

## اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی بر درجه هیدرولیز و فعالیت ضداکسیدانی پروتئین سر کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*)

علی لرزانی<sup>۱</sup>، لاله رومیانی<sup>۲</sup>

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران  
۲- نویسنده مسئول: گروه شیلات، واحد اهواز، دانشگاه آزاد اسلامی، اهواز، ایران. پست الکترونیکی: l.roomiani@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۷/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۱۷

### چکیده

**سابقه و هدف:** هیدرولیز آنزیمی فن آوری مؤثر و عملی است که پروتئین‌های با ارزش را از ماهیان پرورشی که بازارپسندی کمتری دارند، بدون از دست دادن خواص تغذیه‌ای، بازیابی می‌کند. از طرفی هیدرولیز آنزیمی منابع پروتئینی نظیر آبزیان، نوعی بازیافت پروتئین محسوب می‌شود. در تحقیق حاضر اثر متغیرهای دما، زمان و غلظت آنزیم پاپائین روی درجه هیدرولیز و فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** پروتئین هیدرولیز شده سر کپور سرگنده با استفاده از آنزیم پاپائین (با نسبت ۱:۱۰۰) به مدت ۴ ساعت تهیه شد. متغیرهای مورد بررسی جهت رسیدن به بهترین شرایط هیدرولیز، دما ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۳۰، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ دقیقه و غلظت آنزیم ۲، ۴، ۵ و ۱۰ درصد بودند.

**یافته‌ها:** نتایج مطالعه حاضر نشان داد پروتئین هیدرولیز شده در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، غلظت ۵ درصد آنزیم و زمان ۷۲ دقیقه بالاترین سطح فعالیت ضداکسیدانی ( $0.44 \pm 0.45/25$  درصد) را داشت. بالاترین درجه هیدرولیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۹۶ دقیقه و غلظت ۱۰ درصد آنزیم  $0.90 \pm 0.27/36$  درصد اندازه‌گیری شد.

**نتیجه‌گیری:** با توجه به نتایج می‌توان گفت اجزاء دور ریختنی ماهی کپور سرگنده مانند بخش سر، به عنوان منبعی از ضداکسیدان‌های طبیعی کاربرد دارند.

**واژگان کلیدی:** پروتئین هیدرولیز شده، آنزیم پاپائین، فعالیت ضداکسیدانی، درجه هیدرولیز

### • مقدمه

همانند آلکالاز، پپسین، نئوتراز، پروتوماکس، تریپسین، آ-کموتریپسین، ان- پروتئاز، آ-پروتئاز، پروناز، برومیلان، اف-کریتونین، اورینتاز، والیداز و ترمولیزین برای تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی استفاده می‌شوند (۳). هیدرولیز آنزیمی سبب پدید آمدن کاهش می‌دهد و از این رو در پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با ساختار معمول آن، دسترسی به اسیدهای آمینه برای انسان و حیوانات بیشتر است. علاوه بر این از پروتئین هیدرولیز شده می‌توان به عنوان مکمل برای سایر غذاها استفاده کرد (۴). در مقایسه با هیدرولیز شیمیایی، اگر هیدرولیز آنزیمی شرایط کنترل بهتری را برای عمل‌آوری از

پروتئین هیدرولیز شده بخش کوچکی از پپتیدهایی است که در بردارنده اسیدهای آمینه متنوعی است (۱). این ترکیبات را می‌توان با استفاده از روش‌ها، ترکیبات و حلال‌های قوی شیمیایی از انواع پروتئین استخراج کرد. حلال‌های شیمیایی به دلیل ماهیت آنها جهت استفاده در صنعت غذا نامناسب هستند، درحالی‌که استخراج پروتئین با استفاده از آنزیم، سبب تولید محصولی بهتر از نظر ارزش غذایی و عملکرد می‌شود (۲). در سال‌های اخیر، تکنیک‌های هیدرولیز آنزیمی پروتئین، برای بازیابی پپتیدهای پراهمیت زیست‌شناختی و تغذیه‌ای آبزیان مورد استفاده قرار گرفته است. آنزیم‌های متنوعی

استفاده کرد. با توجه به ارزش پروتئین هیدرولیز شده و تأثیر شرایط عمل‌آوری روی کیفیت این ماده و عدم وجود تحقیق در مورد بخش سر این گونه به عنوان منبع پروتئینی تحت تأثیر این آنزیم، این مطالعه با هدف بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر درجه آن و فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور سرگنده با استفاده از آنزیم پاپائین طراحی شد.

### • مواد و روش‌ها

**آماده‌سازی نمونه:** نمونه‌های کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با میانگین وزن  $1/98 \pm 150$  گرم از بازار ماهی-فروشان اهواز تهیه و در یخدان حاوی یخ با نسبت ۲:۱ (ماهی:یخ) به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از تمیز کردن و شستشو با آب سرد، نمونه‌ها در پلاستیک‌های درب‌دار بسته‌بندی و تا زمان آماده‌سازی در دمای  $20^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. قبل از انجام مراحل هیدرولیز آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۲ ساعت در دمای  $4^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند (۱۳).

**هیدرولیز پروتئین:** پس از جداسازی سر از بدن ماهیان، این بخش سه بار توسط چرخ گوشت (انگلستان، شرکت کنوود مدل KM010) چرخ گردید. برای غیرفعال کردن آنزیم‌های داخلی، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $90^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد در حمام آبی قرار گرفتند. سپس مواد چرخ شده با محلول اسید هیدروکلریک که دارای pH برابر با ۲ است با نسبت وزنی - حجمی ۱ به ۲، یکنواخت شد. برای تهیه پروتئین هیدرولیز شده،  $50$  گرم از نمونه چرخ شده در ارن‌مایرهای  $250$  میلی‌لیتری ریخته شد. سپس با نسبت ۲:۱ با  $100$  میلی‌لیتر آب مقطر ترکیب و با استفاده از هیدروکسید سدیم  $0/2$  مولار pH آن به ۶ که فعالیت بهینه آنزیم بود (۱۳)، رسانده شد. پس از آن ظروف نمونه‌ها در انکوباتور شیکردار (کره جنوبی، VS-8480) در دمای  $37^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد (دمای مناسب فعالیت آنزیم) با دور ثابت  $200$  دور در دقیقه قرار داده شدند. سپس آنزیم پاپائین (ساخت شرکت Merck، کشور آلمان) با غلظت-های ۲، ۴، ۵ و ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) به ظروف مربوط به هر تیمار اضافه و تیمارهای مختلف تحت تأثیر دماها (۳۵، ۳۷، ۳۹ و  $42^\circ\text{C}$  درجه سانتی‌گراد) و زمان‌های (۳۰، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) مختلف قرار گرفتند. در واقع، تیمارها شامل ظروف محتوی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی با ۴ غلظت آنزیم، تحت ۴ زمان و ۴ دمای مختلف قرار داده شدند. همه نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت در انکوباتور شیکردار هم‌زده شدند. به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای  $90^\circ\text{C}$  درجه

نظر سرعت واکنش داشته باشد، محصول بدست آمده کیفیت بالاتری را خواهد داشت (۵). هیدرولیز آنزیمی روشی مناسب و مفید برای بهبود خواص عملکرد پروتئین‌ها و حفظ ارزش غذایی آنها است (۶) که کارایی آن بستگی به عوامل متعددی از جمله نوع آنزیم، بستر مورد استفاده، شرایط هیدرولیز همانند غلظت آنزیم، درجه حرارت، pH و زمان (۸، ۷) دارد. می‌توان از هیدرولیز آنزیمی برای افزایش حلالیت پروتئین و بهبود خواص عملکردی پروتئین ماهی جهت به‌کارگیری در فرآورده‌های مختلف آبزیان مانند سوریمی، ماهی‌انگشتی، برگر ماهی و پانه استفاده کرد (۴). پروتئین‌های بدست آمده از هیدرولیز آنزیمی با کنترل شرایط واکنش می‌توانند سبب بهبود کیفیت و خواص عملکردی همانند حلالیت، ظرفیت نگهداری روغن و ظرفیت نگهداری آب، امولسیون و ویژگی‌های حسی شوند (۹). م صرف این ماده امکان پی‌شگیری و درمان بیماری‌های متعددی از جمله سندروم‌های گوارشی را به شکل بالقوه‌ای افزایش می‌دهد.

در اثر هیدرولیز آنزیمی، دو بخش پروتئین‌های محلول و نامحلول تولید می‌شوند که روند و شرایط آماده‌سازی نقش بسیار مهمی در بهبود کیفیت و ارزش ماده تولیدی دارد و در واقع فاز جامد که غنی از مواد آلی و معدنی است از فاز مایع که محتوی پروتئین‌های محلول، پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد است جدا می‌شود (۱۰)، که در تعدادی از مطالعات از جمله Mehregan Nikoo و همکاران (۲۰۱۳) روی بهینه‌سازی عوامل مؤثر در فعالیت ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (۱۱)، Rafatinia و Roomiani (۲۰۱۸) تأثیر سه نوع آنزیم (آل‌کالاز، فلاورزایم و پیپسین)، دما و زمان روی ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء کپور علف‌خوار (۱۲)، Noman و همکاران (۲۰۱۸) اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی بر درجه هیدرولیز و ویژگی‌های عملکردی پروتئین هیدرولیز شده ماهی خاویاری چینی با استفاده از آنزیم پاپائین (۱۳) و Sandoval-Gallardo و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر شرایط دمایی و pH بر هیدرولیز پروتئین ماهی هرینگ (*Ophistonema libertate*) (۱۴) اشاره کرد. هدف اصلی مطالعات فوق، تبدیل ضایعات ماهی به پروتئین بود. پروتئین بدست آمده علاوه بر ارزش تغذیه‌ای دارای خواص عملکردی نیز می‌باشد. ماهی کپور سرگنده جزو ماهیان پرورشی در ایران محسوب می‌گردد که از بین ۴ گونه پرورشی به علت سر بزرگ آن از محبوبیت کمتری در بازار برخوردار است و چون سر آن دور ریخته می‌شود، می‌توان از آن به عنوان منبع پروتئین

نانومتر صورت گرفت. استانداردهای وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده شامل: سیتوکروم C (۱۲۴۰۰ دالتون)، کربنیک-آنهدراز (۲۹۰۰۰ دالتون)، آپروتینین (۶۵۰۰ دالتون)، باسیتراسین (۱۴۲۲ دالتون) و HHL (۴۲۹ دالتون) بودند (۱۵).  
**تجزیه و تحلیل اطلاعات:** تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPPSS 20 برای آنالیز داده‌ها و از نرم‌افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده گردید. تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

### • یافته‌ها

**بررسی اثر دما، زمان و غلظت آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز:** در دماهای ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ دقیقه، غلظت آنزیم پاپائین تأثیر معنی‌داری بر روی درجه هیدرولیز نداشت ( $P > 0.05$ ). در زمان ۳۰ دقیقه و در دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، با افزایش غلظت آنزیم درجه هیدرولیز زیاد شد. در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد، در زمان‌های ۷۲ و ۹۶ دقیقه با افزایش غلظت آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش یافت. همچنین نتایج نشان داد که درجه هیدرولیز با افزایش زمان و رسیدن به ۹۶ دقیقه افزایش معنی‌داری را نشان داد ( $P < 0.05$ ). بالاترین درجه هیدرولیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۹۶ دقیقه و غلظت آنزیم ۱۰ درصد و با مقدار  $27/36 \pm 0/90$  درصد اندازه‌گیری شد (جدول ۱).

**بررسی اثر دما، زمان و غلظت آنزیم بر فعالیت آنتی-اکسیدانی:** تأثیر دما، زمان و غلظت آنزیم پاپائین بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپورسرگنده در جدول ۲ نشان داده شده است. بر اساس این جدول روند تغییرات ثابتی در طول آزمایش و در تیمارهای مختلف قابل مشاهده است، به شکلی که با افزایش دما و غلظت آنزیم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش معنی‌داری پیدا کرد ( $P < 0.05$ ). با توجه به نتایج بدست آمده بالاترین سطح فعالیت آنتی‌اکسیدانی ( $45/25 \pm 0/44$  درصد) در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، مدت زمان ۷۲ دقیقه و غلظت ۵ درصد آنزیم بدست آمد.

سانتی‌گراد قرار گرفتند. دمای مخلوط با استفاده از حمام یخ کاهش یافت و در نهایت جهت به دست آوردن محلول پروتئین هیدرولیز شده، نمونه به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۵۰۰۰ سانتریفیوژ (شرکت فرزانه آرمان-ایران-FL 5000) و مایع رویی با استفاده از دستگاه خشک‌کن تصعیدی (Opran, FDB 5503) خشک گردید (۱۳).

**اندازه‌گیری درجه هیدرولیز:** میزان درجه هیدرولیز با استفاده از اسیدتری کلرواستیک ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) اندازه‌گیری شد. درصد نسبت پروتئین‌های محلول در اسید فوق به کل پروتئین‌های موجود در نمونه سانتریفیوژ شده پس از هیدرولیز مبنای استفاده از این روش است. حجم مساوی از محلول پروتئین جدا شده با محلول اسیدتری کلرواستیک مخلوط و پس از هم‌زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۰۰۰ سانتریفیوژ شد. میزان درجه هیدرولیز از معادله ۱ به دست آمد (۱۵):

$$DH = TCA\ 10\% - Soluble\ in\ sample\ n \times 100\ Total\ N\ in\ sample$$

**خواص ضد اکسیدانی:** ۰/۰۵ گرم از نمونه با ۳ میلی‌لیتر اتانول مخلوط و ۳ میلی‌لیتر DPPH ۰/۱ میلی‌مولار به آن اضافه شد. نمونه‌ها در تاریکی و دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. قرائت در طول موج ۵۱۷ نانومتر و با استفاده از اسپکتروفوتومتر و بر حسب درصد به صورت معادله ۲ خوانده شد (۱۶).

$$DPPH = 1 - \frac{A_{517}Sample}{A_{517}Sample} \times 100$$

**تعیین دامنه وزن مولکولی:** دامنه وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده بخش سر کپور سرگنده توسط آنزیم پاپائین توسط دستگاه HPLC (Agilent، ساخت کشور آمریکا) با مشخصات زیر بدست آمد: ستون TSK-gel2000 ( $7/8 \times 300\ mm$ ) تعیین شد. فاز متحرک حلال استونیتریل:آب (۶۰:۴۰، حجمی/حجمی) حاوی ۰/۱ درصد تری‌فلورواتیک اسید بود. سرعت جریان ۰/۵ میلی‌لیتر بر دقیقه بود. جذب در ۲۲۵

جدول ۱. نتایج مقادیر متفاوت دما، زمان و غلظت آنزیم پاپائین بر میزان درجه هیدرولیز

آنزیم (غلظت)	زمان (دقیقه)	۳۰	۴۸	۷۲	۹۶
۳۵ درجه سانتی‌گراد					
۲		۱۲/۳۶±۰/۹۸ Aa	۱۵/۹۲±۰/۱۹ Ab	۱۷/۳۲±۰/۴۵ Ac	۱۸/۴۵±۰/۳۵ Ad
۴		۱۴/۵۱±۰/۵۵ Ba	۱۶/۵۱±۰/۴۹ Bb	۱۷/۸۵±۰/۵۵ Ac	۱۹/۲۵±۰/۳۲ Bd
۵		۱۵/۲۲±۰/۵۰ Ca	۱۷/۳۸±۰/۶۵ Cb	۱۸/۲۴±۰/۸۶ Bc	۱۹/۸۴±۰/۴۵ Bd
۱۰		۱۴/۳۸±۰/۱۶ Ca	۱۷/۶۵±۰/۰۵ Cb	۱۹/۲۱±۰/۷۰ Cc	۲۰/۲۲±۰/۱۷ Cd
۳۷ درجه سانتی‌گراد					
۲		۱۴/۳۸±۰/۴۴ Aa	۱۶/۵۷±۰/۳۷ Ab	۱۸/۲۲±۰/۷۰ Ac	۲۲/۱۹±۰/۸۶ Ad
۴		۱۵/۲۱±۰/۲۹ Ba	۱۶/۷۷±۰/۶۷ Ab	۱۹/۴۶±۰/۶۷ Ac	۲۲/۹۳±۰/۳۹ Ad
۵		۱۶/۱۷±۰/۸۰ Ca	۱۸/۵۱±۰/۱۸ Bb	۱۹/۵۹±۰/۵۵ Ac	۲۳/۲۵±۰/۵۰ Ad
۱۰		۱۶/۴۸±۰/۴۹ Ca	۱۹/۱۵±۰/۲۳ Cb	۱۹/۸۸±۰/۲۵ Ab	۲۳/۵۱±۰/۶۳ Ac
۳۹ درجه سانتی‌گراد					
۲		۱۵/۸۵±۰/۷۳ Aa	۱۸/۲۵±۰/۴۰ Ab	۲۰/۴۴±۰/۷۳ Ac	۲۳/۶۵±۰/۰۷ Ad
۴		۱۶/۲۳±۰/۵۶ Ba	۱۹/۵۸±۰/۱۶ Bb	۲۱/۳۳±۰/۸۸ Ac	۲۳/۴۸±۰/۱۱ Ad
۵		۱۷/۴۸±۰/۲۵ Ca	۲۰/۱۹±۰/۶۶ Cb	۲۱/۹۶±۰/۸۹ Ac	۲۴/۲۱±۰/۲۶ Ad
۱۰		۱۷/۱۱±۰/۵۹ Ca	۲۱/۷۷±۰/۴۱ Db	۲۲/۱۶±۰/۴۹ Ac	۲۴/۶۷±۰/۱۹ Ad
۴۲ درجه سانتی‌گراد					
۲		۱۷/۲۱±۰/۷۳ Aa	۱۹/۶۷±۰/۲۴ Ab	۲۳/۵۶±۰/۸۹ Ac	۲۵/۲۵±۰/۷۶ Ad
۴		۱۸/۴۷±۰/۶۱ Aa	۱۹/۹۵±۰/۷۴ Ab	۲۴/۴۸±۰/۷۲ Ac	۲۶/۱۴±۰/۴۴ Ad
۵		۱۸/۳۱±۰/۸۰ Aa	۲۰/۴۴±۰/۵۶ Ab	۲۵/۷۱±۰/۹۰ Ac	۲۶/۸۹±۰/۲۴ Ad
۱۰		۲۰/۱۹±۰/۴۹ Ba	۲۱/۴۴±۰/۳۳ Ba	۲۴/۶۷±۰/۲۹ Ac	۲۷/۲۶±۰/۹۰ Ad

حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف است ( $P < 0.05$ )  
حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ )

جدول ۲. بررسی اثر دما، زمان و غلظت آنزیم بر فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر کپور سرگنده

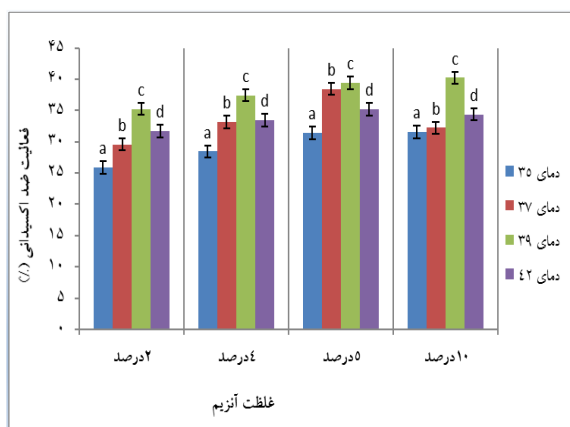
آنزیم (درصد)	زمان (دقیقه)	۳۰	۴۸	۷۲	۹۶
۳۵ درجه سانتی‌گراد					
۲		۲۲/۳۶±۱/۱۴ Aa	۲۵/۸۹±۱/۱۵ Ab	۳۴/۶۱±۱/۱۷ Ac	۲۹/۲۷±۱/۴۴ Ad
۴		۲۵/۶۳±۱/۰۵ Aa	۲۸/۴۴±۰/۷۸ Ab	۳۵/۵۱±۰/۳۰ Ac	۳۳/۲۵±۰/۱۹ Bd
۵		۲۹/۴۱±۱/۰۴ Ba	۳۱/۴۶±۱/۴۰ Bb	۳۸/۱۴±۰/۲۱ Bc	۳۵/۲۱±۱/۲۳ Bd
۱۰		۲۷/۶۶±۰/۳۷ Ba	۳۱/۵۵±۰/۹۱ Bb	۳۶/۲۲±۰/۵۲ Bc	۳۳/۶۹±۰/۴۷ Bd
۳۷ درجه سانتی‌گراد					
۲		۲۴/۵۵±۰/۶۷ Aa	۲۹/۵۸±۲/۴۵ Ab	۳۶/۲۹±۲/۶۴ Ac	۳۳/۶۶±۰/۵۶ Ad
۴		۲۷/۶۱±۰/۱۰ Ba	۳۳/۱۶±۰/۶۷ Bb	۳۹/۴۶±۱/۱۶ Bc	۳۵/۲۱±۰/۹۵ Bd
۵		۳۳/۵۱±۰/۱۳ Ca	۳۸/۴۷±۰/۳۹ Cb	۴۳/۵۵±۱/۳۸ Cc	۳۸/۴۴±۰/۲۵ Cd
۱۰		۳۰/۲۲±۱/۷۲ Da	۳۲/۲۲±۰/۶۶ Bb	۳۹/۷۱±۱/۵۶ Bc	۳۶/۲۷±۰/۷۱ Dd
۳۹ درجه سانتی‌گراد					
۲		۲۷/۵۸±۰/۱۴ Aa	۳۵/۲۶±۰/۴۲ Ab	۳۷/۶۸±۰/۸۱ Ac	۳۹/۵۵±۰/۳۴ Ad
۴		۲۹/۳۶±۰/۲۵ Ba	۳۷/۴۴±۰/۱۳ Bb	۴۱/۲۵±۰/۴۸ Bc	۴۰/۱۹±۰/۶۴ Bd
۵		۳۵/۴۱±۰/۹۸ Ca	۳۹/۴۱±۰/۳۶ Cb	۴۴/۱۷±۰/۶۰ Cc	۴۲/۳۶±۰/۷۱ Cd
۱۰		۳۳/۴۱±۰/۷۱ Da	۴۰/۲۲±۰/۷۲ Db	۴۲/۲۳±۰/۱۹ Dc	۴۰/۲۵±۰/۲۵ Db
۴۲ درجه سانتی‌گراد					
۲		۲۵/۴۷±۰/۱۸ Aa	۳۱/۶۷±۱/۲۲ Ab	۴۰/۱۹±۰/۹۸ Ac	۳۷/۵۵±۰/۳۲ Ad
۴		۲۷/۵۶±۰/۴۴ Ba	۳۳/۴۲±۰/۸۹ Bb	۴۱/۸۳±۰/۶۰ Bc	۳۹/۷۴±۱/۶۶ Bd
۵		۳۲/۶۹±۰/۴۸ Ca	۳۵/۲۴±۰/۵۵ Cb	۴۵/۲۵±۰/۴۴ Cc	۴۳/۵۹±۰/۶۳ Cd
۱۰		۲۸/۸۱±۱/۵۲ Da	۳۴/۳۸±۰/۶۹ Db	۴۳/۵۱±۱/۲۷ Dc	۴۲/۵۷±۰/۷۸ Dd

حروف بزرگ متفاوت در هر ستون نشان دهنده وجود تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در تیمارهای مختلف است ( $P < 0.05$ )  
حروف کوچک متفاوت در هر ردیف نشان دهنده تفاوت معنی دار بین میانگین‌ها در روزهای مختلف است ( $P < 0.05$ )

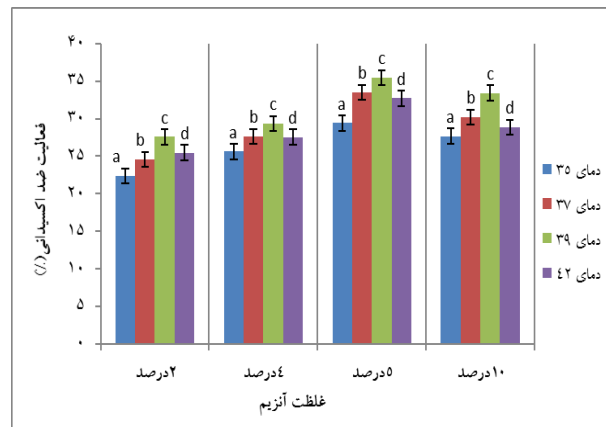
در دمای ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد دارای اختلاف معنی‌دار آماری نبودند ( $P > 0/05$ ). در زمان ۹۶ دقیقه، غلظت ۲ درصد آنزیم و دمای ۳۹ درجه سانتی‌گراد و ۴ درصد آنزیم در دو دمای ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند ( $P < 0/05$ ).

دامنه وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده در شکل ۳ آمده است و نتایج نشان داد که ۳ قسمت مشخص جداسازی شد (بزرگتر از ۱۰۰۰ دالتون، ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون و کمتر از ۳۰۰ دالتون). همان‌طور که شکل ۳ نشان می‌دهد پپتیدهای با وزن ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون، بیشتر از ۵۰ درصد را بخود اختصاص دادند. نمونه‌های هیدرولیز شده با ۱۰ درصد آنزیم، بیشترین درصد (۹۶ درصد) را در بین پپتیدهای ۳۰۰ تا ۱۰۰۰ دالتون داشتند.

در دو زمان ۳۰ و ۴۸ دقیقه، تأثیر دما بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در شکل ۱ نشان داده شده است. دو نمودار الف و ب نشان می‌دهند که با افزایش دما فعالیت آنتی‌اکسیدانی در غلظت‌های یکسان آنزیم، افزایش یافت، اما دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در مقایسه با ۴۲ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری داشت ( $P < 0/05$ ). در درصد‌های یکسانی از آنزیم، در دو زمان ۷۲ و ۹۶ دقیقه (شکل ۲)، با افزایش دمای هیدرولیز، درجه هیدرولیز نیز افزایش یافت و بالاترین درجه هیدرولیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و کمترین آن در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. فعالیت ضداکسیداسیونی در تیمار با غلظت ۴ درصد آنزیم در دو دمای ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، تیمار ۵ درصد آنزیم در دماهای ۳۷، ۳۹، ۴۲ درجه سانتی‌گراد و تیمار ۱۰ درصد آنزیم

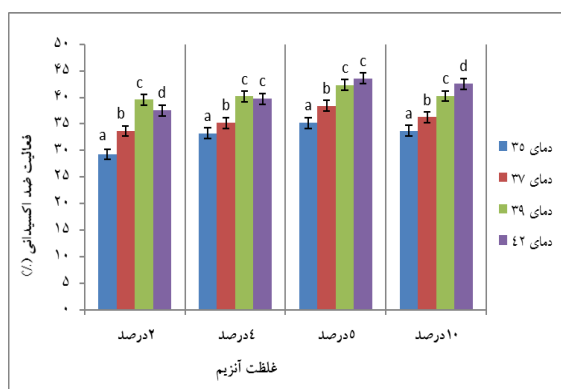


ب

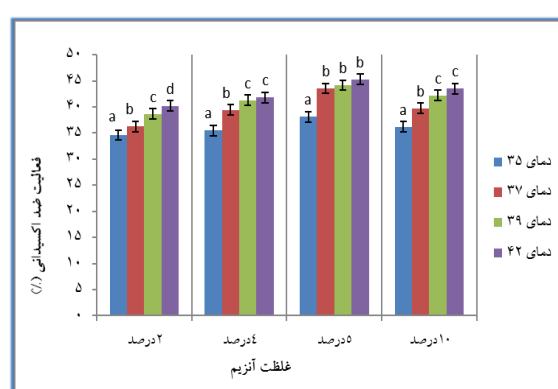


الف

شکل ۲. تأثیر غلظت آنزیم پاپائین بر روی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور سرگنده در مدت زمان الف) ۳۰، ب) ۴۸ دقیقه

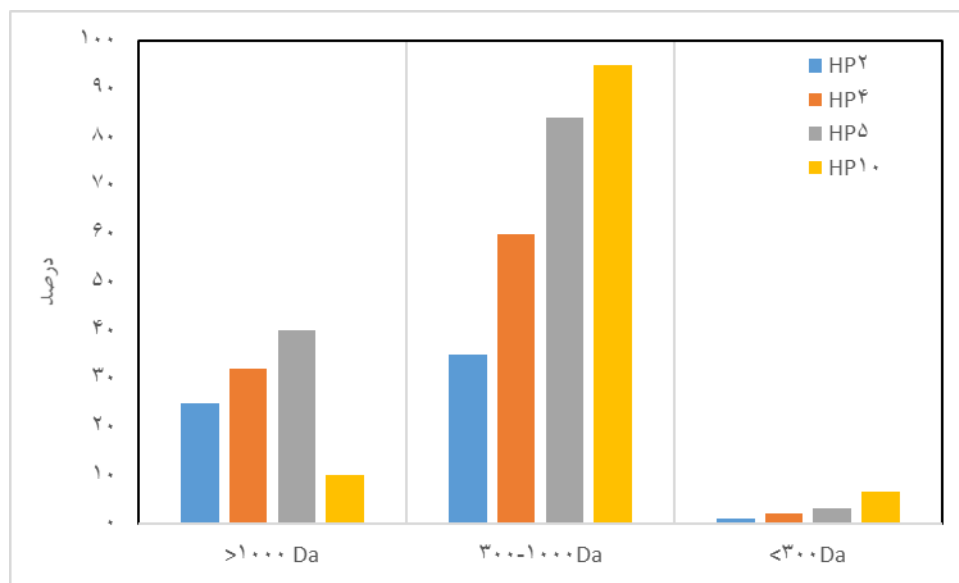


ب



الف

شکل ۲. تأثیر غلظت آنزیم پاپائین بر روی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور سرگنده در مدت زمان الف) ۷۲، ب) ۹۶ دقیقه



شکل ۳ توزیع وزن ملکولی پروتئین هیدرولیز شده قسمت سر ماهی کپور سرگنده توسط آنزیم پاپائین در غلظت های ۲، ۴، ۵ و ۱۰ درصد آنزیم

## • بحث

در این مطالعه اثر شرایط هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور سرگنده مورد بررسی قرار گرفت. جهت مشخص شدن دقیق عوامل مؤثر بر روی متغیرهای مورد بررسی، داده‌های بدست آمده از چند جهت مورد بررسی قرار گرفتند.

در بررسی تأثیر زمان بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی، نتایج نشان داد در دماهای ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، بالاترین سطح فعالیت آنتی اکسیدانی در دقیقه ۷۲ بدست آمد و افزایش زمان هیدرولیز به ۹۶ دقیقه، سبب کاهش این فعالیت شد، هر چند فعالیت آنتی اکسیدانی در دقیقه ۹۶ در مقایسه با دقیق ۳۰ و ۴۸ همچنان بالاتر بود. در مطالعه هیدرولیز اسکوئید توسط Fang و همکاران (۲۰۱۲) در محدوده‌های ۳۰ تا ۵۱ دقیقه افزایش و سپس در محدوده‌های ۵۱ تا ۶۰ دقیقه کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی گزارش شد (۱۷) که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارد. با افزایش زمان هیدرولیز آسپیون، باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش و طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد و از میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم نیز کاسته می‌شود (۱۸). همچنین با افزایش زمان هیدرولیز، شکل‌گیری ترکیباتی که از فعالیت آنزیمی جلوگیری می‌کنند نیز افزایش می‌یابد (۱۹).

پپتیدهای زیست فعال آزاد شده توسط آنزیم‌های هیدرولیز کننده پروتئین، دارای توانایی مهار رادیکال‌های آزاد کننده هیدروژن بوده و توانایی جلوگیری از نفوذ

آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن را دارند (۲۰) که این امر تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده را در اثر فعالیت آنزیم هیدرولیز کننده تأیید می‌کند. در بررسی تأثیر درصد آنزیم بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی، نتایج نشان داد در دماهای ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد، افزایش غلظت آنزیم سبب افزایش معنی‌دار فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین شد اما این افزایش تا سطح ۵ درصد ادامه داشت و با افزایش آن به ۱۰ درصد آنزیم، سطح فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت، هر چند همچنان بالاتر از سطوح ۲ و ۴ درصد بود. Wisuthiphaet و Kongruang (۲۰۱۵)، در بررسی تأثیر آنزیم پاپائین بر روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، عنوان کردند که درجه هیدرولیز و زمان ارتباط معنی‌دار با یکدیگر نداشتند (۲۱). با افزایش سطح آنزیم، طول زنجیره‌های پپتیدی تغییر کرده و کوچکتر می‌شود و با توجه به اینکه پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (۱۶)، یافته‌های بدست آمده در این تحقیق قابل توجیه است، اما زمانی که وضعیت از شرایط بهینه (۵ درصد آنزیم) عبور کرد، درجه هیدرولیز کاهش یافت. در واقع با افزایش شدت هیدرولیز در اثر افزایش غلظت آنزیم (بیشتر از ۵ درصد آنزیم)، پپتیدهای بسیار محلول با خواص کارکردی کم تولید می‌شوند (۲۲) که کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی را توجیه می‌کند. ارتباط معنی‌دار بین افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی و بالا رفتن غلظت آنزیم در مطالعات مختلف گزارش شده است (۲۳، ۲۴). در مطالعه حاضر در یک سطح فعالیت آنزیمی ثابت با افزایش دمای هیدرولیز در ۳۰ و ۴۸ دقیقه، ابتدا قدرت مهارکنندگی

*Acipenser sinensis*) افزایش زمان فرآیند را عاملی مهم برای افزایش میزان پروتئین هیدرولیز شده دانستند (۱۳) که افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیزاسیون را افزایش داد که با یافته‌های مطالعه حاضر هم‌خوانی دارند. مقایسه تأثیر دماهای ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه‌سانتی‌گراد بر روی فعالیت آنزیم و تأثیر این عوامل بر روی درجه هیدرولیز نشان داد که در درصدهای یکسان آنزیم با افزایش دمای هیدرولیز، درجه هیدرولیز نیز افزایش یافت و بالاترین درجه هیدرولیز در دمای ۴۸ درجه سانتی‌گراد بدست آمد. Motamedzadegan و همکاران (۲۰۰۹) عنوان کردند که افزایش دما روی اندازه پپتیدها و در نتیجه هیدرولیزاسیون موثر نیست (۳۰) اما در بررسی هیدرولیز ضایعات ماهی شیزوتراکس (*Schizothorax zarudnyi*) افزایش دما باعث افزایش سرعت واکنش‌های آنزیمی شد ولی با تأثیر بر ساختار پروتئینی آنزیم‌ها باعث کاهش سرعت و هیدرولیزاسیون شد و دمای مطلوب را ۳۷ درجه سانتی‌گراد گزارش کردند (۳۱). شرایط متفاوت آزمایش هیدرولیز، نوع آنزیم و نیز تفاوت در گونه ماهی از جمله دلایل احتمالی اختلاف در نتایج است. بهترین شرایط برای هیدرولیزاسیون آنزیم پاپائین وابسته به دما است (۳۲).

Noman و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی هیدرولیز پروتئین ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sinensis*) با افزایش درجه حرارت واکنش از ۳۵ به ۷۰ درجه سانتی‌گراد، پروتئین هیدرولیز شده افزایش معنی‌داری از ۱۵/۳۱ به ۲۳/۳۵ درصد داشت (۱۳). در مطالعه بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) با استفاده از آنزیم پرومود، Javadian و همکاران (۱۳۹۴) بالاترین درجه هیدرولیزاسیون را در درجه حرارت ۳۹/۶۴ سانتی‌گراد و میزان آنزیم ۱/۳۶ درصد و زمان ۲۱/۰۲ دقیقه گزارش کردند (۳۳). Abdulazeez و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر آنزیم پاپائین، غلظت آنزیم ۱ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶ ساعت را بهترین شرایط برای هیدرولیز ذکر کردند (۲۷). Mehregan Nikoo و همکاران (۲۰۱۳) دمای ۴۸/۱۱ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه را به عنوان بهترین شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) گزارش کردند (۱۱).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ضایعات سر ماهی کپور سرگنده، پتاز سیل بالقوه‌ای برای تولید پروتئین هیدرولیز شده دارد و آنزیم پاپائین به خوبی قادر به هیدرولیز این پروتئین بود. شرایط بهینه تولید پروتئین هیدرولیز شده با بالاترین درجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به تیمار ۵ درصد

بالا رفته و سپس از میزان آن کاسته شد. اما در دقایق ۷۲ و ۹۶ دقیقه، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. Fang و همکاران (۲۰۱۲) نشان دادند که در هیدرولیز اسکوئید با افزایش دما از ۴۵ تا ۵۱ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت (۱۷) اما با افزایش دما و رسیدن به محدوده دمایی ۵۱ تا ۵۵ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. همچنین چنین روندی در مطالعه Guerard و همکاران (۲۰۰۷) نیز مشاهده شد و در دماهای بالا خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت (۲۵).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده تحت تأثیر عوامل مختلفی از قبیل نوع پپتید، وزن مولکولی، توالی اسیدهای آمینه و درجه هیدرولیز بستگی دارد و برای بروز بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی باید شرایطی فراهم شود که درجه هیدرولیز در حد خاصی باشد (۲۶). Noman و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی هیدرولیز پروتئین ماهی خاویاری چینی (*Acipenser sinensis*) گزارش کردند که در غلظت‌های پایین آنزیم هیدرولیزکننده (۵/۰ درصد) میزان پروتئین هیدرولیز شده ۱۶/۷ درصد بود و با افزایش سطح آنزیم از ۰/۵ تا ۳ درصد، میزان هیدرولیز پروتئین از ۱۶/۰۷ درصد به ۲۳/۳۵ درصد رسید که عمدتاً ناشی از ناکافی بودن سایت‌های کاتالیزیستی مورد نیاز برای فرآیندهای هیدرولیز است (۱۳).

درجه هیدرولیز به درصد باندهای پپتیدی شکسته‌شده گفته می‌شود (۲۷) و نشان دهنده کارآمدی واکنش هیدرولیز پروتئین است. در مورد درجه هیدرولیز پروتئین ماهی کپور سرگنده، نتایج نشان داد که در تیمارهای دمایی ثابت، افزایش زمان هیدرولیز سبب افزایش درجه هیدرولیز و همچنین با افزایش در صد آنزیم، درجه هیدرولیز نیز افزایش نشان داد. به این ترتیب در دماهای مختلف، تیمار ۱۰ درصد آنزیم و زمان هیدرولیز ۹۶ دقیقه بهترین نتیجه را داشت. Wisuthiphaet و Kongruang (۲۰۱۵) در بررسی تأثیر آنزیم پاپائین بر روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، عنوان کردند که درجه هیدرولیز افزایش معنی‌دار با زمان داشت (۲۱).

افزایش واکنش هیدرولیزاسیون با افزایش سطح آنزیم در مطالعه Hoseyni nejad و Shahidi (۲۰۰۶) گزارش شده است (۲۸). در مطالعه Soleimani و همکاران (۲۰۱۶) بر روی پروتئین هیدرولیز شده کیلکا، بالاترین میزان درجه هیدرولیز در دقیقه ۲۴۰ بدست آمد و زمان را عامل معنی‌داری در میزان هیدرولیز گزارش کردند (۲۹) همچنین Noman و همکاران (۲۰۱۸) در بررسی هیدرولیز پروتئین ماهی خاویاری چینی

ضایعات حاصل از آبی‌پروری، تبعات زیست محیطی بدنبال خواهد داشت. فرآیند هیدرولیزاسیون توسط آنزیم‌های تجاری می‌تواند باعث حذف این ضایعات و تبدیل آنها به موادی با ارزش شود.

آنزیم در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۷۲ دقیقه با مقدار  $45/25 \pm 0/44$  درصد بدست آمد. بیشترین درجه هیدرولیز در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۹۶ دقیقه و غلظت ۱۰ درصد آنزیم،  $27/36 \pm 0/90$  درصد اندازه‌گیری شد. در آینده با افزایش تولید ماهیان پرورشی، موضوع افزایش

## • References

- Chalamaiah M, Dinesh kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem* 2012; 135: 3020–3038.
- Quaglia GB, Orban E. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (*Sardina pilchardus*). *J Sci Food Agric* 1987; 5: 38:271.
- Chalamaiah M, Rao GN, Rao DG, Jyothirmayi T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties, *Food Chem* 2010; 120 (3): 652–657.
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Bhaskarachary K, Vajreswari A, Hemalatha R, Kumar BD. Chemical composition molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo rohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Res Int* 2013; 52(1): 221–229.
- Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresour Technol* 2008; 99(2): 335–343.
- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Kumar BD. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *J Food Sci Technol* 2015; 52 (9): 5817–5825.
- Diniz FM, Martin AM. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Int J Food Sci Nutr* 1997; 48 (3):191–200.
- Vieira GH, Martin AM, Saker-Sampaiao S, Omar S, Goncalves RC. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes. *J Sci Food Agric* 1995; 69(1): 61–65.
- dos Santos SD, Martins VG, Salas-Mellado M, Prentice C. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food Biop Technol* 2011; 4 (8):1399–1406.
- Siddik MAB, Howieson J, Fotedar R, Partridge GJ. Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. *Review in Aquaculture* 2020; doi: 10.1111/raq.12481.
- Mehregan Nikoo AR, Sadeghi Mahoonak AR, Ghorbani M, Taheri A, Alami M. Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by response surface methodology. *J Food Proce Maint* 2013; 5: 95-110 [in Persian].
- Rafatinia A, Roomiani L. The effect of enzyme, time and temperature on some properties of hydrolyzed protein and herbivore visceral carp. *J Res Innov Food Sci Technol* 2018; 7: 280-269.
- Noman A, Xu Y, Al-Bukhati Q, Abedm SM, Ali AH, Ramadhan AH, Xia W. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on the degree of hydrolysis and functional properties of protein hydrolysate obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) by using papain enzyme. *Proc Biochem* 2018; 67: 19-28.
- Sandoval-Gallardo J, Osuna-Ruiz I, Martinez-Mantano E, Hernandez C, Hurtado-Oliva M, Valdez-Ortiz, H. et al. Influence of enzymatic hydrolysis conditions on biochemical and antioxidant properties of pacific thread herring (*Ophistonema libertate*) hydrolysates. *J Food* 2020; 18:1-10.
- Zhang Y, Dong Y, Dai, Z. Antioxidant and cryoprotective effects of bone hydrolysates from bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in freeze-thawed fish fillets. *Foods* 2021; 10(6): doi: org/10.3390/foods10061409.
- Rabiei S, Rezaei M, Nikoo, M. Antioxidant properties of Klunzingers mullet (*Liza klunzingeri*) protein hydrolysates preprade with enzymatic hydrolysis using a commercial protease and microbial hydrolysis with *Bacillus licheniformis*. *Food Sci and Technol In* 2021; doi.org/10.1177/10820132211005297.
- Fang X, Xie N, Chen X, Yu H, Chen J. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food Bioprod Proc* 2012; 90: 676-682.
- Pasdar N, Motamedzadegan A, safari R. The effect of hydrolysis conditions on molecular size and grade protein hydrolysate of Yellowfin tuna (*Thunus albacara*) head with Alcalase. *J Food Sci Technol Innov* 2012; 5(1): 55-62 [in Persian].
- Oveisipour M, Abedian Kenari AM, Motamedzadegan A, Nazari RM. Investigation of the properties of hydrolyzed proteins of fin yellow tuna fish using commercial enzymes. *Iran J Food Sci Technol Res* 2010; 6 (1): 76-68[in Persian].
- Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W, Liu J. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chem* 2008; 106: 444-450
- Wisuthiphaet N, Kongruang S. Production of Fish Protein Hydrolysates by Acid and Enzymatic Hydrolysis. *J Med Bioeng* 2015; 4: 466-470.

22. Rajapakse N, Mendis E, Byun HG, Kim SK. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 562-569.
23. Taheri A, Farvin KS, Jacobsen C, Baron CP. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chem* 2014; 142: 318-326
24. Wang B, Li ZR, Chi CF, Zhang QH, Luo HY. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. *Peptides* 2012; 36(2): 240-250.
25. Guerard F, Sumaya-Martinez MT, Laroque D, Chabeaud A, Dufosse L. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry* 2007; 42: 1486-1491.
26. Edwin F, Jagannadham MV. Single disulfide bond reduced papain exists in a compact intermediate state. *BBA* 2016; 1479: 68-82.
27. Abdulazeez SS, Ramamoorthy B, Ponnusamy P. Proximate analysis and production of protein hydrolysate from king fish of Arabian Gulf coast - Saudi Arabia. *Int J Pharm Bio Sci* 2013; 3: 138-144.
28. Shahidi F, Hosseninejad M. Enzymes in food processing. Ferdowsi university of Mashhad publication. 2016. 373p.
29. Soleimani MR, Hosseini SF, Nikkha M. Evaluation of antioxidant activity of hydrolyzed protein of common Kilka fish (*Clupeonella cultriventris caspia*). *J Fish Sci Technol* 2016; 5: 95-108[in Persian].
30. Motamedzadegan A, Shahidi F, Mortazavi SA, Pourazarang H, Hamzeh SH, Shahidi Yasaghi SA, Ghorbani Hasansaraei A, Khanipour E. Effect of kilka fish myofibrillar protein hydrolysis by papain on peptide chain length and degree of hydrolysis. *J Agric Sci Nat Res* 2009; 16(3): 172-181
31. Khajavi S, Zakipour Rahimabadi A, Ghaffari Moghadam M, Shahraki AH, Mir L, Zandkarimi M. Effect of hydrolysis conditions on antioxidant activity of protein protein in shizutrax fish wastes (*Schizothorax zarudnyi*). *Fish J Natur Res Iran* 2016; 69: 358-351[in Persian].
32. Damrongsakkul S, Ratanathammapana K, Komolpis K, Tanthapanichakoon W. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *J Ind Eng Chem* 2008; 14: 202-206,
33. Javadian SR, Roshan A, Oveisipour MR, Keshavarz M, Nemati M. Optimization of production of conventional Kilka hydrolyzed protein (*Clupeonella cultiventris*) using promody enzyme. *J Mar Biol* 2015; 26: 90-82[in Persian].

## Effects of Condition Enzymatic Hydrolysis on Degrees of Hydrolysis and Antioxidant Activity of Head Protein of Bighead (*Aristichthys nobilis*)

Lorzani A<sup>1</sup>, Roomiani L<sup>2\*</sup>

1- Department of Food Science and Technology, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran

2 - \*Corresponding author: Departments of Fisheries, Ahvaz Branch, Islamic Azad University, Ahvaz, Iran  
Email: l.roomiani@yahoo.com

Received 7 Jun, 2021

Accepted 26 Sept, 2021

**Background and Objectives:** Enzymatic hydrolysis is an effective practical technology that recovers valuable proteins from far-less farmed fish without losing their nutritional characteristics. Enzymatic hydrolysis of protein sources such as aquatic animals is a type of protein recycling. In the present study, effects of temperature, time and concentration of papain enzyme on hydrolysis degree and antioxidant activity of the hydrolyzed protein of carp (*Aristichthys nobilis*) have been investigated.

**Materials & Methods:** Hydrolyzed protein of bighead carp heads was prepared using papain enzyme (1:100) for 4 h. Variables to achieve the best hydrolysis conditions included temperatures of 35, 37, 39 and 42 °C, hydrolysis times of 30, 48, 72 and 96 min and enzyme concentrations of 2, 4, 5 and 10%.

**Results:** Results of this study showed that hydrolyzed protein at 42 °C, 5% enzyme concentration and 72 min included the highest antioxidant activity (0.44% ±45.25). The highest hydrolysis degree reported at 42 °C, 96 min and 10% enzyme concentration was 0.90% ±27.36.

**Conclusion:** Based on the results, it can be concluded that the disposable components of bigheads, including heads, can be used as sources of natural antioxidants.

**Keywords:** Hydrolyzed protein, Papain enzyme, Antioxidant activity, Hydrolysis degree