکی از خواص این پپتیدها خاصیت مهارکنندگی اکسید نیتریک می‌باشد که به عنوان ترکیب حد واسط در تولید نیتروزآمین ها عمل می نماید. نمک های نیترات و نیتریت که به عنوان یک افزودنی جهت تثبیت رنگ و مهار رشد برخی از میکروارگانسیم‌ها در فرآورده های گوشتی استفاده می شوند، اکسیدکننده‌های بسیار قوی می باشند. در اثر واکنش نیتریت با آمین های نوع دوم و سوم، ترکیب سرطان زای نیتروزآمین تشکیل می شود؛ که در صورت وجود ترکیب آنتی اکسیدان در گوشت عمل آوری شده، خیلی سریع تر از آمین ها با نیتریت واکنش داده و از تشکیل نیتروزآمین جلوگیری می کند (۱).

سوسیس و کالباس به عنوان قدیمی ترین و پرمصرف ترین غذای آماده جایگاه ویژه ای در سبد غذایی مصرف کنندگان جهان دارد. سرانه مصرف سوسیس و کالباس برای هر شهروند ایرانی حدود ٤ گیلوگرم است (۲). بحثی که امروزه در مورد این فرآورده ها مطرح است، استفاده از نیترات و نیتریت به عنوان نگه دارنده است. نمک های نیتریت و نیترات برای عمل آوری گوشت ها در تثبیت رنگ قرمز و جلوگیری از فعالیت ریز زنده های عامل فساد و مسمومیت و هم چنین بهبود طعم استفاده می شود. نیترات بر اثر باکتری های آغازگر موجود در گوشت و یا به همراه نیترات و اسید آسکوربیک، تبدیل به نیتریت می شود و نیتریت نیز بر اثر حرارت به اکسید نیتریک تبدیل و باعث رنگ مطلوب محصول می گردد. اما با وجود مزایای زیاد، مقدار بالای نیتریت در محصولات گوشتی از جنبه سلامتی ، مضر و زیان بخش است. در نتیجه هیدراسیون اکسید نیترو توسط احیا نیتریت سدیم، ممکن است اسید نیترو تولید شود که در واکنش با آمین های نوع دوم و اسیدهای آمینه موجود در ماهیچه های گوشتی به فرم نیتروز به ویژه به شکل نیتروزآمین تشکیل شود که موجب سرطانی شدن سلول های بدن خواهد شد. بنابراین مقدار باقی مانده این ترکیبات در فرآورده های گوشتی اهمیت فراوانی دارد (۳). مشکین فر و همکاران (۲۰۱٦) پروتئین حاصل از امعاء و احشا گوسفند را به روش آنزیمی هیدرولیز کردند و سپس در غلظت های ۷۰۰ ، ۱۰۰۰ و ۱۲۵۰ ppm به فرمولاسیون سوسیس مرغ افزوده و با اندازه گیری اندیس تیوباربیوتوریک اسید و اندیس پراکسید میزان اکسیداسیون چربی را بررسی کردند و در نهایت اعلام کردند که با افزایش پروتئین هیدرولیز شده میزان اکسیداسیون به طور چشم گیری کاهش یافته و قابل مقایسه با BHT بوده است (۱). ایزد خواستی و همکاران (۲۰۱۹)، تاثیر مخلوط کنجاله کنجد و آرد سویا بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و بافتی سوسیس بررسی کردند. نتایج حاصل نشان داده است که با به کار بردن کنجاله کنجد و سویا در سوسیس آلمانی میتوان محصولی با کیفیت فیزیکی، شیمیایی و بافتی قابل قبول با ارزش تغذیه ای بالاتر تولید کرد و در پژوهش انجام گرفته مقدار جایگزینی ۰/۰٦(۰/۰۳ آرد کنجاله کنجد و ۰/۰۳ آرد سویا) به عنوان بهترین تیمار معرفی گردید (٤). شریعت علوی و همکاران (۲۰۲۲)، با بررسی تاثیرافزودن پروتئین هیدرولیز شده دانه گوجه فرنگی بر خصوصیات سوسیس تولیدی به این نتیجه دست یافتند که نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده میزان نیتریت باقیمانده کمتری نسبت به نمونه شاهد داشتند و با گذشت زمان از میزان نیتریت باقیمانده در تمام نمونه‌ها کاسته شد؛ همچنین میزان شاخصهای روشنایی و قرمزی محصول با گذشت زمان افزایش پیدا کرد. بنابراین پروتئین هیدرولیز شده حاصل از دانه‌ی گوجه فرنگی دارای ویژگی کاهندگی نیتریت مناسبی بوده و میتواند بعنوان ترکیبات فراسودمند در فرمولاسیون

فرآورده های گوشتی به کار گرفته شود (۵). نتایج حاصل از تحقیقات انجام شده، مشخص شده است که هسته پرتقال دارای مقادیر مناسبی از مواد معدنی، از جمله کلسیم و روی می‌باشد و میزان اسیدهای آمینه آبگریز در این هسته نیز بالاست؛ در نتیجه از آرد چربی گیری شده حاصل از هسته پرتقال می‌توان به‌عنوان مواد افزودنی موثر در غذاها و نیز تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده استفاده نمود (٦). با توجه به غنی بودن هسته چربی گیری شده پرتقال از نظر ترکیب پروتئین و اسیدهای آمینه، در این تحقیق تلاش می‌شود تا از هسته پرتقال به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با ویژگی کاهندگی اکسید نیتریک استفاده گردد؛ در مرحله بعدی تولید سوسیس ماهی حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال در محیط آزمایشگاهی و سپس اندیس پراکسید و فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه ها طی دوره نگهداری انجام شد.در نهایت ویژگی‌های محصول تولیدی مورد مطالعه قرار گیرد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

هیدرولیز پروتئین حاصل از آرد چربی‌گیری شده هسته پرتقال با آنزیم پپسین در دما و pH اپتیمم این آنزیم انجام شد. آنزیم با غلظت‌های ۱، ۲ و ۳ درصد وزنی به وزنی (آنزیم به سوبسترا) به محلول پروتئینی افزوده و هیدرولیز در مدت زمان‌های ۲ تا ۵ ساعت و دمای بهینه (دمای ٤٠-٣٠ درجه سانتی‌گراد) و در pH بهینه‌ی این آنزیم در انکوباتورهای شیکردار انجام گرفت. در انتها در دمای ۸۵ درجه سانتیگراد به مدت ۱۰ دقیقه واکنش آنزیمی متوقف و در مرحله بعد جهت حذف ترکیبات اضافی، سانتریفوژ کردن درrpm ۱۲۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه انجام شد و روماند حاصل پس از جمع آوری جهت انجام آزمون‌های بهینه سازی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگه داری شد (۷).

۲-۲- بهینه‌یابی فرآیند جهت دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت بازدارندگی یون نیتریت

به منظور بهینه‌یابی فرایند هیدرولیز به منظور رسیدن به بیشینه خواص ضد اکسایش، از نرم افزار Design Expert و روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی برای سه متغیر مستقل: غلظت آنزیم به سوبسترا(X1)، دما (X2) و زمان هیدرولیز (X3) در سه سطح (۱+، ۰، ۱-) استفاده شد. پاسخ‌های مورد بررسی اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی اکسید نیتریک بود. به این منظور ۲۰ تیمار تصادفی، با در نظر گرفتن ٦ تکرار در نقطه مرکزی توسط نرم افزار Design Expert پیشنهاد شد.

Table 1: Levels of independent variables used for optimizing the nitrite inhibition of hydrolyzed orange seed protein.

Levels				independent variables
-1	0	+1		
3	2	1	X_1	**Enzyme-to-substrate ratio (%)**
5	3.5	2	X_2	**Time (hr)**
40	35	30	X_3	**Temperature (°C)**

مدل رگرسیونی به منظور پیش بینی پاسخ مد نظر قدرت بازدارندگی یون نیتریت به شرح زیر ارائه شده است:

معادله ۱ : مدل رگرسیونی بازدارندگی یون نیتریت توسط آنزیم پپسین:

$$Y= + b_0+ b_1x_1+ b_2x_2 + b_3x_3- b_{12}x_1x_2 - b_{13}x_1x_3 - b_{23}x_2x_3+ b_{11}x_1^2- b_{22}x_2^2 + b_{33}x_3^2$$

پاسخ یا متغیر وابسته (بازدارندگی یون نیتریت توسط آنزیم پپسین در مقادیر واقعی)، b_0 مقدار ثابت، b_1، b_2، b_3 اثرات خطی، b_{11}،b_{22}، b_{33} اثرات درجه دوم، b_{12} ، b_{23} و b_{13} اثرات متقابل می‌باشند. تیمارهای پیشنهاد شده توسط نرم افزار برای هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال توسط آنزیم پپسین به ترتیب در جدول زیر ارائه شده است.

Table 2: Proposed random treatments for the hydrolysis of orange seed protein by pepsin enzyme

Time (hr)	Temperature (°C)	Enzyme-to-substrate ratio (%)	Treatment
2	30	1	1
5	30	1	2
3.5	30	2	3
2	30	3	4
5	30	3	5
3.5	35	1	6
2	35	2	7
3.5	35	2	8
3.5	35	2	9
3.5	35	2	10
3.5	35	2	11
3.5	35	2	12
3.5	35	2	13
5	35	2	14
3.5	35	3	15
2	40	1	16
5	40	1	17
3.5	40	2	18
2	40	3	19
5	40	3	20

۳-۲- اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک

۶۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیز شده با ۶۰ میکرولیتر از سدیم نیتروپروساید در بافر نمکی فسفات ۰/۰۲۵ مولار مخلوط و سپس به مدت ۱۵۰ دقیقه در دمای اتاق درون انکوباتور قرار داده شد. سپس به مقدار مساوی ۱۲۰میکرولیتر معرف گریس (شامل ۱ درصد سولفانیل آمید، ۱ درصد نفتیل اتیلن دی هیدروکلراید و ۲/۵ میلی لیتر فسفریک اسید که با آب مقطر به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسیده است) به آن ها افزوده و مقدار جذب در طول موج ٤٥٦ نانومتر اندازه گیری گردید (۸).

درصد مهارکنندگی اکسید نیتریک = ((جذب نمونه- جذب شاهد)/ جذب شاهد) ×۱۰۰

٤-۲- اندیس پراکسید

به‌منظور اندازه‌گیری اندیس پراکسید، به ۳ g نمونه، ml ۳۰ محلول اسید استیک کلروفرمی (نسبت کلروفرم به اسید استیک ۲:۳) اضافه شد. سپس ml ۰/۵ محلول یدید پتاسیم اشباع به محلول اضافه و به‌شدت همزده شد. در مرحله‌ی بعد ml ۳۰ آب مقطر افزوده شده و محلول حاصل مجددا همزده شد. پس از آن محلول حاصل با تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تا زمان نمایان شدن رنگ زرد روشن تیتر شد. سپس ml ۰/۵ محلول نشاسته ۱٪ به‌عنوان معرف برای ایجاد رنگ آبی به محلول شد. تیتراسیون تا زمان ناپدید شدن رنگ آبی ادامه یافت. اندیس پراکسید با استفاده از معادله‌ی ۲ محاسبه شد (۹).

(۲)

$$\text{اندیس پراکسید}(\text{mEq}/Kg) = \frac{S\times M\times 1000}{m}$$

در این معادله S، حجم تیوسولفات مصرفی (ml)، M مولاریته‌ی تیوسولفات و m وزن نمونه (g) می‌باشد.

۵-۲- تولید سوسیس ماهی حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال

به‌منظور تولید سوسیس از فرمولاسیون Hajfathalian و همکاران (۲۰۱۹) با کمی تغییرات استفاده شد. به‌طور کلی فرمولاسیون سوسیس شامل گوشت چرخ کرده ماهی مارلین ۷۰٪، روغن آفتابگردان ۵٪، آب و یخ ۱۵٪، نشاسته و گلوتن ۵٪، نمک و ادویه ۲٪ و پودر پیاز ۳٪ بود. اجزای فرمولاسیون در نسبت های ذکر شده توزین و به همراه نیمی از میزان آب و یخ به مخلوط کن افزوده شدند. سپس فرآیند اختلاط نیمی از آب و یخ باقی مانده به همراه پروتئین هیدرولیز شده (با بالاترین فعالیت مهار کنندگی اکسید نیتریک)، به‌میزان ۲/۵، ۱/۵، ۰/۵ و ۰ درصد انجام گرفت (جدول ۳). نمونه حاوی ویتامین ث به‌میزان ۱/۵ درصد به‌عنوان نمونه کنترل مثبت در نظر گرفته شد. سپس خمیر حاصل با استفاده از دستگاه پرکن در پوشش‌های پلی آمیدی بسته بندی شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد حرارت داده شد و سپس در آب سرد ۸ درجه سانتی گراد قرار داده شد و پس از رسیدن دمای سوسیس به دمای اتاق، نمونه‌ها به یخچال با دمای ٤ درجه سانتی گراد منتقل و به‌مدت ۳۰ روز نگهداری شد. ارزیابی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (اندازه‌گیری اندیس پراکسید) و فعالیت مهارکنندگی اکسید نیتریک نمونه‌ها در فواصل زمانی ۳۰ و ۲۵، ۲۰، ۱۵، ۱۰، ۵، ۰ انجام شد (۱۰).

Table 3: Different treatments of fish sausage

Sample	Hydrolyzed Proteins (%)	(%) Vit C
Blank	0	0
Treatment1	0.5	0
Treatment2	1.5	0
Treatment3	2.5	0
Treatment4	0	1.5

٦-۲- تجزیه و تحلیل آماری

به منظور بهینه یابی فرآیند هیدرولیز کنسانتره پروتئینی هسته پرتقال، از روش سطح پاسخ با طرح مرکب مرکزی استفاده

شد و ترسیم نمودارها توسط نرم افزار Design Expert صورت گرفت. در این تحقیق از نرم افزار آماری Design Expert برای اعمال طرح آماری سطح پاسخ استفاده شد. طرح آماری مذکور با طراحی مرکب مرکزی و تعداد ۲۰ ران مشاهده که شامل نقطه ی مرکزی با شش تکرار و هفت نقطه‌ی محوری و هفت نقطه‌ی فاکتوریلی بود طراحی گردید. متغیرهای مستقل مورد آزمون شامل زمان هیدرولیز (۲-۵ساعت) و میزان آنزیم مصرفی (۳- ۱درصد) و دمای هیدرولیز (۴۰-۳۰ درجه سانتی‌گراد)، متغیر وابسته در این پژوهش شامل فعالیت مهارکنندگی یون نیتریت بود. تجزیه و تحلیل مربوط به دیگر نتایج پژوهش در قالب آزمایش فاکتوریل صورت گرفت و مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد انجام شد. پژوهش حاضر به عنوان طرح تحقیقاتی با شماره طرح ۵۶ در مرکز ملی تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران ثبت شد.

۳-نتایج و بحث

۳-۱- ترکیب شیمیایی

محتوای رطوبت، خاکستر، چربی، پروتئین و کربوهیدرات آرد کنجاله اولیه روغن گیری شده و کنسانتره پروتئین هسته پرتقال در جدول ۳ آورده شده است. نتایج نشان داد که عمل چربی گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی کنسانتره پروتئین شد (۴۳/۳۸٪ به ۵/۴۶٪). محتوای پروتئین آرد کنجاله اولیه ۲۲/۴۷٪ بود، در حالی‌که کنسانتره پروتئین به‌دست آمده دارای ۷۵/۱۲ ٪پروتئین بود.

همان‌طورکه در جدول مشاهده می‌گردد، میزان رطوبت هسته پرتقال چربی‌گیری شده،۰/۵۲± ۷/۱۳ درصد بود. این مقدار بیشتر از مقادیر گزارش شده در منابع (۰/۸± ۵/۵۰) است و میزان چربی و خاکستر هسته پرتقال چربی‌گیری شده بر اساس وزن خشک، به ترتیب (۰/۱۵± ۵/۴۶) و (۰/۱۷± ۲/۶۶) بود که به ترتیب کمتر (۰/۱۲± ۵۴/۲) و بیشتر (۰/۲۳± ۲/۵) از مقادیر گزارش شده در منابع هستند (۵). میزان پروتئین آرد کامل چربی‌گیری شده حدود۳/۵۱ ± ۲۲/۴۷ درصد و این مقدار در کنسانتره پروتئینی حدود۱/۴۱ ± ۷۵/۱۲ درصد اندازه‌گیری شد. با توجه به نتایج حاصل، با اعمال فرایند روغن‌گیری، میزان پروتئین بیشتری به‌دست آمد و عمل چربی‌گیری موجب کاهش قابل ملاحظه در چربی کنسانتره پروتئین شد. علت تفاوت ترکیبات شیمیایی نمونه به‌کار گرفته شده‌ی این پژوهش با پژوهش‌های قبل را می‌توان به دلیل اختلاف در نوع واریته و نوع فرایند نسبت داد (۲).

Table 3: Chemical composition of defatted orange seed meal and protein concentrate

	defatted orange seed meal	protein concentrate
Protein (N×6.25)	22.47 ± 3.51	75.12 ±1.41
Fat	43.38 ± 0/58	5.46 ± 0/15
Moisture	7.13 ± 0/52	8.79 ± 0/17
Ash	2.66 ±0/17	1.6 ± 0/23
Carbohydrate	24.36± 0/12	9.03

*All data were expressed as a mean of 3 replications ± standard deviations.

* Values were reported based on dry weight.

۲-۳- بهینه سازی فرآیند به منظور دست‌یابی به تیمار با بیشترین قدرت بازدارندگی نیتریت

Table 4: Process optimization to achieve the treatment with the highest nitrite inhibition power

treatments	Enzyme concentration (%)	Temperature ° (C)	Time (hr)	Nitric oxide reducing power (%)
1	1	30	5	90.18
2	3	35	3.5	92.04
3	3	30	2	90.52
4	2	35	5	93.57
5	3	30	5	94.41
6	3	40	2	94.75
7	2	35	3.5	93.23
8	2	35	2	90.52
9	1	30	2	91.20
10	1	40	2	89.84
11	2	35	3.5	90.52
12	3	40	5	90.69
13	2	35	3.5	91.20
14	2	35	3.5	90.86
15	1	35	3.5	91.37
16	2	30	3.5	87.47
17	2	40	3.5	95.26
18	1	40	5	94.58
19	2	35	3.5	92.04
20	2	35	3.5	91.03

۳-۳- بررسی خاصیت بازدارندگی یون نیتریت

معادله ۳ با توجه به ضرایب رگرسیونی و معنی‌داری ضرایب برای پاسخ مد نظر (بازدارندگی یون نیتریت) ارائه شد:

$$Y=+۹۱/۵۰ + ۰/٦٦\ A + ۱/۱۳\ B + ۰/۵۲\ C - ۰/۲۷\ AB - ۰/٤۹\ AC - ۰/۳۲\ BC + ۰/۵۲\ A^2 - ۰/۱٦\ B^2 + ۰/۱۸\ C^2$$

شکل ۱ سطح پاسخ سه بعدی تاثیر زمان و دما بر خاصیت بازدارندگی یون نیتریت را نشان می‌دهد. همانطور که در

شکل نشان داده شده است افزایش دمای هیدرولیز از ۳۰ تا ٤۰ درجه سانتی‌گراد به‌طور معنی‌داری باعث افزایش توانایی هیدرولیز شده‌های حاصل در بازدارندگی یون نیتریت از ۸۵/۷۱ تا ۹۳/۰٤ درصد شده است. از طرف دیگر افزایش زمان هیدرولیز نیز از ۱ تا ۵ ساعت نیز باعث افزایش توانایی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال از ۸۵/٦۵ تا ۸۸/۷۲ درصد شد. به‌طور کلی بیشترین میزان بازدارندگی یون نیتریت (۹۲/۹۵ درصد) در نسبت ثابت آنزیم به سوبسترای ۲ درصد و زمان هیدرولیز ۱/۰۲ ساعت و دمای ۳۸/۸۷ درجه سانتی‌گراد حاصل شد.

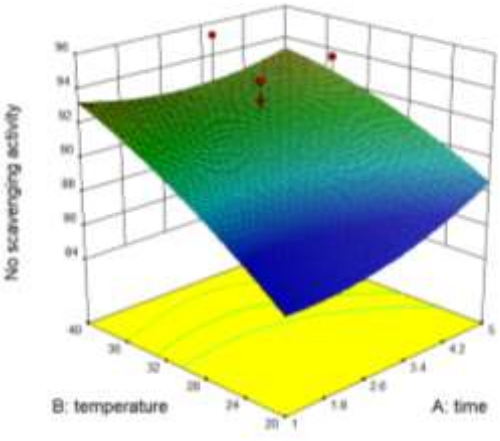

Fig 1: 3D graph for the effect of temperature and the hydrolysis time on the nitric oxide reducing power when concentration of pepsin enzyme was at optimum value (% 2)

شکل ۲ سطح پاسخ سه بعدی تاثیر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را بر خاصیت بازدارندگی یون نیتریت را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، افزایش غلظت آنزیم پپسین از ۱ تا ۳ درصد باعث افزایش توانایی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال در بازدارندگی یون نیتریت از ۹۰/۷۲ تا ۹٤/۷۲ درصد شد. از سوی دیگر زمان نیز بر توانایی هیدرولیز شده‌های حاصل در بازدارندگی یون نیتریت تاثیر معنی‌داری داشت به‌طوریکه با افزایش زمان هیدرولیز از ۱ تا ۵ ساعت، توانایی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال از ۹۰/٦۸ به ۹۲/٦۵ درصد افزایش یافت. به‌طور کلی در دمای ثابت ۳۵ درجه سانتی‌گراد بیشترین میزان بازدارندگی یون نیتریت (۹٤/۹۰ درصد) در زمان هیدرولیز ۱/۰۱ ساعت و نسبت آنزیم به‌سوبسترای ۲/۸٦ درصد حاصل شد.

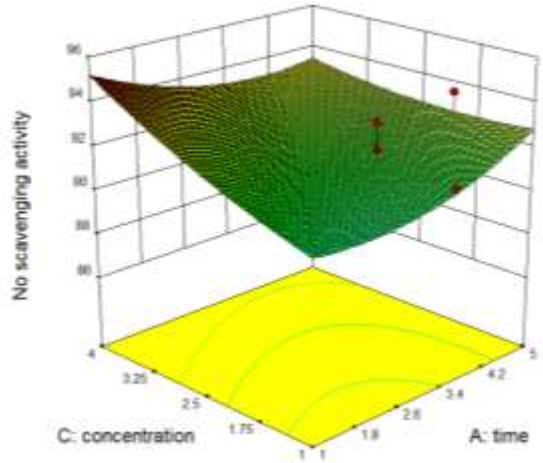

Fig 2: 3D graph for the effect of concentrationof pepsin enzyme and the hydrolysis time on the nitric oxide reducing power when the hydrolysis temperature was at optimum value (35°C)

شکل ۳ سطح پاسخ سه بعدی تاثیر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا را بر خاصیت بازدارندگی یون نیتریت را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، افزایش نسبت آنزیم پپسین به سوبسترا از ۱ تا ۳ درصد باعث افزایش خاصیت بازدارندگی یون نیتریت از ۸۵/۳۳ تا ۹۰/۲۳ درصد شد. از طرف دیگر افزایش دمای فرایند هیدرولیز از ۲۰ تا ٤٠ درجه سانتی‌گراد نیز تاثیر مثبتی بر توانایی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال داشت و باعث افزایش خاصیت بازدارندگی یون نیتریت از ۸۵/٤٦ به ۹۵/۳۱ درصد شد. به‌طور کلی در زمان ثابت هیدرولیز ۳/۵ ساعت، بیشترین میزان خاصیت بازدارندگی یون نیتریت (۹۳/٤٦ درصد) در دمای ۳۹/۲۷ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۸۹ درصد حاصل شد.

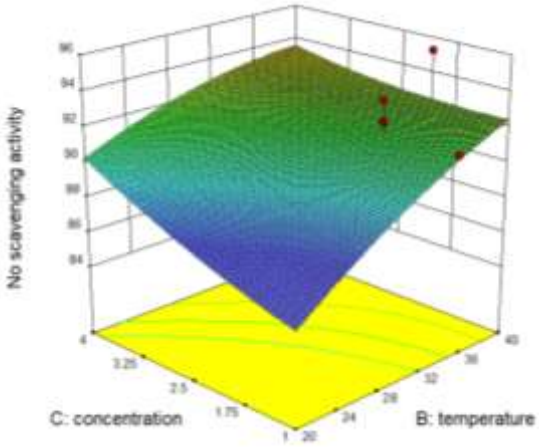

Fig 3: 3D graph for the effect of concentrationof pepsin enzyme and the hydrolysis temperature on the nitric oxide reducing power when the hydrolysis time was at optimum value (3.5 hr)

تیمار بهینه در شرایط دمایی، زمانی و نسبت غلظت آنزیم به سوبسترا (که توسط نرم افزار پیشنهاد شده بود)، تولید گردید و آزمون‌های آنتی اکسیدانی (قدرت مهار کنندگی رادیکالDPPH، قدرت احیا کنندگیFe^{3+} و ویژگی بازدارندگی یون نیتریت) به منظور تایید مقادیر پیشنهاد شده توسط نرم افزار، بر تیمار بهینه صورت گرفت و در نهایت، سوپرناتانت حاصل توسط دستگاه فریزدرایر خشک گردید و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد، نگه‌داری شد.

در پژوهش انجام گرفته توسط ذاکری و همکاران (۲۰۱۹) و شریعت علوی و همکاران (۲۰۱۹) دریافتند که به ترتیب پروتئین هیدرولیز شده دانه کدو و دانه گوجه فرنگی از قابلیت مهارکنندگی اکسید نیتریک مناسبی برخوردار می‌باشند و از این رو میتوانند به عنوان ترکیبی طبیعی با خواص مهارکنندگی اکسید نیتریک بالا، جایگزین نگهدارنده های سنتزی در محصولات غذایی از جمله فرآورده های گوشتی شوند. همچنین در این پژوهش‌ها مشخص گردید که با افزایش غلظت آنزیم، میزان فعالیت مهار کنندگی نیز افزایش می‌یابد (۱۱،۲).

در پژوهش انجام گرفته توسطZhonggao و همکاران (۲۰۰۵) ویژگی مهار رادیکال نیتریت را در عصاره شاه توت بررسی کردند و نشان دادند که ظرفیت به دام اندازی رادیکالهای نیتریت در غلظتهای پایین ناچیز بوده و به تدریج با افزایش غلظت عصاره، قدرت بازدارندگی نیز بیشتر شده است (۱۲). در پژوهشی دیگر، نیکخواه و همکاران (۲۰۱۱) قدرت مهارکنندگی نیتریک اکسید آنتوسیانین های سه گونه توت را مورد بررسی قرار دادند و نشان دادند که قدرت

مهارکنندگی توسط عصاره آنتوسیانینی توت‌ها همزمان با افزایش غلظت عصاره افزایش یافت (۱۳).

٤-۳- اندیس پراکسید

ماهی حاوی میزان زیادی لیپیدهای غیر اشباع است بنابراین به‌میزان زیادی در معرض لیپولیز و اتواکسیداسیون می‌باشد. تماس گوشت ماهی با اکسیژن اتمسفر منجر به اکسیداسیون آن و تولید هیدروپراکسیدها می‌گردد. اندیس پراکسید میزان اکسیداسیون اولیه لیپیدها را نشان می‌دهد (١٤). تغییرات اندیس پراکسید سوسیس ماهی در طی دوره ۳۰ روز نگهداری در دمای یخچال در شکل ٤ نشان داده شده است. به‌طور کلی اندیس پراکسید تمامی نمونه‌ها طی دوره نگهداری به طور معنی داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). نمونه کنترل از بیشترین میزان اندیس پراکسید برخوردار بود به‌طوریکه میزان اندیس پراکسید آن از (meq O_2/kg)٥/٦ در روز صفر به (meq O_2/kg) ۳۲/۷۱ در روز سی ام نگهداری رسید. از سوی دیگر کاربرد پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های ۱/۵ و ۲/۵ درصد به‌طور معنی‌داری باعث کاهش سرعت افزایش اندیس پراکسید شد، قابل ذکر است که اندیس پراکسید نمونه حاوی پروتئین هیدرولیز شده به میزان ۰/۵ درصد تفاوت معنی‌داری با نمونه کنترل نداشت ($p>۰/۰۵$). در انتهای دوره نگهداری، در بین نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده کمترین میزان اندیس پراکسید ((meq O_2/kg) (۱۹/۵۵) مربوط به تیمار ۳ حاوی ۲/۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده بود. از سوی دیگر اندیس پراکسید نمونه کنترل و تیمار ۱ در روز ۲۰ نگهداری و نمونه ٤، ۳ و ۲ در روز۳۰ نگهداری کاهش یافت؛ این روند کاهشی می‌تواند به‌دلیل تجزیه هیدروپراکسیدها و تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون مانند آلدهیدها و کتون‌ها باشد (۱۵). مقایسه تیمار حاوی آنتی اکسیدان ویتامین ث (تیمار٤) با تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده نشان داد که تیمار ٤ در تمامی روزهای نگهداری از کمترین میزان اندیس پراکسید برخوردار بود. این امر نشان می‌دهد با وجود قابلیت قابل توجه پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال، اما این ترکیب قادر به کنترل اکسیداسیون سوسیس به‌میزان آنتی اکسیدان ویتامین ث نبود. مکانیسم دقیق محافظتی پروتئین‌های هیدرولیز شده در تاخیر اکسیداسیون لیپیدها مشخص نشده است اما گزارش شده است که ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی مانند پروتئین‌های هیدرولیز شده با رادیکال‌های آزاد لیپیدپراکسی و لیپیداکسی واکنش داده و بنابراین از تجزیه بیشتر آنها جلوگیری می‌کنند. مطالعات نشان داده است که اندازه مولکولی، ترکیب و توالی آمینواسیدی پروتئین‌های هیدرولیز شده نقش بسیار مهمی در تعین خاصیت آنتی اکسیدانی آنها دارند (١٤). مشابه با این یافته‌ها Hajfathalian و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که اندیس پراکسید سوسیس ماهی حاوی پروتئین هیدرولیز شده اشپل ماهی کپور در طی دوره نگهداری افزایش یافت اما این روند افزایش در نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیزشده نسبت به نمونه کنترل به‌طور معنی‌داری کمتر بود (۱۰). همچنین Feng و همکاران (۲۰۲۰) با تولید سوسیس ماهی حاوی نانوامولسیون آلفا توکوفرول گزارش کردند که اندیس پراکسید نمونه‌های سوسیس طی ١٦ روز نگهداری به‌طور معنی‌داری افزایش یافت اما افزودن نانوامولسیون حاوی آلفا توکوفرول با غلظت mg/kg ۵۰۰ به‌طور معنی‌داری باعث کاهش روند افزایشی اندیس پراکسید شد (١٦).

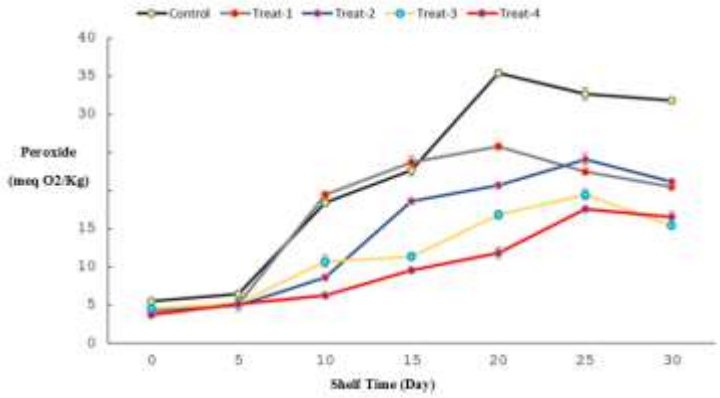

Fig 4: Peroxide index of fish sausage containing different concentrations of hydrolyzed orange seed protein during storage **Control:**Sample without hydrolyzed protein., **Treat 1:** Sample with 0.5% of hydrolyzed protein., **Treat 2:** Sample with 1.5% of hydrolyzed protein., **Treat 3:** Sample with 2.5% of hydrolyzed protein., **Treat 1:** Sample with 1.5% of Vit C.

۳-۵- فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید طی نگهداری

در شکل ۵ تغییرات فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌های سوسیس طی دوره نگهداری نشان داده شده است. در ابتدای دوره نگهداری کمترین میزان فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید مربوط به نمونه کنترل و تیمار ۱ به‌ترتیب به میزان ۳٤/۱۸ و ٤۰/٤۲ درصد بود، بین این دو تیمار تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($p>0/05$). از سوی دیگر بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید مربوط به تیمار ۳ به میزان ۹۰/۱۷ درصد بود. به‌طور کلی فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید تمامی نمونه‌ها طی دوره نگهداری روند کاهشی داشت و این میزان کاهش در نمونه ٤ (حاوی ویتامین ث) بیشتر بود؛ این امر می‌تواند به‌دلیل حساسیت بیشتر ویتامین ث نسبت به پروتئین هیدرولیز شده به شرایط محیطی مانند نور، اکسیژن و .... باشد (۱۷). در مورد نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال افزایش غلظت آن از ۰/۵ به ۲/۵ درصد به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌ها شد به‌طوریکه در انتهای دوره نگهداری بیشترین ظرفیت آنتی اکسیدانی مربوط به نمونه ۳ به‌میزان ٦۲/۷۳ درصد و کمترین فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید مربوط به نمونه ۱ به‌میزان ۱٤/۲ درصد بود. فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید ناچیز اما غیر قابل انکار نمونه کنترل می‌تواند به‌دلیل پتانسیل آنتی اکسیدانی ادویه جات مورد استفاده در فرمولاسیون سوسیس به‌دلیل ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی آنها باشد. افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید سوسیس با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به‌دلیل پتانسیل آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده باشد. مشابه با این یافته‌ها Tawali و همکاران (۲۰۲۳) با افزودن ژلاتین ماهی سرماری به سوسیس گوشت گاو گزارش کردند که نمونه‌های حاوی ژلاتین دارای قابلیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی در مهار رادیکال آزاد DPPH داشتند و این قابلیت با افزایش غلظت ژلاتین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت. از سوی دیگر آنها کاهش معنی‌دار میزان قابلیت آنتی اکسیدانی را طی دوره ۲۸ روز نگهداری در یخچال گزارش کردند (۱۸).

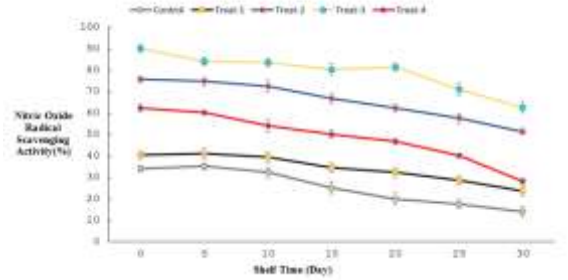

Fig 5: Changes in nitric oxide radical inhibition of fish sausage samples containing different concentrations of hydrolyzed orange seed protein during storage. **Control:**Sample without hydrolyzed protein., **Treat 1:** Sample with 0.5% of hydrolyzed protein., **Treat 2:** Sample with 1.5% of hydrolyzed protein., **Treat 3:** Sample with 2.5% of hydrolyzed protein., **Treat 1:** Sample with 1.5% of Vit C.

٤-نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از بهینه سازی شرایط هیدرولیز جهت تولید پروتئینهای هیدرولیز شده با فعالیت بازدارندگی اکسید نیتریت توسط آنزیم پپسین با استفاده از روش سطح پاسخ نشان داده است که شرایط بهینه جهت هیدرولیز پروتئین هسته پرتقال با بیشترین میزان خاصیت بازدارندگی یون نیتریت، در زمان ثابت هیدرولیز ۳/۵ ساعت، دمای ۳۹/۲۷ درجه سانتی‌گراد و نسبت آنزیم به سوبسترای ۲/۸۹ درصد حاصل شد که دارای ۹۳/٤٦ درصد فعالیت در قدرت بازدارندگی یون نیتریت بود. به منظور تأیید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایشهای اضافی(در سه تکرار) در شرایط پیش بینی شده توسط مدل اجرا گردید و مقادیر آزمایشی تا حد بالایی مطابق با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با قابلیت بازدارندگی یون نیتریت از آرد چربی گیری شده هسته پرتقال بود. همچنین کاربرد پروتئین هیدرولیز شده در فرمولاسیون سوسیس ماهی نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده به‌طور معنی‌دار قادر به تاخیر اکسیداسیون لیپیدی طی دوره نگهداری میباشد چرا که نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده دارای اندیس پراکسید کمتری نسبت به نمونه کنترل بودند و نیز نمونه‌های حاوی پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال (افزایش غلظت آن از ۰/۵ به ۲/۵ درصد) به‌طور معنی‌داری باعث افزایش فعالیت مهار رادیکال نیتریک اکسید نمونه‌ها شد. نتایج حاصل نشان داد که فرمولاسیون سوسیس ماهی حاوی ۱/۵ درصد پروتئین هیدرولیز شده هسته پرتقال به‌عنوان یک محصول با ارزش غذایی بالا و بدون نگهدارنده قابلیت تولید صنعتی و عرضه به بازار را دارد. تحقیق حاضر نشان داد که ضایعات صنعت تولید آبمیوه پرتقال میتواند به عنوان یک محصول در دسترس، به صورت یک منبع پروتئینی جدید جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد و با در نظر گرفتن فعالیت بالقوه در مهار رادیکال نیتریک اکسید این پروتئینهای هیدرولیز شده از پتانسیل مناسبی جهت استفاده به عنوان افزودنی در تولید فرآورده های گوشتی برخوردار میباشند.

تشکر و قدردانی

این پژوهش از نتایج طرح پژوهشی مصوب در مرکز ملی تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران (که در کمیته پژوهشی این مرکز با شماره ٥٤ در تاریخ ۱۳۹۹/۹/۲۹ به تصویب رسیده است)، استخراج شده است. نویسنده بر خود لازم می‌داند مراتب تشکر خود را از مسئولان مرکز ملی تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران به عمل آورد.

تأمین مالی

نویسنده اعلام می‌کند که هیچ بودجه‌ای دریافت نکرده است.

مشارکت نویسندگان

تمام فعالیت‌ها توسط نویسنده انجام شده است.

منافع رقابتی

نویسنده تأیید می‌کند که هیچ گونه تضاد منافع مالی یا منافع رقابتی در این مطالعه ندارد.

۵-منابع

[1] [1] Meshginfar, N., Sadeghimahonak, A. R., Ghorbani, M., Aalami, M. (2016). Effects of protein hydrolysate sheep visceral on oxidative stability of soybean oil and chicken sausage. Journal of Food Processing and Preservation ISSN. 1745-4549.

[2] Zakeri, K., Ghorbani, M., Sadeghi Mahoonak, A. R., Moayedi, A., Maghsoudlou, Y. (2019). Determination of Optimum Conditions for the Production of Peptides with Antioxidant and Nitric Oxide Inhibition Properties from Protein Hydrolysis of Pumpkin Seed Meals Using Pepsin Enzyme. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology. 14(3), 14-50.

[3] Karimzadeh, L., Koohdani, F., Mahmoudi, M., Safari, F., Babaee, Z. (2010). Determination of nitrate and nitrite residues in smoked Caspian Kutum, Rutilus frisii kutum and Mullet, Liza auratus in the north of Iran. World Journal Fish and Marine Science. 2(1), 62-65.

[4] Izadkhasti Z, Fazel M., Abbasi H. (2019). Studying the effect of sesame meal and soybean flour mixture on the physicochemical and textural properties of sausage. Food Technology & Nutrition. 16 (4), 33-45.

[5] Shariat alavi M., Sadeghi Mahoonak AR., Ghorbani M., Alami M., Mohamadzade J. (2022). Study on the effect of tomato seed protein hydrolyzate on the characteristics of susage. Journal of food science and technology. 121 (18), 301-313.

[6] Mazloomi S. N., Sadeghi Mahoonak A., Mora L., Ghorbani M., Houshmand GH., Toldrá F. (2021). Pepsin Hydrolysis of Orange By-Products for the Production of Bioactive Peptides with Gastrointestinal Resistant Properties. Foods. 10, 679. https://doi.org/10.3390/foods10030679.

[7] Matsuoka T., Kawashima T., Nakamura T., Kanamaru Y., Yabe T. (2012). Isolation and characterization of proteases that hydrolyze royal jelly proteins from queen bee larvae of the honeybee, Apis mellifera. Apidologie.43, 685-697.

[8] Tsai P. J., Tsai T. H., Yu C. H., Ho S. C. (2007). Comparison of No-scavenging and NO-suppressing activity of different herbal teas with those of green tea. Food Chemistry. 103,181-187.

[9] Feng X., Tjia J.Y.Y., Zhou Y., Liu Q., Fu C., Yang H. (2020). Effects of tocopherol nanoemulsion addition on fish sausage properties and fatty acid oxidation. LWT. 118,108737.

[10] Hajfathalian M., Jorjani S. Ghelichi S. (2020). Characterization of fish sausage manufactured with combination of sunflower oil and fish oil stabilized with fish roe protein hydrolysates. Journal of Food Science and Technology. 57(4), 1439-1448.

[11] Shariat alavi M. 1, Sadeghi Mahoonak A. R., Ghorbani M., Alami M., Mohamadzade 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. 84 (15), 137-151.

[12] Zhonggao C., Felgines O., Texier C., Besson DJ., Liu J., Wang S. (2005). Antioxidant activities of total pigment extract from blackberries. Food Technology and Biotechnology. 43(1), 97-102.

[13] Nikkhah A., Khayami M., Heidari R. (2011). Evaluation of nitric oxide scavenging activity of anthocyanins from black berry (Morus nigra L.), strawberry (Fragaria vesca L.) and berry (Morus alba L. Var. nigra) extracts. Scientific & Research Journal of Iranian Medicinal & Aromatic Plants. 25(1), 120-128. [in Persian]

[14] Vanitha M., Dhanapal K., Vidya Sagar Reddy G. (2015). Quality changes in fish burger from Catla (Catla Catla) during refrigerated storage. Journal of Food Science and Technology. 52, 1766-1771.

[15] Intarasirisawat R., Benjakul S., Visessanguan W., Wu J. (2014). Effects of skipjack roe protein hydrolysate on properties and oxidative stability of fish emulsion sausage. LWT-Food Science and Technology. 58(1), pp.280-286.

[16] Feng X., Tjia J.Y.Y., Zhou Y., Liu Q., Fu C., Yang H. (2020). Effects of tocopherol nanoemulsion addition on fish sausage properties and fatty acid oxidation. LWT, 118, 108737.

[17] Çakmakçi S., Turgut T. (2005). Influence of different light sources, illumination intensities and storage times on the vitamin C content in pasteurized milk. Turkish Journal of Veterinary & Animal Sciences. 29(5), 1097-1100.

[18] Tawali A.B., Said M.I., Sari S.F., Anwar L.O., Nurdin I.N., Said A., Tamtama A., Auza F.A., Zzaman W., Jeinie M.H., Rahman M.N.A. (2023). Characteristics of the Beef Cheek Meat-Based Sausage Added with Snakehead (Channa striata) Gelatin. International Journal of Food Science. 102, 54-68.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Production of functional sausage using hydrolyzed orange seed proteins as a natural preservative with nitric oxide reduction capability

Narges Mazloomi[1,2]., Atena Ramezani[1,2]., Behnaz Moshrefi[3,4*]

1- Department of Nutritional Sciences, School of Health, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

2- The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran.

3- Halal Research Center of IRI, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Education, Tehran, Iran

4- Master of Science in Nutrition, Food and Drug Administration, Tehran, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2024/10/12

Review: 2025/11/08

Accepted: 2025/11/12

Keywords:

Orange Seed,
Bioactive Peptides,
Antioxidant,
Nitrite ion,
Functional Sausage.

DOI: 10.48311/fsct.2026.83904.0

*Corresponding Author E-

samira.mazloomi@yahoo.com

ABSTRACT

The defatted flour of orange seeds contains about26%protein. It can be used as a rich and cost-effective source for the production of proteins and peptides of plant origin. In this stage of the research, high-purity protein concentrate was first extracted.Then,using the hydrolyzing enzyme pepsin at an enzyme ratio(1 to3%enzyme to substrate)and a time range(2 to5hours)at a temperature of 30-40°C,the protein from defatted orange seed flour was hydrolyzed. The optimal conditions for producing hydrolyzed proteins with the best nitrite ion inhibitory activity were selected. The optimal treatment under the suggested conditions of temperature,time, and enzyme-to-substrate concentration by the software was produced at a temperature of 39.27°C,time:3.5hours, and a ratio of 2.89%W/W enzyme to substrate,which resulted in the highest activity in the highest activity in inhibiting nitrite ions. This value was 93.46% in inhibiting nitrite ions. In the next stage,the production of fish sausage containing the protein produced from orange seeds in vitro, and then the peroxide index and nitric radical activity of the samples during the storage period was carried out.In general, the use of hydrolyzed protein in fish sausage formulation showed that hydrolyzed protein was significantly able to delay lipid oxidation during storage and samples containing hydrolyzed orange seed protein(increasing its concentration from0.5 to2.5%) significantly increased the nitric oxide radical scavenging activity of the samples.The results showed that the fish sausage formulation containing1.5%hydrolyzed orange seed protein,as a product with high nutritional value and without preservatives, has the potential for industrial production and marketing.