

(مقاله پژوهشی)

بررسی خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده اندرونه ماهی سفید (*Rutilus kutum*) با آنزیم های آلکالاز و تریپسین

مریم نوروزی چاکلی^۱، شبنم حقیقت خواجهی^{۲*}، رضا صفری^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳- پژوهشگرده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۴/۱۸

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۷/۱۷

چکیده

در این پژوهش هیدرولیز آنزیمی پروتئین اندرونه ماهی سفید با نام علمی *Rutilus kutum* توسط آنزیم های آلکالاز و تریپسین در سه نسبت آنزیم به سوبسترا ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد انجام گردید. ترکیبات شیمیایی، خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی مورد آزمون قرار گرفتند. نتایج نشان داد که تمامی نمونه ها حاوی محتوای پروتئینی بالا بودند. بیشترین مقدار پروتئین محلول و بازیافت پروتئین به ترتیب به میزان ۷۶/۸۷ و ۴۶/۸۶۷ درصد با آلکالاز ۰/۵ درصد حاصل شد. با توجه به نتایج، آنزیم آلکالاز با نسبت ۱/۵ درصد بالاترین درجه هیدرولیز به میزان ۳۳/۱۰۳ درصد را به خود اختصاص داد. بیشترین مقدار جذب آب با آلکالاز ۱/۵ درصد به میزان ۸۴/۸۳ درصد بود و با افزایش غلظت آنزیم به طور معنی داری افزایش یافت. پروتئین های هیدرولیز شده حاصل در غلظت های مختلف خواص آنتی اکسیدانی مطلوبی نشان دادند. بیشترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی و احیاکنندگی با آلکالاز ۰/۵ درصد به میزان ۷۶/۹۸۷ و ۰/۸ درصد حاصل گردید. در برخی غلظت ها خواص کف کنندگی و امولسیفایری مطلوبی مشاهده شد. نتایج تحقیق حاضر پودر پروتئین هیدرولیز شده حاصل را به عنوان یک منبع خوب پروتئین و با خواص آنتی اکسیدانی و عملکردی مطلوب و همچنین به عنوان امولسیفایر و عامل کف کننده در صنایع غذایی پیشنهاد می کند.

واژه های کلیدی: اندرونه ماهی سفید، پروتئین هیدرولیز شده، خواص آنتی اکسیدانی، خواص عملکردی، هیدرولیز آنزیمی.

۱- مقدمه

صید و آبی‌پروری در ایران به سرعت در حال افزایش بوده و مقادیر آن‌ها در سال ۱۳۹۶ به ترتیب ۷۲۴/۸۱۷ و ۴۷۷/۲۶۹ تن گزارش شده است (۱،۱۹). بدیهی است این مقدار تولید، دارای حجم بالایی از ضایعات می‌باشد که منابعی غنی از پروتئین و چربی با قابلیت هضم آسان و ارزش بیولوژیکی می‌باشند (۷،۶). همچنین منبع قابل توجهی از ترکیبات دیگر مانند اسیدهای چرب غیراشباع، فسفولیپیدها، ویتامین‌های محلول در چربی و ترکیبات زیست‌فعال می‌باشند (۳۳). از آن‌جایی که تولیدکنندگان صنعت ماهی، هزینه‌های بالایی را جهت از بین بردن ضایعات متحمل می‌شوند، در نتیجه استفاده از این ضایعات و تبدیل فرآورده‌های جانبی ماهی به محصولات با ارزش در سال‌های اخیر مورد توجه بسیاری از محققین صنعت غذا قرار گرفته است. یکی از پرکاربردترین این روش‌ها، تولید پروتئین هیدرولیز‌شده می‌باشد. هیدرولیز پروتئین‌ها شامل شکستن پیوندهای پپتیدی پروتئین‌ها و تبدیل آن‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین و اسیدهای آمینه آزاد می‌باشد (۳۰). هیدرولیز آنزیمی یکی از بهترین روش‌ها برای تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی با خواص عملکردی مطلوب و ارزش تغذیه‌ای بالا می‌باشد (۱۶). فرایند هیدرولیز آنزیمی به میزان قابل توجهی خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده مانند اندازه مولکولی، ویژگی آب‌گریزی و گروه‌های قطبی را تحت تأثیر قرار می‌دهد و این خصوصیات مستقیماً بر خواص عملکردی پروتئین مؤثر می‌باشند (۱۶، ۳۶). اکسیداسیون چربی‌ها یکی از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت غذا و مصرف‌کنندگان بوده زیرا با تولید رادیکال‌های آزاد همراه می‌باشد (۴). بنابراین امروزه به طور محسوسی نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی یا طبیعی احساس می‌شود. اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی موجب شده است که امروزه کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به منزله جانشین آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی توصیه گردد (۳۱). بنابراین محققان بر یافتن منابع آنتی‌اکسیدان طبیعی از ماهی تمرکز نموده‌اند. پروتئین هیدرولیز‌شده از آبزیان به دلیل داشتن

پپتیدهای زیست‌فعال، خواص آنتی‌اکسیدانی، زنجیره پپتیدی کوتاه و وزن مولکولی پایین، هضم خوب و منع نیتروژن، برای درمان بسیاری از بیماری‌ها، مصرف در جیره غذایی انسان، دام، طیور، آبزیان و به عنوان محیط کشت باکتریایی استفاده می‌شوند (۲۳، ۲۴). در سال‌های اخیر تحقیقات بسیاری جهت آماده‌سازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از منابع پروتئینی گوناگون گزارش شده است (۱۰، ۱۱) و پپتیدهای زیست‌فعال بسیاری با خواص آنتی‌اکسیدانی از منابع دریایی چون جانوران دریایی گوناگون مانند ماهی‌ها، جلبک‌ها و ضایعات آن‌ها شناسایی شده‌اند (۱۵). موتامیامه و همکاران (۲۰۱۸) خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از چشم ماهی تن با نام علمی (*Thunnus sp.*) با آنزیم پاپائین ۰/۱، ۰/۱۵، ۰/۲ و ۰/۲۵ درصد و در زمان‌های هیدرولیز ۴، ۵، ۶ و ۷ ساعت بررسی کردند. مقدار پروتئین محلول و درجه هیدرولیز به ترتیب در دامنه ۵۹/۹۸ تا ۹۴/۹۰ و ۹/۱۰ تا ۱۶/۱۴ درصد بود. نتایج این تحقیق نشان داد که بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در درجه هیدرولیز ۱۱/۳۵ درصد به میزان ۹۳/۵۷ درصد حاصل شد. غلظت بهینه آنزیم ۰/۱ درصد و زمان هیدرولیز مناسب ۶ ساعت گزارش گردید (۲۱). بنابراین ثابت شده است که پروتئین هیدرولیز شده به روش هیدرولیز آنزیمی از محصولات آبی و ضایعات حاصل از آن‌ها منبع مناسبی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدان می‌باشد (۲۷). تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در خصوص خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده قسمت‌های مختلف انواع ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری انجام شده است (۳۴). رفتی امیری و همکاران (۲۰۱۶) خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از عضله ماهی مرکب با نام علمی *Sepia pharaonis* با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پروتامکس را با هم مقایسه نمودند. آن‌ها در این پژوهش دریافتند پودر حاصل از آنزیم آلکالاز دارای درجه هیدرولیز، محتوای پروتئین، بازیافت پروتئین، فعالیت کف‌کنندگی، ظرفیت نگهداری آب و جذب روغن بالاتری نسبت به آنزیم پروتامکس می‌باشد (۲۸). در این مطالعه خواص عملکردی

و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از اندرونه ماهی سفید توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین مورد ارزیابی قرار گرفته است. علت انتخاب این دو آنزیم ویژگی‌های قدرت آنزیمی آن‌ها بوده و مطالعات مختلف نشان داده که این دو آنزیم بعنوان آنزیم‌های میکروبی و حیوانی قابلیت استفاده در مقیاس‌های مختلف را دارا می‌باشند. انتخاب غلظت آنزیم‌ها بر اساس پیش تیمارهای انجام شده، مطالعات دیگران و توجیه اقتصادی آن‌ها انجام گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ماده خام اولیه

اندرونه ماهی سفید به عنوان ماده خام اولیه، از مرکز تکثیر و پرورش ماهی شهرستان ساری تهیه شد. نمونه تهیه شده به منظور جلوگیری از تخریب آنزیمی و میکروبی، در مجاورت یخ به آزمایشگاه پژوهشگاه اکولوژی دریای خزر منتقل و تا شروع آزمایش در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. در آزمایشگاه اندرونه ماهی با استفاده از چرخ گوشت با قطر سوراخ ۰/۵ میلی‌متر به طور کامل چرخ

و هموژن شد. سپس مقداری از نمونه جهت اندازه‌گیری ترکیب شیمیایی و مابقی اندرونه چرخ شده جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده، در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده و به منظور آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند. جهت هیدرولیز آنزیمی اندرونه ماهی سفید از آنزیم آلکالاز و تریپسین در سه غلظت ۰/۵، ۱ و ۱/۵ درصد استفاده گردید. آنزیم‌های مورد استفاده و خصوصیات آن‌ها در جدول شماره (۱) ارائه شده است. لازم به ذکر است که آنزیم‌ها از نمایندگی شرکت Novozymes (دانمارک) خریداری شد و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. آنزیم آلکالاز، اندوپتیداز قلیایی می‌باشد که از باکتری *Bacillus licheniformis* تولید می‌گردد. آنزیم تریپسین، اندوپتیداز قلیایی با منشأ جانوری می‌باشد. pH بهینه آلکالاز ۸ تا ۱۰ و تریپسین ۷/۵ تا ۸/۵ می‌باشد. دمای بهینه آلکالاز ۵۰ تا ۷۰ درجه سلسیوس و تریپسین ۳۵ تا ۴۵ درجه سلسیوس می‌باشد (۸، ۱۷).

جدول ۱- شرایط مورد استفاده برای آنزیم‌های آلکالاز و تریپسین

آنزیم	Ph	غلظت آنزیم (درصد وزنی خمیر اندرونه)	زمان (ساعت)	دما (°C)
آلکالاز	۸/۵	۰/۵، ۱، ۱/۵	۱	۵۸/۵
تریپسین	۷/۵	۰/۵، ۱، ۱/۵	۱	۳۷

۲-۲- تهیه پروتئین هیدرولیز شده از اندرونه ماهی سفید

۵۰ گرم از نمونه هموژن شده اندرونه ماهی سفید پس از انجمادزایی در دمای ۴ درجه سلسیوس به ارن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری حاوی ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات منتقل و pH آن برای هر آنزیم مطابق جدول ۱ با استفاده از سود ۰/۱ نرمال و اسید کلریدریک ۰/۱ نرمال تنظیم گردید. به منظور غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون بن‌ماری شیکردار در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار داده شدند. بعد از خنک شدن، نمونه‌ها در دستگاه بن‌ماری (اختریان، ایران) و انکوباتور شیکردار (ژال تجهیز، ایران) که برای آنزیم آلکالاز دمای ۵۸/۵

و تریپسین دمای ۳۷ درجه سلسیوس تنظیم شد، قرار داده شدند و آنزیم‌ها مطابق شرایط تعریف شده در جدول شماره (۱)، به نمونه‌ها افزوده گردیدند. پس از اتمام فرایند هیدرولیز، به منظور متوقف نمودن هیدرولیز آنزیمی، نمونه‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها بعد از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، با استفاده از سانتریفیوژ (Kokusan، ژاپن) در دمای ۴ درجه سلسیوس، به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت ۸۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ شدند. مایع رویی حاصل از سانتریفیوژ، جمع‌آوری و با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Operon، کره جنوبی) تحت شرایط خلاء و دمای ۵۰-

درجه سلسیوس خشک و به پودر پروتئین هیدرولیز شده تبدیل گردیدند (۲۴). تولید پروتئین هیدرولیز شده توسط هر آنزیم، در سه تکرار انجام شد.

۲-۳- تعیین ترکیب شیمیایی

برای تعیین میزان رطوبت، پروتئین و خاکستر از روش استاندارد AOAC به شماره ۹۳۰.۱۵، ۹۵۴.۰۱، ۹۴۲.۰۵ استفاده گردید (۱۲). برای تعیین میزان پروتئین کل، از دستگاه کلدال (Behr، آلمان) و با استفاده از ضریب تبدیل نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد. میزان خاکستر با قرار دادن نمونه در کوره الکتریکی (FG-FMS، ایران) با دمای ۶۰۰ درجه سلسیوس تعیین گردید. برای تعیین میزان چربی از استاندارد ملی ایران به شماره ۷۴۲ استفاده شد (۲).

۲-۴- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز با افزودن حجم برابر از تری کلرواستیک - اسید (TCA) ۲۰ درصد به نمونه پروتئین هیدرولیز شده اندازه گیری شد و از طریق رابطه زیر محاسبه گردید (۱۳).

۱۰۰ × (نیتروژن کل در نمونه هیدرولیز شده) / (میزان نیتروژن محلول در محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد)

۲-۵- بازیافت پروتئین

بازیافت پروتئین به صورت درصد بیان شد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۰).

۱۰۰ × (مقدار پروتئین اندرونه) / (مقدار پروتئین موجود در پروتئین هیدرولیز شده) = بازیافت پروتئین (درصد)

۲-۶- حلالیت

برای تعیین حلالیت، ۵۰۰ میلی گرم پودر پروتئین هیدرولیز شده با ۵۰ میلی لیتر سدیم کلراید ۰/۱ مولار در pH برابر ۷ مخلوط گردید. محلول به مدت یک ساعت در دمای ۲۵ درجه سلسیوس همزده شد و با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. میزان پروتئین محلول مایع رویی به روش بیورت یا کلدال اندازه گیری شد و درصد حلالیت پروتئین از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۶).

۱۰۰ × (مقدار پروتئین کل نمونه هیدرولیز شده) / (مقدار پروتئین مایع رویی) = درصد حلالیت پروتئین

۲-۷- شاخص ظرفیت کف کنندگی و شاخص پایداری کف

شاخص ظرفیت کف کنندگی و شاخص پایداری کف به

روش Souissi و همکاران (۲۰۰۷) با اندکی تغییر مورد بررسی قرار گرفت (۳۶). بر این اساس مقدار ۲۵۰ میلی گرم پروتئین هیدرولیز شده با ۲۵ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و pH مخلوط با استفاده از اسید کلریدریک و سود ۰/۱ نرمال در مقادیر ۲، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ تنظیم گردید. سپس مخلوط حاصل در دمای اتاق به مدت ۲ دقیقه توسط هموژنایزر (One37TF، ایتالیا) با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه همگن گردید. نمونه حاصل به سرعت به سیلندر مدرج ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد و حجم کل محلول پس از ۳۰ ثانیه اندازه گیری شد. شاخص ظرفیت کف کنندگی به صورت درصد بیان شد و از رابطه زیر محاسبه گردید:

۱۰۰ × حجم نمونه قبل از مخلوط کردن / (حجم نمونه قبل از همزدن - حجم نمونه بعد از همزدن)

نمونه همزده شده به مدت ۳ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده شد و حجم نمونه یادداشت گردید. شاخص پایداری کف به صورت درصد بیان و از فرمول زیر محاسبه شد:

۱۰۰ × حجم نمونه قبل از همزدن / (حجم نمونه قبل از مخلوط کردن - حجم نمونه بعد از قرار گیری در دمای ۲۰ درجه سلسیوس)

لازم به ذکر است که در روابط بالا حجم ها همه بر حسب میلی لیتر بوده است.

۲-۸- شاخص فعالیت امولسیفایری و شاخص پایداری امولسیون

شاخص فعالیت امولسیفایری و شاخص پایداری امولسیونی با روش Vilailak Klompong و همکاران (۲۰۰۷)، Pearce و Kinsella (۱۹۷۸) تعیین شد (۱۵، ۲۷).

۲-۹- ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب

ظرفیت جذب روغن طبق روش Lin و Zayas (۱۹۸۷) انجام شد (۱۹). و ظرفیت نگهداری آب به روش Rodriguez-Ambriz و همکاران (۲۰۰۵) بررسی شد (۳۰).

۲-۱۰- اندازه گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH به روش Wu و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. جهت نمونه شاهد از آب مقطر دوبار تقطیر استفاده شد و به منظور مقایسه قدرت

آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت ۱۰۰ ppm استفاده گردید (۳۷).

منظور مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت ppm ۲۰۰ استفاده گردید.

۲-۱۱- اندازه گیری قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

با استفاده از روش معرفی شده توسط Oyaizu و همکاران (۱۹۸۶) و با اندکی تغییر از این روش برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از اندرونه ماهی سفید استفاده شد (۲۵). ابتدا مقدار ۰/۵ میلی‌لیتر پودر هیدرولیز شده با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=6/6$ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱ درصد وزنی حجمی پتاسیم فری سیانید مخلوط گردید. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از این مدت با افزودن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، واکنش پایان یافت. سپس این محلول ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از مایع رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر کلرید فریک ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر تعیین گردید. جذب بالاتر نشان دهنده قدرت احیاکنندگی بالاتر پودر پروتئین هیدرولیز شده بود. در این آزمون هم به

۲-۱۲- تجزیه و تحلیل آماری

آنالیز آماری داده‌ها با استفاده از نسخه ۲۱ نرم افزار SPSS انجام گردید و بررسی اثر پارامترهای مورد بررسی بر تیمارهای استفاده شده با استفاده از طرح آماری کاملاً تصادفی با آزمون یک طرفه ANOVA انجام گرفت. جهت مقایسه معنی‌دار بودن میانگین داده‌ها در تیمارهای مختلف، از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی اندرونه ماهی سفید

و پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از آن

نتایج ترکیب شیمیایی اندرونه ماهی سفید و پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از آن در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. مقدار پروتئین موجود در اندرونه ماهی سفید ۱۶/۹۸ درصد بود. بیشترین میزان پروتئین با مقدار ۷۸/۰۷±۰/۱۱ در نمونه پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز ۱/۵ درصد مشاهده گردید ($p>0/05$). نمونه‌ها به صورت جدول ۲ کدگذاری شد.

جدول ۲- کد گذاری نمونه‌ها

نمونه	کد
اندرونه	X ₀
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۰/۵ درصد	X ₁
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۱ درصد	X ₂
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۱/۵ درصد	X ₃
پروتئین هیدرولیز شده با تریپسین ۰/۵ درصد	X ₄
پروتئین هیدرولیز شده با تریپسین ۱ درصد	X ₅
پروتئین هیدرولیز شده با تریپسین ۱/۵ درصد	X ₆

جدول ۳- ترکیب شیمیایی اندرونی ماهی سفید و پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از آن

نمونه	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
X ₀	۱۶/۹۸ ^c	۷/۸۹ ^a	۷۲/۹۸ ^a	۲/۶۹ ^f
X ₁	۷۶/۸۷ ± ۰/۲۵ ^b	۱/۲۳ ± ۰/۰۶ ^g	۵/۲۳ ± ۰/۰۹ ^c	۱۷/۰۳ ± ۰/۱۵ ^d
X ₂	۷۶/۶۷ ± ۱/۱۵ ^b	۱/۶۷ ± ۰/۱۲ ^c	۵/۷۷ ± ۰/۲۵ ^b	۱۷/۸۳ ± ۰/۲۹ ^d
X ₃	۷۸/۰۷ ± ۰/۱۱ ^a	۱/۷۷ ± ۰/۰۶ ^b	۴/۲۱ ± ۰/۰۹ ^e	۱۶/۲۳ ± ۰/۱۵ ^e
X ₄	۷۲/۹۳ ± ۰/۱۷ ^d	۱/۵۳ ± ۰/۰۶ ^d	۵/۸۰ ± ۰/۱۰ ^b	۲۱/۲۳ ± ۰/۲۵ ^a
X ₅	۷۵/۸۴ ± ۰/۳۴ ^c	۱/۴۷ ± ۰/۱۲ ^e	۵/۷۵ ± ۰/۰۵ ^b	۱۸/۶۳ ± ۰/۵۷ ^c
X ₆	۷۵/۸۶ ± ۰/۰۵ ^c	۱/۴۳ ± ۰/۰۶ ^f	۴/۸۰ ± ۰/۱ ^d	۱۹/۰۷ ± ۰/۵۰ ^b

*حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

هیدرولیز شده حاصل از آنزیم آلکالاز بالاتر بود و ۸۲/۶۶ درصد گزارش گردید که نتایج این تحقیق با پژوهش حاضر شباهت دارد (۲۲). درصد چربی و رطوبت در پروتئین های هیدرولیز شده نسبت به اندرونی ماهی سفید به میزان قابل توجهی کاهش یافت. درصد خاکستر در تمامی پروتئین های هیدرولیز شده نسبت به اندرونی ماهی سفید بیشتر بود. علت افزایش درصد خاکستر، بالا بودن مقدار ماده خشک و نیز کاربرد بافر فسفات جهت ثابت نگاه داشتن pH در طی فرایند هیدرولیز می باشد. در مطالعه Abraha و همکاران در سال ۲۰۱۷ در رابطه با هیدرولیز آنزیمی گربه ماهی نقره ای با نام علمی *Arius thalassinus* مقدار پروتئین و خاکستر بالا به ترتیب ۸۰ و ۵/۲ درصد و چربی و رطوبت پایین به ترتیب ۰/۵ و ۶/۸ درصد گزارش گردید که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۳).

آنزیم آلکالاز نسبت به تریپسین از فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری برخوردار بوده و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از این آنزیم دارای محتوای پروتئینی بیشتری می باشد. با افزایش غلظت آنزیم قدرت هیدرولیز آن افزایش یافته و با توجه به زمان مشابه برای غلظت های مختلف، مقدار بیشتری از پروتئین های باند شده با سایر ترکیبات تحت تأثیر هیدرولیز قرار گرفته و در نتیجه میزان پروتئین نهایی بیشتر می باشد. در نتیجه بالا بودن میزان پروتئین، نمونه های هیدرولیز شده از ارزش غذایی بالایی برخوردار می باشند و از این نمونه ها می توان به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان استفاده بالقوه نمود. Muzaifa و همکاران در سال ۲۰۱۲ پروتئین هیدرولیز شده حاصل از محصولات جانبی ماهی را با استفاده از آنزیم های آلکالاز و فلاورزایم با هم مقایسه نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که میزان پروتئین در نمونه

جدول ۴- درجه هیدرولیز، بازیافت پروتئین و حلالیت پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از اندرونی ماهی سفید

نمونه	درجه هیدرولیز	بازیافت پروتئین	حلالیت پروتئین
X ₁	۲۸/۸۰ ± ۰/۳۷ ^d	۴۶/۸۶ ± ۰/۳۵ ^a	۶۸/۳۲ ± ۰/۸۲ ^e
X ₂	۳۰/۱۳ ± ۰/۸۰ ^b	۴۵/۶۶ ± ۱/۱۵ ^b	۷۱/۰۰ ± ۱/۷۳ ^d
X ₃	۳۳/۱۰ ± ۰/۵۶ ^a	۴۳/۰۶ ± ۰/۱۱ ^c	۷۹/۲۹ ± ۱/۱۸ ^b
X ₄	۲۷/۱۹ ± ۰/۶۸ ^e	۳۷/۹۳ ± ۰/۱۶ ^d	۷۵/۴۳ ± ۰/۴۴ ^c
X ₅	۲۸/۱۴ ± ۰/۳۴ ^d	۳۷/۸۴ ± ۰/۳۳ ^d	۸۰/۰۷ ± ۰/۸۷ ^b
X ₆	۲۹/۰۸ ± ۰/۲۰ ^c	۳۷/۸۶ ± ۰/۰۵ ^d	۸۷/۳۰ ± ۱/۲۶ ^a

*حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده ها می باشد (P<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

میان درجه هیدرولیز و حلالیت پروتئین‌ها مشاهده می‌گردد و با افزایش درجه هیدرولیز، حلالیت در نتیجه آزاد شدن پپتیدهای کوچک محلول و ایجاد گروه‌های کربوکسیلیک و آمین جدید از اسیدهای آمینه افزایش یافته است (۱۰). حلالیت بالای پروتئین‌های هیدرولیز شده نشان دهنده کاربرد بالقوه آن‌ها در فرمولاسیون‌های مواد غذایی می‌باشد.

۳-۳- شاخص ظرفیت کف‌کنندگی، شاخص پایداری کف، فعالیت امولسیفایری، پایداری امولسیون حاصل از پروتئین‌های هیدرولیز شده اندرونه ماهی سفید

با توجه به نتایج ذکر شده در جدول ۵، pH به شدت بر شاخص کف‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل تأثیرگذار است و الگوی متفاوتی از ظرفیت کف‌کنندگی در دامنه pH ۲ تا ۱۰ مشاهده می‌گردد. بیشترین شاخص کف‌کنندگی در pH های ۲، ۶ و ۸ در نمونه‌های تیمار شده با تریپسین ۰/۵ درصد و کمترین در pH برابر با ۱۰ با تریپسین ۱/۵ درصد گزارش گردید. همچنین پودرهای هیدرولیز شده حاصل از فعالیت آنزیم تریپسین بیشترین شاخص کف‌کنندگی را نشان دادند. این در حالی است که افزایش پایداری کف تشکیل شده در پودر حاصل توسط آنزیم آلکالاز با غلظت ۱/۵ درصد مشاهده گردید. با افزایش pH به سمت حالت قلیایی شاخص کف‌کنندگی افزایش یافته و همچنین با افزایش غلظت آنزیم شاخص کف‌کنندگی کاهش می‌یابد. در واقع این امر می‌تواند به این علت باشد که ممکن است پپتیدها در پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای ترکیبات، اندازه‌ها و تغییرات متفاوتی باشند (۲۹). سه ویژگی مهم جهت نشان دادن ظرفیت کف‌کنندگی خوب، مهاجرت سریع در حد فاصل آب و هوا، رها شدن و بازسازی مجدد در این حد فاصل می‌باشد. احتمالاً نمونه‌های هیدرولیز شده شامل پپتیدهایی با اسیدهای آمینه هیدروفوب و دارای ویژگی آبگریزی بیشتر می‌باشند و در نتیجه به سرعت در این حد فاصل جذب می‌گردند. به طور کلی پروتئین‌ها به علت داشتن ترکیبات فعال سطحی منجر به تشکیل کف می‌گردند و با افزایش حلالیت پروتئین‌ها کشش سطحی در فضای بین سطحی

مطابق با نتایج جدول ۴، بیشترین درجه هیدرولیز در پودر حاصل از آنزیم آلکالاز ۱/۵ درصد با مقدار $33/10 \pm 0/56$ و کمترین در نمونه حاصل از آنزیم تریپسین ۰/۵ درصد به میزان $27/19 \pm 0/68$ مشاهده گردید. بیشترین میزان پروتئین در پودر حاصل از آنزیم آلکالاز ۰/۵ درصد با مقدار $46/86 \pm 0/35$ و بالاترین میزان حلالیت در نمونه حاصل از آنزیم تریپسین ۱/۵ درصد با مقدار $87/30 \pm 1/26$ مشاهده گردید. در این مطالعه، آنزیم آلکالاز توانست نسبت به آنزیم تریپسین، پیوندهای پپتیدی بیشتری را هیدرولیز نموده و به این ترتیب بالاترین درجه هیدرولیز را به خود اختصاص دهد. علت این امر را می‌توان فعالیت پروتئولیتیکی بالاتر آلکالاز نسبت به تریپسین دانست. با افزایش غلظت هر دو نوع آنزیم درجه هیدرولیز افزایش یافت و این روند افزایشی از نظر آماری معنی‌دار بود ($p < 0/05$). رفتی امیری و همکاران در سال ۲۰۱۶ پروتئین عضله ماهی با نام علمی *Sepia pharaonis* را توسط آنزیم آلکالاز و پروتامکس هیدرولیز نمودند. پروتئین هیدرولیز شده حاصل توسط آنزیم آلکالاز درجه هیدرولیز بالاتری داشت که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد (۲۸). پیوندهای پپتیدی با افزایش غلظت آنزیم بیشتر شکسته می‌شوند و میزان بازیافت پروتئین توسط آنزیم آلکالاز به صورت معنی‌داری بیشتر از آنزیم تریپسین می‌باشد ($p < 0/05$). داده‌های حاصل از تحقیقات صورت گرفته توسط سایر محققان نیز مشابه نتایج این پژوهش گزارش گردیده است (۵، ۲۳). در واقع بازیافت پروتئین، میزان پروتئین محلول استخراج شده از منبع پروتئینی اولیه را نشان می‌دهد و در نتیجه نشان دهنده میزان راندمان فرایند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده و از مهم‌ترین فاکتورهای اثرگذار در بررسی عملکرد آنزیم‌های مورد استفاده جهت هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌گردد. با توجه به نتایج تحقیق حاضر، آنزیم تریپسین نسبت به آلکالاز توانایی بیشتری در افزایش حلالیت پروتئین‌های هیدرولیز شده نشان داد و همچنین مشخص گردید که حلالیت با افزایش غلظت آنزیم به طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($p < 0/05$). لذا رابطه ای مستقیم

حباب‌های هوا و مایع کاهش بیشتری از خود نشان داده و ظرفیت تشکیل کف افزایش می‌یابد. با انجام فرایند هیدرولیز، وزن مولکولی پروتئین‌ها کاهش یافته و در نتیجه

حلالیت افزایش و خاصیت تشکیل کف توسط پروتئین‌های کوچکتر بیشتر می‌گردد (۱۴، ۳۲).

جدول ۵- شاخص ظرفیت کف کنندگی در pH های مختلف و پایداری کف در پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از اندرونه ماهی سفید توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین

نمونه	شاخص ظرفیت کف کنندگی در pH های مختلف					شاخص پایداری کف
	pH=۲	pH=۴	pH=۶	pH=۸	pH=۱۰	
X ₁	۶/۸۳ ± ۰/۲۸ ^c	۷/۰ ± ۰/۰ ^c	۷/۰ ± ۰/۰ ^d	۷/۰ ± ۰/۰ ^d	۵/۰ ± ۰/۰ ^c	۶/۳۳ ± ۰/۵۷ ^c
X ₂	۶/۳۳ ± ۰/۵۷ ^d	۶/۶۶ ± ۰/۵۷ ^d	۶/۰ ± ۰/۰ ^f	۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۵/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۷/۳۳ ± ۱/۱۵ ^b
X ₃	۶/۰۰ ± ۰/۰ ^e	۶/۱۶ ± ۰/۲۸ ^e	۶/۳۳ ± ۰/۵۷ ^e	۶/۳۳ ± ۰/۵۷ ^e	۷/۶۶ ± ۰/۱۵ ^a	۸/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a
X ₄	۸/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۸/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	۸/۳۳ ± ۰/۵۷ ^a	۲/۶۶ ± ۰/۵۷ ^d	۴/۶۶ ± ۰/۵۷ ^e
X ₅	۷/۳۳ ± ۰/۵۷ ^b	۸/۰ ± ۰/۰ ^a	۷/۳۳ ± ۰/۵۷ ^c	۷/۳۳ ± ۰/۵۷ ^c	۲/۶۶ ± ۰/۵۷ ^d	۴/۶۶ ± ۰/۵۷ ^e
X ₆	۷/۳۳ ± ۰/۵۷ ^b	۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^b	۲/۳۳ ± ۰/۵۷ ^e	۶/۰ ± ۱/۰ ^d

*حروف متفاوت به ترتیب در هر ستون و ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

جدول ۶- شاخص فعالیت امولسیون کنندگی، پایداری امولسیون، جذب آب و روغن در پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از اندرونه ماهی سفید توسط آنزیم آلکالاز و تریپسین

نمونه	فعالیت امولسیون کنندگی	پایداری امولسیونی	جذب آب	جذب روغن
X ₁	۳۳/۶۱ ± ۰/۴۹ ^{bc}	۲۵/۸۶ ± ۰/۲۰ ^c	۲۵/۸۷ ± ۲/۱۶ ^f	۳۴/۵۳ ± ۰/۶۶ ^f
X ₂	۳۱/۰۰ ± ۱/۷۳ ^d	۲۱/۳۳ ± ۲/۳۰ ^d	۵۳/۸۰ ± ۳/۳۶ ^e	۳۷/۶۶ ± ۰/۵۷ ^d
X ₃	۲۵/۱۲ ± ۰/۲۰ ^e	۱۶/۷۳ ± ۰/۳۷ ^e	۸۴/۸۳ ± ۱/۴۱ ^a	۳۷/۱۶ ± ۰/۳۲ ^{de}
X ₄	۳۷/۳۴ ± ۰/۵۶ ^a	۳۴/۱۰ ± ۰/۶۲ ^a	۶۰/۱۲ ± ۰/۴۵ ^d	۳۸/۸۳ ± ۰/۶۶ ^c
X ₅	۳۵/۳۰ ± ۰/۶۰ ^b	۳۰/۷۶ ± ۱/۳۲ ^b	۶۵/۵۴ ± ۰/۴۷ ^c	۴۰/۲۰ ± ۰/۳۸ ^b
X ₆	۳۴/۳۴ ± ۰/۴۹ ^b	۲۶/۹۰ ± ۰/۶۲ ^c	۷۰/۵۴ ± ۰/۹۱ ^b	۴۱/۹۰ ± ۰/۱۷ ^a

*حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار بین داده‌ها می‌باشد (p<۰/۰۵).

نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار نشان داده شده است.

Muzaifa و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشاهده کردند که با افزایش غلظت آنزیم فعالیت امولسیون کنندگی و شاخص پایداری امولسیون و پایداری کف پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ضایعات ماهی توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم کاهش یافته است که این داده‌ها با نتایج تحقیق حاضر مطابقت داشت (۲۲). یکی از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر میزان شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی پروتئین‌های هیدرولیز شده، وزن مولکولی یا به عبارتی طول

مطابق جدول (۶) بیشترین مقدار فعالیت امولسیفایری و شاخص پایداری امولسیون در نمونه تیمار شده با آنزیم تریپسین ۰/۵ درصد مشاهده شد. شاخص امولسیون کنندگی همانند فعالیت امولسیون کنندگی با افزایش غلظت آنزیم کاهش یافته و این روند کاهشی از نظر آماری معنی دار می‌باشد (p<۰/۰۵). با افزایش غلظت آنزیم حلالیت پپتیدهای تولید شده افزایش می‌یابد که این امر بر ویژگی امولسیفایری تأثیر گذاشته و آن را کاهش می‌دهد.

افزودن مقادیر متغییری از پروتئین هیدرولیز شده ماهی به ماتریکس پروتئین، توانایی آن را جهت اتصال و نگهداری مولکول‌های آب بهبود می‌بخشد (۱۸). افزایش غلظت گروه‌های قطبی مانند کربوکسیل و آمین در نتیجه هیدرولیز آنزیمی به میزان قابل‌توجهی بر میزان آب جذب شده تأثیرگذار است. پپتیدهایی با اندازه کوچک و وزن مولکولی پایین حاصل از هیدرولیز آنزیمی گسترده، نسبت به پپتیدهایی با اندازه بزرگتر و وزن مولکولی بالا تأثیر بیشتری بر ظرفیت نگهداری آب دارند زیرا اجزای پپتیدی کوچکتر آبدوست‌تر هستند. بیشترین میزان جذب روغن با مقدار $41/90 \pm 0/17$ درصد در پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آنزیم تریپسین $1/5$ درصد مشاهده گردید که با افزایش غلظت آنزیم این مقدار به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0/05$). با بررسی نتایج حاصل از میزان چربی نمونه اندرونه ماهی سفید مشاهده گردید که میزان چربی آن کم می‌باشد و لذا این احتمال داده می‌شود که این کم بودن میزان چربی در ماهی سفید می‌تواند منجر به تمایل بیشتر جذب روغن در این ماهی گردد. لازم به ذکر است که ظرفیت جذب روغن یکی از ویژگی‌های تکنولوژیکی مهم در صنایع گوشت و شیرینی می‌باشد.

۳-۴- بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی مانند فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی در پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از اندرونه ماهی سفید

جدول ۷- روند تغییرات مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی در پروتئین‌های هیدرولیز شده

حاصل از اندرونه ماهی سفید

نمونه	مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (درصد)	احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (درصد)
X ₁	$76/98 \pm 0/98$ ^a	$0/8 \pm 0/01$ ^a
X ₂	$52/66 \pm 2/51$ ^b	$0/75 \pm 0/0$ ^b
X ₃	$28/90 \pm 0/35$ ^f	$0/72 \pm 0/0$ ^c
X ₄	$49/65 \pm 0/15$ ^c	$0/70 \pm 0/0$ ^d
X ₅	$48/26 \pm 0/55$ ^d	$0/67 \pm 0/01$ ^e
X ₆	$46/65 \pm 0/57$ ^e	$0/63 \pm 0/0$ ^f

* حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها می‌باشد ($p < 0/05$).

نتایج به صورت میانگین \pm انحراف معیار نشان داده شده است.

زنجیره پلی‌پپتیدی حاصل و حلالیت می‌باشد. وزن مولکولی پپتیدها در نتیجه هیدرولیز تغییر می‌یابد و افزایش درجه هیدرولیز باعث تولید پپتیدهایی با وزن مولکولی کم می‌گردد و پپتیدهایی با وزن مولکولی کم به علت حلالیت بالا نمی‌توانند خواص امولسیفایری مطلوبی ارائه دهند. اگرچه این پپتیدها سریعاً به سمت سطح مشترک دو فاز حرکت نموده و جذب سطح مشترک می‌گردند اما کارایی کمتری در کاهش کشش سطحی بین این دو فاز دارند زیرا فاقد توانایی تغییر جهت و عدم انعطاف در این سطوح هستند (۳۲). علاوه بر وزن مولکولی، خاصیت آمفی‌فیلک پپتیدها نیز میزان این دو شاخص را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین، خواص آمفی‌فیلک کافی برای نشان دادن ویژگی‌های امولسیفایری مناسب را ندارند (۹). در نتیجه همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش درجه هیدرولیز و حلالیت، فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون پروتئین‌های هیدرولیز شده کاهش یافته است. با افزایش غلظت آنزیم میزان جذب آب و حلالیت به طور معنی‌داری افزایش یافته و این امر بسیار مطلوب می‌باشد ($p < 0/05$). بیشترین میزان جذب آب در نمونه تیمار شده با آنزیم آلکالاز $1/5$ درصد مشاهده شد و کمترین مربوط به آلکالاز $0/5$ درصد می‌باشد. ظرفیت جذب آب یکی از پارامترهای مورد توجه در صنعت غذا می‌باشد و در بهبود ویژگی‌های حسی محصول نهایی نیز بسیار تأثیرگذار است. Kristinsson و Rasco (۲۰۰۰) گزارش نمودند که

که با افزایش غلظت آنزیم، قدرت احیاکنندگی کاهش یافته، لذا منطقی است که غلظت کمتری از آنزیم استفاده گردد. همچنین لازم به ذکر است که آنزیم آلکالاز توانایی بیشتری در افزایش خاصیت احیاکنندگی دارا می باشد.

۴- نتیجه گیری

بررسی خواص عملکردی و آنتی اکسیدانی پروتئین های حاصل از هیدرولیز آنزیمی اندرونه ماهی سفید توسط آنزیم های آلکالاز و تریپسین نشان می دهد که این ترکیبات دارای خاصیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی بوده و همچنین دارای خواص عملکردی مطلوبی مانند توانایی تشکیل کف، امولسیون کنندگی، حلالیت، قدرت جذب روغن و آب می باشند. این ترکیبات می توانند به عنوان ماده اولیه و یا به صورت افزودنی غذایی با منشأ طبیعی در مواد غذایی فرایند شده مانند صنایع تولید سوسیس و کالباس، سس های مایونز، سس های سالاد، نوشیدنی ها، کرم ها و غیره جهت ایجاد ویژگی های قابل قبول در دامنه گسترده ای از pH مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین با توجه به محتوای پروتئینی بالای موجود در پروتئین های هیدرولیز شده، از این ترکیبات می توان به عنوان مواد غذایی فراسودمند و با ارزش تغذیه ای بالا استفاده نمود.

۵- منابع

۱. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران. ۱۳۹۵. سازمان شیلات ایران، معاونت توسعه مدیریت و منابع، دفتر برنامه ریزی و بودجه ۲۴-۱۸.
۲. موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران. ۱۳۸۲. گوشت و فرآورده های گوشتی، اندازه گیری چربی تام. استاندارد ملی ایران، شماره ۷۴۲.
3. Abraha, B., Mahmud, A., Samuel, M., Yhdego, W. and Kibrom, S. 2017. Production of Fish Protein Hydrolysate from Silver Catfish (*Arius thalassinus*). *MOJ Food Process Technol*, 5 (4): 00132. DOI.
4. Arvanitoyannis, I. S. and Kassaveti, A. 2008. Fish industry waste: treatments, environmental impacts, current and potential uses. *International Journal of Food Science and Technology*, 43: 726-745.

مطابق با جدول (۷) تمامی نمونه ها خاصیت آنتی اکسیدانی نشان دادند و بیشترین در نمونه هیدرولیز شده با آلکالاز ۰/۵ درصد و کمترین با آلکالاز ۱/۵ درصد گزارش گردید. همان طور که ملاحظه می شود با افزایش غلظت آنزیم و افزایش درجه هیدرولیز خواص آنتی اکسیدانی کاهش یافته است، در نتیجه منطقی است که غلظت کمتری آنزیم استفاده گردد. بیشترین میزان احیاکنندگی نیز در پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۰/۵ درصد و کمترین با تریپسین ۱/۵ درصد گزارش گردید. Yang و همکاران در سال ۲۰۱۹ خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده عضله ماهی با نام علمی *Trichiurus japonicus* را توسط آنزیم های آلکالاز، تریپسین، نوترناز، پپسین و پاپائین با هم مقایسه نمودند و گزارش نمودند که نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH را دارا می باشد که این یافته مشابه نتایج تحقیق حاضر است (۳۹). استفاده از رادیکال آزاد DPPH، یک روش سریع، ارزان و بدون اثر منفی برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی مواد غذایی می باشد. پپتیدهای حاصل از پروتئین های هیدرولیز شده نقش اهداکنندگان الکترون را ایفاء می کنند و می توانند جهت پایان دادن به واکنش های زنجیره ای اکسیداسیون، با رادیکال های آزاد واکنش دهند. در واقع DPPH فرم پایدار رادیکال آزاد با حداکثر جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر در اتانول می باشد. زمانی که DPPH مجاور ماده اهداءکننده پروتون قرار می گیرد، رادیکال های آزاد مهار شده و جذب کاهش می یابد (۳۸). نتایج این تحقیق نشان می دهد که پروتئین های هیدرولیز شده اندرونه ماهی سفید می توانند به عنوان اهداءکنندگان پروتون با رادیکال های آزاد واکنش دهند و در نتیجه موجب پایان یافتن واکنش های زنجیره ای رادیکال های آزاد گردند که این موضوع توسط دیگر محققان نیز تأیید شده است (۱۴، ۳۵). قدرت احیاکنندگی آهن سه ظرفیتی (فریک) با افزایش غلظت آنزیم های آلکالاز و تریپسین کاهش یافته است و بررسی نتایج آماری نشان می دهد که این کاهش از نظر آماری معنی دار می باشد ($p < 0/05$). در نتیجه از آنجایی

15. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102: 1317-1327.
16. Ko, J.-Y., Lee, J.-H., Samarakoon, K., Kim, J.-S. and Jeon, Y.-J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52: 113-120.
17. Koutsopoulos, S., Patzsch, K., Bosker, W. T. and Norde, W. 2007. Adsorption of trypsin on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Langmuir*, 23: 2000-2006.
18. Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 43-81.
19. Lin, C. and Zayas, J. 1987. Functionality of defatted corn germ proteins in a model system: fat binding capacity and water retention. *Journal of Food Science*, 52: 1308-1311.
20. Morr, C., German, B., Kinsella, J., Regenstein, J., Buren, J. V., Kilara, A., Lewis, B. and Mangino, M. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50: 1715-1718.
21. Mutamimah, D., Ibrahim, B. and Trilaksani, W. 2018. Antioxidant activity of protein hydrolysate produced from tuna eye (*Thunnus* sp.) by enzymatic hydrolysis. *Journal Pengolahan Hasil Perikanan Indonesia*, 21: 522-531.
22. Muzaiifa, M., Safriani, N. and Zakaria, F. 2012. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *Aquaculture, Aquarium, Conservation & Legislation*, 5: 36-39.
23. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
24. Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. and Molla, A. E. 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga
5. Aspino, S. I., Horn, S. J. and Eijsink, V. G. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40: 1957-1966.
6. Benjakul, S. and Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 3423-3430.
7. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. and Lalitha, R. G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99: 335-343.
8. Chabeaud, A., Dutournié, P., Guérard, F., Vandanjon, L. and Bourseau, P. 2009. Application of response surface methodology to optimise the antioxidant activity of a saithe (*Pollachius virens*) hydrolysate. *Marine Biotechnology*, 11: 445-455.
9. Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36: 883-892.
10. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107: 1485-1493.
11. Gutiérrez, M. E., García, A. F., DE Madariaga, M. A., Sagrista, M. L., Casadó, F. J. and Mora, M. 2003. Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components: evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sciences*, 72: 2337-2360.
12. Horwitz, W. 2010. *Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs*/edited by William Horwitz, Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.
13. Hoyle, N. T. and Merritt, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59: 76-79.
14. KIM, S.-K., Kim, Y.-T., Byun, H.-G., Nam, K.-S., Joo, D.-S. and Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49: 1984-1989.

33. Shahidi, F., Han, X.-Q. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53: 285-293.
34. Shirahigue, L. D., Silva, M. O., Camargo, A. C., Sucasas, L. F. D. A., Borghesi, R., Cabral, I. S. R., Savay-Da-Silva, L. K., Galvão, J. A. and Oetterer, M. 2016. The feasibility of increasing lipid extraction in Tilapia (*Oreochromis niloticus*) waste by proteolysis. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25: 265-271.
35. Šližytė, R., Rustad, T. and Storrø, I. 2005. Enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products: Optimization of yield and properties of lipid and protein fractions. *Process Biochemistry*, 40:3680-3692.
36. Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45:187-194.
37. Wu, H.-C., Chen, H.-M. and Shiau, C.-Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36:949-957.
38. Yang, B., Zhao, M., Shi, J., Yang, N. and Jiang, Y. 2008. Effect of ultrasonic treatment on the recovery and DPPH radical scavenging activity of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Food Chemistry*, 106: 685-690.
39. Yang, X.-R., Zhang, L., Ding, D.-G., Chi, C.-F., Wang, B. and Huo, J.-C. 2019. Preparation, identification, and activity evaluation of eight antioxidant peptides from protein hydrolysate of hairtail (*Trichiurus japonicas*) muscle. *Marine Drugs*, 17: 23.
- sturgeon *Huso huso* using Alcalase. *International Aquatic Research*, 1: 31-38.
25. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction. *The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics*, 44: 307-315.
26. Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M. A. and Ramírez-Suárez, J. C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. *Food Chemistry*, 109:782-789.
27. Pearce, K. N. and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26:716-723.
28. Raftani Amiri, Z., Safari, R. and Bakhshandeh, T. 2016. Functional properties of fish protein hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle produced by two commercial enzymes. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 15: 1485-1499.
29. Ren, J., Wang, H., Zhao, M., Cui, C. and Hu, X. 2010. Enzymatic hydrolysis of grass carp myofibrillar protein and antioxidant properties of hydrolysates. *Czech Journal of Food Sciences*, 28:475-484.
30. Rodríguez-Ambriz, S., Martínez-Ayala, A., Millán, F. and Davila-Ortiz, G. 2005. Composition and functional properties of *Lupinus campestris* protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60:99-107.
31. Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M., Gildberg, A. and Rasco, B. 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 73-79.
32. Sakanaka, S., Tachibana, Y. and Okada, Y. 2005. Preparation and antioxidant properties of extracts of Japanese persimmon leaf tea (kakinoha-cha). *Food Chemistry*, 89: 569-575.

(Original Research Paper)

Investigation of Functional and Antioxidant Properties of Protein Hydrolysates from Caspian White Fish(*Rutilus kutum*) Viscera using Alcalase and Trypsin Enzymes

Maryam Norouzi ChaKali¹, Shabnam Haghghat Khajavi^{2*}, Reza Safari³

1-M.Sc Graduated of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3-Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran.

Received:09/10/2019

Accepted:08/07/2020

Abstract

In the present study, the white fish (*Rutilus kutum*) viscera protein was hydrolyzed by the application of different concentrations of 0.5, 1, 1.5% Alcalase and Trypsin. Chemical composition, functional properties and antioxidant activities of fish hydrolysate was then analyzed. Results of this research indicated that the fish protein hydrolysates (FPH) contain high protein content. The maximum amount of soluble protein and protein recovery was seen in hydrolyzed protein produced by 0.5 % Alcalase (76.87, 46.87%). According to the results, highest degree of hydrolysis (33.1%) was observed for 1.5 % Alcalase. The maximum rate of water holding capacity was seen in the FPH produced by 1.5% Alcalase (84.83%) and increased significantly with increasing enzyme concentration ($P < 0.05$). The FPHs at different concentrations showed good antioxidant properties. The highest antioxidant properties and reduction capacity were obtained by using 0.5% Alcalase (76.9, 0.8%). Good foaming and emulsifying properties were observed for fish protein hydrolysates. The current research suggested that the hydrolyzed protein from Caspian white fish viscera can be a good source of protein with high antioxidant and functional activity, that can perform acceptable emulsifying and foaming properties in food formulations.

Keywords: White Fish (*Rutilus kutum*) Viscera, Protein Hydrolysate, Antioxidant Activity, Functional Properties, Enzymatic Hydrolysis.

*Corresponding Author: sh.h.khajavi@gmail.com