شیلات، مجله منابع طبیعی ایران

دوره ۶۹، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۵

صفحات ۳۵۸-۳۵۱

اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات پروتئین ضایعات ماهی شیزوتراکس (*Schizothorax zarudnyi*)

سعید خواجوی[۱] اسحق زکی‌پور رحیم‌آبادی*[۲] منصور غفاری مقدم[۳] هادی شهرکی[۱] لیلا میر[۴] مجید زند کریمی[۵]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه زابل، ایران

۲. دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه زابل، ایران ایران؛ دانشیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی دانشگاه گیلان، ایران

۳. دانشیار گروه شیمی، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زابل، ایران

۴. کارشناس آزمایشگاه، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، ایران

۵. استادیار دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زابل، زابل، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۷/۱۸ تاریخ تصویب:۱۳۹۴/۱۰/۲۵

چکیده

اکسیداسیون نقش مهمی در بیماری ها و کاهش کیفیت روغن و چربی مواد غذایی در طی فرآوری و نگهداری ایفا می‌کند. در صنایع فرآوری ماهی ضایعاتی شامل پوست، سر، امعاء و احشاء، جگر و غیره تولید می‌گردد. این ضایعات، حاوی مقادیر خوبی از مواد غنی پروتئینی هستند که معمولا برای استفاده های کم ارزش از قبیل آرد ماهی، کود و غذای دام فرآوری می شوند. در تحقیق حاضر اثر شرایط مختلف هیدرولیز پروتئین بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی شیزوتراکس بررسی گردیده است. از آنزیم پپسین برای هیدرولیز پروتئین و از میزان مهار رادیکال آزاد DPPH برای سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید. متغیرهای شرایط هیدرولیز شامل غلظت آنزیم (۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۱۰ درصد)، غلظت سوبسترا (۳، ۴، ۵، ۶ و ۷ گرم)، دمای واکنش (۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی گراد) و زمان واکنش (۶، ۲۴، ۳۰، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت) به کار گرفته شد. شرایط بهینه بدست آمده شامل غلظت آنزیم ۵٪ ، مقدار سوبسترای ۵ گرم، دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و زمان واکنش ۷۲ ساعت بود که منجر به مهار ۵۰/۰۶ ٪ رادیکال DPPH گردید.

واژگان کلیدی: شیزوتوراکس، ضایعات ماهی، هیدرولایزات پروتئین ماهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بهینه سازی، محصولات با ارزش افزوده.

* نویسنده مسئول: تلفن: ۹۸۹۱۱۲۳۷۸۴۷۹ + ایمیل: e_zakipour@yahoo.com

۱. مقدمه

اکسیداسیون چربی و روغن در طی فرآوری و نگهداری محصولات غذایی، کیفیت چربی و ارزش تغذیه ای آن را کاهش می‌دهد، بطوریکه مصرف این محصولات می تواند باعث افزایش بیماری‌های گوناگون شود (Sarmadi and Ismail, 2010). همچنین اکسیداسیون چربی‌ها باعث تأثیرات منفی بر پذیرش ماده غذایی توسط مصرف کننده می‌گردد (Thiansilakul *et al*., 2007; Sarmadi and Ismail, 2010; Zakipour Rahimabadi, 2010). مقدار بیش از حد رادیکال‌های فعال می‌تواند منجر به خسارات سلولی و آغاز بیماری های گوناگون شامل تصلب شریان، ورم مفاصل (آرتریت)، دیابت و سرطان گردد. در شرایط عادی، سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی می‌تواند گونه های فعال مانند گونه های اکسیژن فعال را حذف کند. اما در برخی شرایط، این سیستم نمی‌تواند بدن را در مقابل رادیکال‌های فعال حفظ کند. در این موارد آنتی‌اکسیدان‌ها برای پیشگیری و جلوگیری از استرس های اکسیداتیو و آثار زیان‌آور آن مفید می‌باشند (Sarmadi and Ismail, 2010; Chalamaiah *et al*. 2012). در حال حاضر از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی استفاده می‌شود که به طور بالقوه برای سلامت انسان مضر هستند (Zhong *et al*., 2011)، لذا امروزه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها با منشاء طبیعی مورد توجه قرار گرفته است (Sarmadi and Ismail, 2010; Chalamaiah *et al*. 2012). یکی از منابع برای استخراج آنتی‌اکسیدان طبیعی مواد غذایی هستند (Sarmadi and Ismail, 2010). در حال حاضر مقدار بسیار زیادی از مواد جانبی صنایع عمل‌آوری آبزیان بدون هیچ تلاشی برای استفاده از آنها دور ریخته می‌شوند ولی بسیاری از تولیدکنندگان فرآورده‌های دریایی به دلایل زیست‌محیطی قادر به دور ریختن ضایعات خود به صورت مستقیم به دریا نمی‌باشند و برای پالایش این مواد باید هزینه زیادی را متحمل شوند. بنابراین یافتن یک روش مناسب به عنوان جایگزینی برای دور ریختن این مواد، امری ضروری است (Taghiof *et al*., 2010). یکی از روش‌های مناسب که علاوه بر برطرف کردن مشکلات زیست‌محیطی، یک محصول با ارزش اقتصادی تولید می‌کند، هیدرولیز آنزیمی پروتئین این ضایعات می‌باشد (Taghiof *et al*., 2010; Slizyte *et al*., 2005). پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی دارای خواص و کاربردهایی چون سهولت جذب روده‌ای پپتیدها (Taghiof *et al*., 2010)، افزودنی جهت خوراک دام و منبع نیتروژن در محیط کشت باکتری (Ovisipour *et al*., 2012; Taghiof *et al*., 2010)، خواص درمانی سرطان (Ovisipour *et al*., 2012)، تقویت کننده طعم در شیرینی جات، بعنوان تثبیت کننده در نوشیدنی‌ها، جایگزین شیر در جیره غذایی گوساله‌ها، بهبود دهنده‌ی اتصال به آب در فراورده های گوشتی و کاهش خروج خونابه در گوشت خام یا پخته (Motamedzadegan *et al*., 2009) می‌باشد. از دیگر خواص مهم پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن است (Chalamaiah *et al*., 2012). اخیرا، تعدادی از پپتیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی یافت شده‌اند که توسط هیدرولیز آنزیمی از مواد غذایی مختلف چون آب پنیر و سویا بدست آمده و بر کنترل اکسیداسیون چربی در غذاهای گوشتی مختلف از جمله گوشت گاو، گوشت خوک و ماهی تن تاثیرگذار بوده‌اند (Zhong *et al*., 2011). بازیافت پروتئین‌ها از ضایعات به روش هیدرولیز آنزیمی می‌تواند از میزان ضایعات بکاهد و ارزش افزوده قابل توجهی ایجاد نماید. هیدرولیز آنزیمی فرآیندی ساده، موثر و کارآمد است که مانع از تخریب پروتئین ها در اثر واکنش‌هایی مشابه با آنچه که در واکنش‌های شیمیایی نامطلوب اتفاق می‌افتد، می‌شود (Motamedzadegan *et al*., 2009). در هیدرولیز پروتئین شرایطی از قبیل pH، دما، زمان هیدرولیز و فعالیت آنزیمی (Taheri *et al*., 2012; Shahidi and Hoseyni Nejad, 2006) و غلظت سوبسترا (Shahidi and Hoseyni Nejad, 2006) بر عملکرد آنزیم موثر است. امروزه برای بهینه‌کردن این شرایط تحقیقات زیادی در ماهیان مختلف صورت پذیرفته است که می‌توان به بهینه سازی فعالیت حذف رادیکال آزاد در هیدرولیز ضایعات فرآوری میگو (Guerard *et al*., 2007)، بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز (نسبت آنزیم به سوبسترا، زمان و دما) و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئینهای سارکوپلاسمی کپور

علفخوار (Ren *et al.*, 2008) و بهینه سازی تولید هیدرولایزات آنتی‌اکسیدان (نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان) از پروتئین عضله اسکوئید (Fang etal., 2012) اشاره کرد. یکی از روش‌های بهینه سازی فرایند هیدرولیز، روش "یک متغییر در هر زمان"[۱]، است که در این تحقیق جهت بهینه‌سازی فرآیند هیدرولیز ضایعات ماهی شیزوتوراکس مورد استفاده قرار گرفته است. این ماهی متعلق به خانواده کپورماهیان و از ماهیان آب شیرین و بومی منطقه‌ی سیستان در جنوب شرق ایران است (Gharaei *et al.*, 2011). در حال حاضر تحقیقات متعددی بر روی این ماهی انجام گرفته است (Zakipour *et al.*, 2009; Rahdari, 2010; Arabnejad, 2012; Yavari, 2012; Dahmarde, 2012; naqibi, 2013; Khammar, 2013, Alizade sargazi, 2013; Mirani shahroudi, 2013) که زمینه ای برای تبدیل آن به یک گونه تجاری و پرورشی می‌باشد. همچنین ماهی شیزوتوراکس در این منطقه از محبوبیت بالایی برخوردار است (Zakipour Rahimabadi, 2015). اما تاکنون تحقیقی در زمینه استفاده از ضایعات این ماهی و بهینه سازی فرایند هیدرولیز ضایعات آن انجام نشده است لذا در این تحقیق فاکتورهای موثر بر هیدرولیز آنزیمی پروتئین ضایعات این ماهی، از قبیل دما، زمان، غلظت سوبسترا و غلظت آنزیم مورد بهینه سازی قرار گرفته است تا بهترین شرایط هیدرولیز جهت کسب حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشخص شود.

۲. مواد و روشها

۱.۲. مواد

۱.۱.۲. نمونه

ماهی شیزوتراکس (وزن متوسط:۷۰ گرم) از مزارع پرورشی منطقه سیستان تهیه و به فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) منتقل گردید و تا زمان انجام آزمایشات در آنجا نگه‌داری شد.

۲.۱.۲. آنزیم

آنزیم پپسین، ساخت مرک آلمان با میزان فعالیت 0.7 FIP-u/mg مورد استفاده قرار گرفت.

۳.۱.۲. مواد شیمیایی

۲،۲- دی فنیل-۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) ساخت شرکت Sigma-Aldrich، اتانول، آب مقطر، اسید کلریدریک، کلرید پتاسیم، سود با درجه آزمایشگاهی مورد استفاده قرار گرفت.

۲.۲. هیدرولیز ضایعات ماهی

ضایعات حاصل از جدا کردن بخش عمده گوشت، چرخ شده و سپس با محلول هیدروکلریک اسید (pH: 2) هموژن و آنزیم‌های داخلی با قرار گرفتن در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه، غیرفعال گردیدند. پس از سرد شدن مخلوط فوق، آنزیم پپسین به آن اضافه گردید. و عملیات هیدرولیز در دمای مورد نظر در انکوباتور شیکردار (Unimax 1010، Heidolph-Germany) انجام شد. پس از اتمام هیدرولیز عمل غیرفعال سازی آنزیم افزوده شده در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد و زمان ۱۵ دقیقه انجام شد و پس از سرد شدن، هیدرولایزات حاصل سانتریفوژ (EBA20، Hettich- Germany) گردید. از لایه فوقانی که حاوی پروتئین هیدرولیز شده است، جهت بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه برداری شد.

۳.۲. سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۰/۰۵ گرم از نمونه با ۳ میلی‌لیتر اتانول مخلوط گردید. مجموعه‌ی حاصل با ۳ میلی لیتر محلول ۲،۲- دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) ۰/۱ میلی‌مولار (اتانولی) مخلوط و همزده شد. سپس به مدت ۳۰ دقیقه، نمونه ها در تاریکی و دمای اتاق قرار داده و جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (CE1021، CECIL-UK) قرائت گردید. میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه برحسب درصد بر اساس فرمول سنجیده شد:

$$DPPH\ radical\ scavenging\ capacity\,(\%) = 1 - \frac{A_{517}\ sample}{A_{517}\ control} \times 100$$

[۱] one variable at a time

۴.۲. سنجش ترکیب ضایعات

میزان رطوبت ، چربی و خاکستر به روش AOAC (2002) و پروتئین به روش کجلدال AOAC (2005) در ضایعات ماهی اندازه گیری شد.

۵.۲. مطالعات بهینه سازی

جهت بهینه سازی عوامل موثر بر هیدرولیز، در هر مرحله آزمایش اثر هر عامل به تنهایی بر روی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. مرحله بعدی با توجه به نتیجه مرحله قبلی انجام شد.

۱.۵.۲. اثر غلظت آنزیم بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جهت بررسی اثر غلظت آنزیم بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات ضایعات ماهی مقادیر ۵ گرم ضایعات با ۱۰ میلی لیتر بافر در دمای ۳۷ درجه با مقادیر مختلف آنزیم ۱، ۲، ۳، ۴، ۵ و ۱۰٪ (w/w) مورد آزمایش قرار گرفتند.

۲.۵.۲. اثر غلظت آنزیم بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جهت مطالعه اثر غظت سوبسترا بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات ضایعات ماهی، مقادیر ۵٪ آنزیم (w/w)، ۱۰ میلی‌لیتر بافر، در دمای ۳۷ درجه با مقادیر مختلف ضایعات ۳، ۴، ۵، ۶ و۷ گرم مورد آزمایش هیدرولیز قرار گرفتند.

۳.۵.۲. اثر دما بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جهت بررسی اثر دما بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقادیر ۵٪ انزیم (w/w)، ۵ گرم ضایعات و ۱۰ میلی لیتر بافر در دماهای مختلف ۳۵، ۳۷، ۳۹ و ۴۲ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش قرار گرفتند.

۴.۵.۲. اثر زمان بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

جهت بررسی اثر زمان بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات ضایعات ماهی، مقادیر ۵ گرم ضایعات، ۱۰ میلی‌لیتر بافر و ۵٪ آنزیم (w/w) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد آزمایش هیدرولیز قرار گرفتند و در زمان های مختلف ۶، ۲۴، ۳۰، ۴۸، ۷۲ و ۹۶ ساعت فعالیت آنتی‌اکسیدانی مورد سنجش قرار گرفت.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

برای بررسی معنی دار بودن تفاوت بین میانگین ها از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) و آزمون دانکن و توکی در سطح ۵ درصد استفاده شد. برای تحلیل آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۱۶ و برای رسم شکل ها از نرم افزار Excel استفاده شد.

۳. نتایج

۱.۳. ترکیبات ضایعات ماهی شیزوتوراکس

مواد عمده تشکیل دهنده ضایعات ماهی در جدول ۱ ارائه شده است.

۲.۳. اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۱.۲.۳. اثر غلظت آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

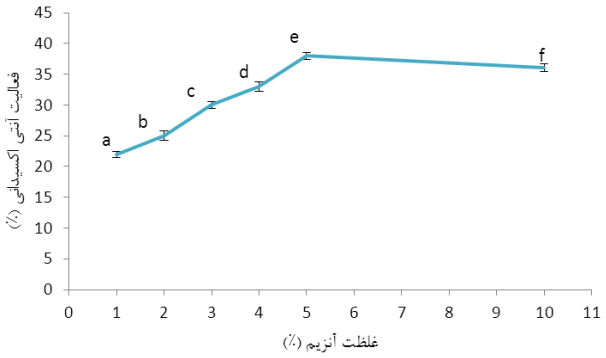
شکل ۱ اثر غلظت آنزیم را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقدار سوبسترای ۵ گرم، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۳ ساعت، نشان می‌دهد. بر اساس شکل ۱ با افزایش غلظت آنزیم از ۱ تا ۵ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی افزایش می‌یابد سپس با افزایش آن تا ۱۰ درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش می‌یابد.

۲.۲.۳. اثر غلظت سوبسترا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

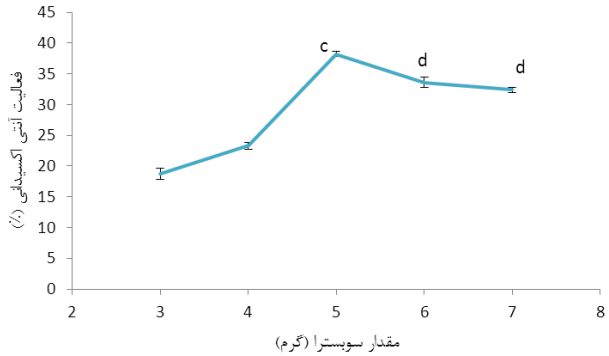
اثر تغییرات مقدار سوبسترا بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطح ثابت غلظت آنزیم ۵ درصد، دمای واکنش ۳۷ درجه سانتی‌گراد و زمان ۱۳ ساعت در شکل ۲ نشان داده شده است. در مقدار ۵ گرم سوبسترا، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید. با کاهش یا افزایش غلظت سوبسترا از این مقدار، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش پیدا کرد. بر اساس شکل ۲ شیب تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی بین سطوح ۴ تا ۵ و ۵ تا ۶ گرم بیشتر از شیب تغییرات بین سطوح ۳ تا ۴ گرم و ۶ تا ۷ گرم است. همچنین شدت تغییرات در فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سطوح بیش از ۵ گرم، کمتر از سطوح کمتر از ۵ گرم است.

جدول ۱ : ترکیبات ضایعات ماهی شیزوتوراکس (بر اساس وزن تر)

آب (٪)	پروتئین (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)
۶۹/۰۸	۱۶/۷۲	۱۳/۶۴	۱/۹۱۳

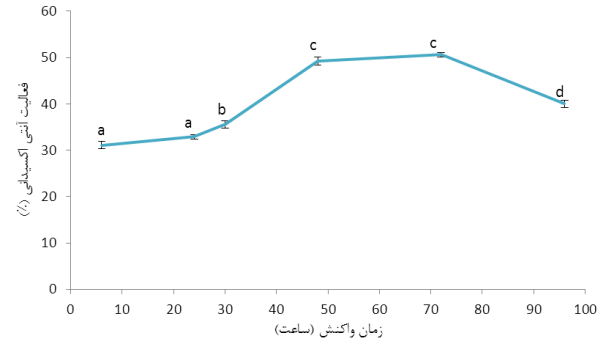


شکل ۱: اثر غلظت آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی



شکل ۲: اثر مقدار سوبسترا بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

شکل ۳: اثر دمای پروتئولیز (°C) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی



شکل ۴: اثر زمان پروتئولیز (ساعت) بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳.۲.۳. اثر دما بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

شکل ۳ اثر تغییرات دمای واکنش را در سطوح ثابت مقدار آنزیم ۵ درصد، سوبسترای ۵ گرم و زمان واکنش ۱۳ ساعت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. بر طبق این شکل در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده گردید. با افزایش دما از ۳۵ تا ۳۷ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش و با افزایش دما از ۳۷ درجه سانتی‌گراد تا ۴۲ درجه سانتی‌گراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. در این شکل نیز مانند شکل قبلی شدت تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی در حول نقطه‌ی بهینه بیشتر است.

۴.۲.۳. اثر زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی

شکل ۴ اثر زمان واکنش را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. در این شکل مقدار آنزیم، سوبسترا و دمای واکنش به ترتیب در سطوح ۵ درصد، ۵ گرم و ۳۷ درجه ثابت نگه‌داشته شدند. طبق این شکل بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بعد از ۷۲ ساعت هیدرولیز اندازه گیری شد و در زمان های قبل و بعد آن میزان کمتری فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشاهده می‌گردد.

۴. بحث و نتیجه گیری

میزان مواد عمده تشکیل دهنده ضایعات ماهی که در این تحقیق بدست آمده است با مقادیر بدست آمده از عضله این ماهی که توسط زکی پور و همکاران در سال ۱۳۸۸ گزارش شده است متفاوت است (Zakipour Rahimabadi *et al*., 2009). از تفاوتها می‌توان به آب کمتر و چربی بیشتر در ضایعات نسبت به عضله در این ماهی اشاره کرد که با قاعده جانشینی آب و چربی با یکدیگر، سازگار است. همچنین این مقایسه نشان می‌دهد پروتئین ضایعات ماهی شیزوتوراکس از لحاظ کمی با پروتئین گوشت این ماهی قابل رقابت می‌باشد. در این بررسی مشاهده شد که با افزایش هر یک از عوامل، در فعالیت آنتی‌اکسیدانی به ترتیب روند افزایش و کاهش اتفاق می‌افتد. این مشاهده به این معناست که هر عاملی در سطح خاصی بهترین تاثیر را دارد و در سطوح کمتر یا بیشتر تاثیر مناسبی ندارد که این امر با نتایج دیگران (Fang *et al*., 2012 & Guerard *et al*., 2007) سازگار است.

در هیدرولیز اسکوئید با افزایش دما از ۴۵ تا ۵۱ درجه سانتی گراد فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش نشان می دهد در حالی که در محدوده ۵۱ تا ۵۵ درجه سانتی گراد کاهش می یابد. همچنین با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ تا ۵۱ دقیقه فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت و در محدوده زمانی۵۱ تا ۶۰ دقیقه کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی گزارش گردیده است (Fang *et al*., 2012).

همچنین در بهینه‌سازی خاصیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز ضایعات میگو، حداکثر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را در دمای ۶۸/۴ درجه سانتی گراد مشاهده شد در حالی که در دماهای کمتر از آن فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاهش نشان داد همچنین براساس نمودارهای سطح پاسخ بدست آمده، در دماهای بالاتر نیز خاصیت آنتی‌اکسیدانی کاهش پیدا کرد (Guerard *et al*., 2007).

با توجه به نتایج تحقیق حاضر هیدرولیز ۵ گرم از ضایعات ماهی شیزوتراکس در ۱۰ میلی لیتر بافر هیدروکلریک اسید (pH: 2) با غلظت آنزیم پپسین ۵٪ در دمای ۳۷ درجه ی سانتی‌گراد با زمان واکنش ۷۲ ساعت منجر به بروز بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (۵۰/۰۶ درصد) در میان تیمارهای مورد آزمایش می‌گردد.

به طور کلی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای موجود در هیدرولایزات به عواملی از قبیل وزن مولکولی، توالی اسیدهای آمینه (Sarmadi and Ismail, 2010). و درجه هیدورلیز بستگی دارد (You *et al*., 2009; Sarmadi and Ismail, 2010). جهت بروز بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی، درجه هیدرولیز باید در حد خاصی باشد (You *et al*., 2009) و کمتر یا بیشتر بودن نسبت به آن حد باعث کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌گردد. هر عاملی که باعث افزایش درجه هیدرولیز یعنی هیدرولیز بیشتر و کوچکتر شدن پپتیدها گردد، تا قبل از رسیدن درجه هیدرولیز به حد خاص عاملی مفید و بعد از رسیدن درجه هیدرولیز به آن حد عاملی مضر خواهد بود. لذا تمام عوامل موثر بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی را می‌توان از

رهگذر اثر آن بر درجه هیدرولیز مورد بررسی قرار داد.

در چنین تحلیلی تاثیر چهار عامل مورد بررسی در این تحقیق بر درجه‌ی هیدرولیز به شرح زیر است، افزایش سرعت هیدرولیز در یک زمان ثابت و همچنین افزایش زمان هیدرولیز در سرعت ثابت باعث افزایش درجه هیدرولیز می‌گردد. عوامل دما، غلظت آنزیم و غلظت سوبسترا است که مشخص می‌کند در چه زمانی به درجه هیدرولیز خاص برای بروز حداکثر خاصیت آنتی‌اکسیدانی دست پیدا کنیم. از آن جا که در تمام آزمایشات به جز آزمایش مربوط به بررسی تاثیر زمان، زمان اندازه گیری برای تمام تیمارهای هر مرحله یکسان بوده است پس عواملی که بر سرعت هیدرولیز تاثیرگذار هستند می‌توانند تعیین کنند که در زمان سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیدرولایزات حاصل دارای چه مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی باشد. لذا در میان تیمارهای یک مرحله آن تیماری به عنوان تیمار بیشینه کننده ی فعالیت آنتی‌اکسیدانی انتخاب می‌شود که منجر به درجه هیدرولیز مطلوب‌تری شده باشد. افزایش دما به طورکلی باعث افزایش سرعت واکنش‌های آنزیمی می‌گردد ولی در عین حال با تأثیر بر روی ساختار پروتئینی آنزیم‌ها باعث کاهش سرعت واکنش می‌شود (Shahidi and Hoseyni nejad, 2006; Elhami Rad and Yavarmanesh, 2006)؛ لذا در دمای خاصی بیشترین سرعت بروز می‌کند. در تحقیق حاضر دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد سرعتی را ایجاد کرده است که در زمان سنجش، بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی بروز کند از مطالب فوق می‌توان استنباط کرد که اگر مدت زمان انجام واکنش تغییر کند، احتمالا بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمایی غیر از ۳۷ درجه سانتی‌گراد بروز خواهد کرد. همچنین معتمدزادگان و همکاران نشان دادند که افزایش دما روی اندازه پپتیدهای بدست آمده موثر نیست (Motamedzadegan *et al*., 2009). افزایش غلظت آنزیم و سوبسترا نیز منجر به افزایش سرعت هیدرولیز می‌گردد. اما معمولا این اثر مثبت کاهش یافته و فقط تا سطح خاصی ادامه دارد. با افزایش میزان سوبسترا در ابتدا سرعت واکنش افزایش پیدا می‌کند سپس با افزایش بیشتر، آنزیم اشباع شده و فعالیت آن به سمت حداکثر پیش می‌رود و سرعت واکنش آنزیمی کاهش پیدا می‌کند تا این که به یک سرعت ثابت برسد. همینطور با افزایش میزان آنزیم نیز سرعت واکنش افزایش پیدا می‌کند اما شتاب افزایش سرعت در واکنش های مختلف متفاوت است. در برخی روند افزایش سرعت کاهشی و در برخی افزایشی و در برخی دیگر به صورت خطی است. (Shahidi and Hoseyni nejad, 2006; Elhami Rad and Yavarmanesh, 2006).

۵. تقدیر و تشکر

بدینوسیله از همکاری خانم دهمرده کارشناس آزمایشگاه تجزیه دستگاهی دانشگاه علوم پزشکی زابل و همچنین خانم مهندس نوری جنگی کارشناس اداره شیلات زابل که در مسیر انجام این پژوهش با ما همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

Alizadeh Sargazi, A., 2013. Effect of diluent solutions on the fertilization of Snow trout (*Schizothorax zarudnyi*). M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 68p.

AOAC., 2002. Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

AOAC., 2005. Official Methods of Analysis Chemists (17th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

Arabnejad, S. 2012. Investigation on reproduction induce hormones performance on quantity and quality of *Schizothorax zarudnyi* Sperm. M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 75p.

Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chemistry* 135, 3020-3038.

Dahmardeh, H., 2013. Effect of various levels of dietary carbohydrate on growth and survival rate of Snow trout juveniles (*Schizothorax zarudnyi*). M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 71p.

Elhami rad, A., Yavarmanesh, M., 2006. Principles of reactions kinetics in foods. University of azad. 256p.

Fang, X., Xie, N., Chen, X., Yu, H. and Chen, j., 2012. Optimization of antioxidant ydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing* 90, 676-682.

Gharaei, A., Rahdari, A., Ghaffari M., 2011. Induced spawning of *Schizothorax zarudnyi*

(Cyprinidae) by using synthetic hormones (Ovaprim and HCG). *World Journal of Fish and Marine Sciences* 3(6), 518-522.

Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A., Dufosse´, L., 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry* 42, 1486-1491.

Khammar, R. A., 2013. Effect of various levels of dietary protein on growth performance and body composition of Snow trout juveniles (*Schizothorax zarudnyi*). M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 59p.

Mirani Shahroodi, E. 2013. Comparison of early larval growth and survival rate of the Snow trout (S.) feeding by rotifer de-capsulated artemia cyst and artificial food. M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 72p.

Modanlow, M,. Rafiee, G., Motamedzadegan, A., Moeeni, S., Mirvaghefi, A., Ovissipour, M., 2011. Effect of different ratio of trypsin enzyme, times and temperatures on protein recovery of viscera yellow fin tuna (*Thunus albacores*). *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 7(2), 137-144.

Motamedzadegan, A., Shahidi, F., Mortazavi S.A., Pourazarang, H., Hamzeh, SH., Shahidi Yasaghi S.A., Ghorbani Hasansaraei A., Khanipour E., 2009. Effect of kilka fish myofibrillar protein hydrolysis by papain on peptide chain length and degree of hydrolysis. *Journal of Agricultural Science and Natural Resources* 16(3), 172-181.

Naghibi, M., 2013. Effect of copper and lead on sperm motility parameters of *Schizothorax zarudnyi*. M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 69p.

Oveissipour, M., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Nazari, M., 2012. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). *Food Bioprocess Technology* 5, 696-705.

Rahdari, A., 2011. Investigation on artificial breeding of the Sistan snow trout (*Schizothorax zarudnyi*) using synthetic hormones. M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 65p.

Ren, J.Y., Zhao, M.M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y.M., Cui, C., Kakuda, Y., and Xue, S.J., 2008. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. *Food Science and Technology* 41(9), 1624-1632.

Sarmadi, B., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 31, 1949-1956.

Shahidi, F. Hosseninejad, M. 2006. Enzymes in food processing. Ferdowsi university of mashhad publication. 373p.

Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storrø, L., Rustad, T., 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry* 40, 1415-1424.

Taghiof, M., Ghomi, M., Ovissipor, M., 2010. Production of hydrolyzed protein from viscera of beluga *Huso hoso* by Alcalase enzyme. *Journal of Fisheries* 4(1).

Taheri, A., Abedian Kenari., A., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaie., M., 2012. Process optimization of Poultry By-products hydrolysate production by RSM. *Journal of Food Science & Technology* 9(34).

Yavari, A., 2012. LC50 96h determination of diazinon and its histopatological and behavioral effects in Snow trout (*Schizothorax zarudnyi*) juvenile. M.Sc thesis. Fisheries group. University of Zabol. Zabol. Iran. 65p.

Zakipour Rahimabadi, E., Arshadi, A., Zare, P., Heydari, M., 2009. The comparative study of muscle chemical composition of *Schizothorax zarudnyi* and *Schizocypris altidorsalis* in different seasons and sex. *Journal of Fisheries* 3(3).

Zakipour Rahimabadi, E., 2010. Fish Lipid. The Academic Center for Education, Culture and Research press. 120p.

Zakipour Rahimabadi, E., 2015. Comparison of fatty acid profile in muscle and liver of male and female of *Schizothorax zarudnyi*. Journal of Fisheries, *Iranian journal of Natural Resources* 67(4).