نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۱، ص. ۲۷۰-۲۶۲

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 3, Fall 2012, p. 262-270

بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) با استفاده از روش سطح پاسخ

علی طاهری [۱]-عبدالمحمد عابدیان کناری [۲*]-علی معتمدزادگان [۳]- مهران حبیبی رضایی [۴]

تاریخ دریافت: ۸۸/۱۰/۱۵
تاریخ پذیرش:۹۱/۴/۲۵

چکیده

در این تحقیق پروتئین آبکافت از ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) با استفاده از آنزیم پاپائین تولید گردید و شرایط آبکافت (زمان, دما و فعالیت آنزیم) جهت حصول به خاصیت آنتی اکسیدانی مطلوب با استفاده از روش سطح پاسخ بهینه سازی شد. ضریب تعیین کلی، ضریب تعیین اصلاح شده و ضریب دقت محاسبه شده توانایی تخمین مدل را نشان داد. شرایط بهینه این آزمایش عبارت بود از غلظت آنزیم ۲٪ , زمان۳۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد که در نتیجه بر اساس چنین شرایطی میزان حذف رادیکال آزاد DPPH برابر ۶۴/۵ درصد بدست آمد. بر اساس نتایج آنالیز اسید آمینه و شاخص شیمیایی متیونین و ایزولوسین اسیدهای آمینه محدود کننده بودند اما دیگر اسیدهای آمینه به میزان لازم وجود داشتند. در نتیجه گیری نهایی می‌توان گفت که مدل حاصل از شرایط خوبی جهت پیش بینی برخوردار است و پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی دارای خواص آنتی اکسیدانی مطلوبی در سطح بهینه می‌باشد و می‌توان از این فرآورده شیلاتی جهت استفاده به عنوان مکمل غذایی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروتئین آبکافت, ساردین پهلو طلایی, پاپائین, متیونین, هیستیدین, آنتی اکسیدان

مقدمه

امروزه بیماری های مرتبط با رادیکال های آزاد باعث آسیب های جدی به بدن می‌شوند که می‌تواند منجر به سرطان و یا رنج گسترده ای از بیماری های دیگر گردد (Borek, 2001). همچنین اکسیداسیون اسیدهای چرب با رادیکال های آزاد منجر به تغییر کیفیت غذا می‌گردد و روی سلامت انسان تاثیر منفی دارد. بنابراین یافتن آنتی اکسیدان های طبیعی برای جایگزینی با آنتی اکسیدان های صناعی در صنایع غذایی بسیار مورد توجه است (Suetsuna *et al.*, 2004).

بسیاری از آنتی اکسیدان های سنتزی می‌توانند برای جلوگیری از فعالیت پراکسیدان ها به شیوه های مختلف به کار روند. اما مسائل سلامت و نگرانی مصرف کنندگان از مصرف محصولات سنتزی مصنوعی محدودیت هایی را برای استفاده از این مواد بوجود آورده است. امروزه علاقه زیادی برای شناسایی منابع جدید و طبیعی آنتی اکسیدان از صنایع لبنی، گیاهان و جانوران بوجود آمده که تحقیقات گسترده ای را در سال های اخیر به خود اختصاص داده است. مطالعات و بررسی های زیادی مبنی بر توانایی پروتئین ها در جلوگیری از اکسایش لیپید در غذاها موجود است. بر اساس گزارش ها پپتیدهای زیست فعالی که از منابع مختلف غذایی تهیه شده خواص ضد فشار خون (Suetsuna *et al.*, 2004)، آنتی اکسیدان، ضد سرطان (Picot *et al.*, 2006) و ضد میکروبی دارد. مطالعات اخیر گزارش هایی در استفاده از ضایعات صنایع شیلاتی برای بازیافت این ترکیبات ارزشمند را نشان می‌دهد (Slizyte *et al.*, 2009).

از سوی دیگر بسیاری از ماهیان به دلیل مشکلات تکنولوژیکی کمتر به مصرف انسانی می‌رسند و بیشتر به عنوان افزودنی غذایی مصرف شده و یا به مصرف تغذیه دام و طیور می‌رسند. در جهان میزان صید ماهیان پلاژیک ریز شامل ساردین ماهیان بالغ بر ۴ میلیون تن در سال است (Dumay *et al.*, 2006). صید سالانه

۱و ۲- دانشجوی دکتری شیلات و دانشیار گروه شیلات دانشگاه تربیت مدرس, دانشکده منابع طبیعی, نور مازندران
(*- نویسنده مسئول: (Email:aabedian@modares.ac.ir)
۳-استادیار گروه علوم و صنایع غذایی ، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری, مازندران
۴-استادیار گروه زیست شناسی آزمایشگاه بیوتکنولوژی پروتئین دانشکده علوم پایه, دانشگاه تهران

ساردین ماهیان در خلیج فارس نیز به ۲۱۴۱۹ تن در سال بالغ است که بیشتر به مصرف تهیه پودر ماهی می‌رسد (I.F.O., 2008). آبکافت آنزیمی پروتئین ها روشی مناسب برای فرآوری ماهیان کم مصرف می‌باشد و بدین دلیل در جهان تولید پروتئین آبکافت ماهی به طور گسترده در حال مطالعه است (Kristinsson & Rasco, 2000a and b; Liaset *et al*., 2000; Nilsang *et al*., 2005; Bhaskar *et al*., 2007; Taheri *et al*., 2011). افزودن آنزیم های خارجی می‌تواند روند آبکافت را قابل کنترل نماید و آنرا تکرار پذیر کند. آنزیم های میکروبی و گیاهی به دلیل تولید پروتئین آبکافت در کوتاهترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم های خنثی یا اسیدی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (Je *et al*., 2004; Rajapakse *et al*., 2005; Kim *et al*., 2001; Shahidi and Amarowick, 1996). بسته به ویژگی های آنزیم, شرایط محیطی و میزان آبکافت تنوع گسترده ای از پپتیدها تولید خواهد شد. پروتئین آبکافت حاصله بر اساس پپتیدهای جدید خواص کاربردی نوینی می‌یابد. یکی از این خواص فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید ها می‌باشد که امروزه به شکل گسترده در حال بررسی است. تنوع آنزیم های پروتئولیتیک قابل استفاده در صنایع غذایی گسترده اند و به آنزیم شناسان فرصت مناسبی برای تولید پروتئین آبکافت ماهی با کیفیت بالا فراهم می‌نماید. مطالعات گسترده ای روی بهینه سازی آبکافت آنزیمی ماهیان مختلف و احشای آنها توسط آنزیم هایی چون آلکالاز، پروتامکس و فلاوروزایم انجام شده است. در این میان استفاده از آنزیم های گیاهی در این خصوص کمتر مطرح شده و آنزیم هایی چون پاپائین می‌تواند بدین منظور مفید باشد. از سوی دیگر چندین فاکتور مانند pH، زمان، فعالیت آنزیمی و دما بر عملکرد آنزیم تاثیر می‌گذارد و امکان کنترل فرآیند را فراهم می‌نمایند (Viera *et al.,* 1995).

از آنجا که تغییر شرایط آبکافت اعم از زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا می‌تواند خواص کاربردی محصول نهایی را تغییر دهد دستیابی به بهترین شرایط واکنش برای حصول بیشترین خواص آنتی اکسیدانی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد. بهینه سازی روش های متفاوتی دارد که روش سطح پاسخ یکی از بهترین این روش ها می‌باشد.

با توجه به مطالب فوق در تحقیق حاضر به بهینه سازی تولید پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) به عنوان یک منبع پروتئینی قابل بازیافت با استفاده از آنزیم پاپائین پرداخته شده و خاصیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شده است. بهینه سازی بر اساس شرایط زمان، دما و میزان فعالیت آنزیم برای دستیابی به بالاترین خاصیت آنتی اکسیدان صورت گرفته است.

مواد و روش ها

مواد

ماهی ساردین پهلو طلایی با وزن متوسط ۷±۶۴ گرم در فصل پاییز توسط تور ترال از بندر صیادی جاسک در استان هرمزگان تهیه و در تونل انجماد فریز شد. ماهیان فریز شده تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شدند. آنزیم پاپائین از شرکت سینوفارم تهیه و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

آبکافت

ماهی ساردین پهلو طلایی در یک چرخ گوشت نیمه صنعتی (شرکت هوتخش) چرخ شد و سپس به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها برای ۲۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتی گراد گرما دهی شدند تا آنزیم های داخلی آن غیر فعال گردد و چربی گوشت آزاد شود (Taheri *et al.,* 2011). نمونه ها در دمای اتاق خنک شدند و در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد برای ۲۰ دقیقه در g ۶۰۰۰ جهت جدا کردن اضافات گوشت و چربی سانتریفوژ شد. هر نمونه حاوی نسبت ۱:۱ از ۱۰۰ گرم گوشت چرخ شده و تیمار شده دمایی با آب مقطر بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم پاپائین در دما و زمان مشخص انکوباسیون شد. پس از زمان مورد نیاز تیمار مخلوط در حمام آبی ۸۵ درجه سانتی گراد قرار گرفت و آنزیم آلکالاز غیر فعال گردید. پروتئین آبکافت ماهی توسط دستگاه فریز درایر خشک گردید و به پودر تبدیل شد و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتی گراد نگه داری شد.

حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)

جهت بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH (۱/۵ میلی لیتر، ۰/۱ میلی مولار در اتانول ۹۵٪) با نمونه مخلوط گردید (۱/۵ میلی لیتر در غلظت های متفاوت نمونه در اتانول ۵۰٪). مخلوط تکان داده شد و پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب در ۵۱۷ نانومتر سنجیده گردید. برای کنترل محلول اتانول به جای نمونه به کار رفت. بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر برای مقایسه استفاده شد (Shimada و همکاران (1992). فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول ۱ سنجیده شد:

$$DPPH\ radical\ scavenging\ capacity\ (\%) = 1 - \frac{A_{517}\ sample}{A_{517}\ control} \times 100 \quad (۱)$$

بهینه سازی

از روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه سازی شرایط آبکافت

استفاده گردید. طرح ترکیبی مرکزی[1] با ۵ سطح برای هر تیمار و ۶ تکرار حول نقطه مرکزی استفاده شد (جدول ۱). این طرح از ۸ نقطه سازگانی[2]، ۶ نقطه محوری[3] و ۶ نقطه حول نقطه مرکزی[4] تشکیل شده بود. فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد. مدل رگرسیونی چند جمله ای درجه ۲ برای پیش بینی میزان پاسخ استفاده گردید (فرمول ۲).

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^{3} \beta_i x_i + \sum_{i=1}^{3} \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} \beta_{ij} x_i x_j \quad (۲)$$

Y درجه آبکافت, β0 عدد ثابت, βi, βii وβij ضرایب تخمینی مدل , xi, xj سطوح متفاوت متغیرهای وابسته است. این مدل تاثیرات خطی, درجه دوم و متقابل متغیرها را بر روی میزان پاسخ نشان می‌دهد و تاثیر هر متغیر وابسته را بر روی پاسخ تخمین می‌زند. جهت انجام آنالیزها از نرم افزار Graphpad-Prism 7 استفاده شد. در نهایت ۳ آزمایش اضافی برای تعیین صحت محاسبات ریاضی انجام شد.

ترکیب اسید آمینه

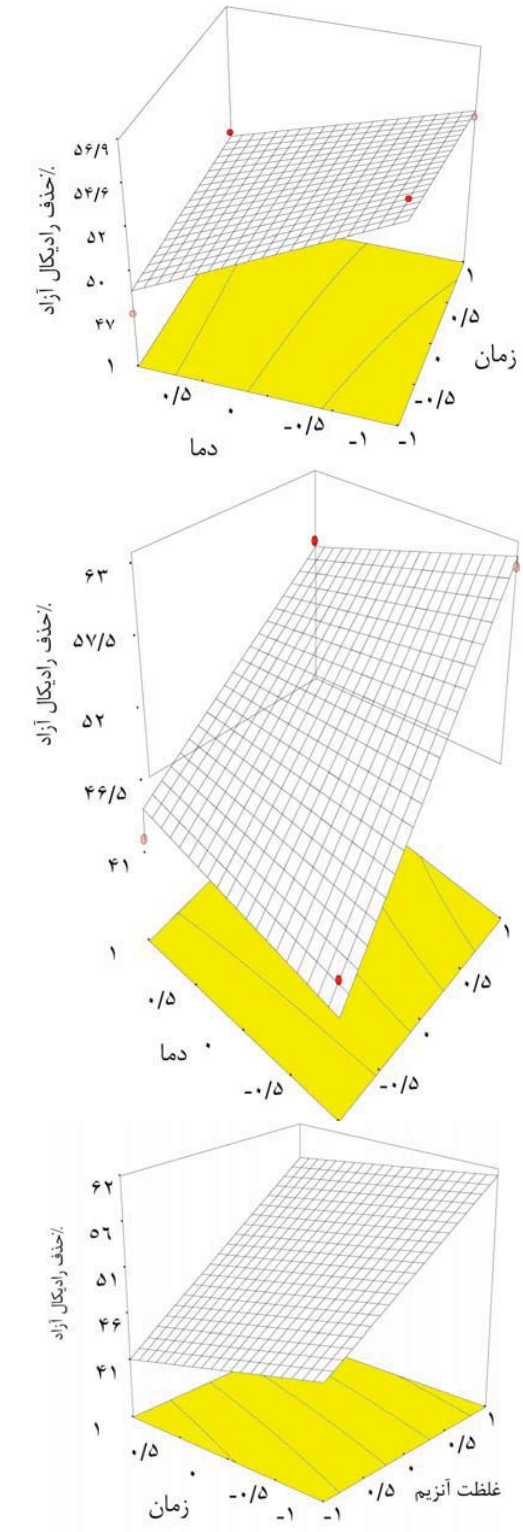
نمونه ها برای آنالیز محتوای اسید آمینه در اسید کلریدریک ۶ مولار و دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد برای ۲۲ ساعت آبکافت شد. از کرماتوگرافی مایع فاز بالا مدل کنوئر آلمان استفاده شد و از ستون و دتکتور فلوئورسنس استفاده گردید (Flynn, 1988; Lindroth and Mopper, 1979). شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده بر اساس نسبت اسیدهای آمینه ضروری نمونه به اسید های آمینه ضروری استاندارد بر اساس فرمول ۳ سنجیده شد (FAO/WHO, 1985; NRC, 1993; Cheison *et al.,* 2007).

$$\text{شاخص شیمیایی} = \frac{\text{اسید آمینه ضروری نمونه}}{\text{اسید آمینه ضروری استاندارد}} \quad (۳)$$

نتایج و بحث

تاثیر فاکتورهای مختلف روی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت

در شکل شماره ۱ تاثیر زمان و دما روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی وقتی که غلظت آنزیم در ۱/۵ درصد ثابت است مشاهده می‌گردد. این شکل نشان می‌دهد که با افزایش دما و زمان از قدرت حذف رادیکال آزاد پپتیدهای حاصله کاسته می‌شود به شکلی که بیشترین میزان حذف با پپتیدهای حاصله در دمای حدود ۴۵ درجه سانتی گراد و ۳۰ دقیقه آبکافت بدست می‌آید.



شکل۱- اثر زمان، دما و غلظت آنزیم روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت

1- Central rotable composite design
2- factorial points
3- Axial points
4- central point

جدول ۱- فاکتورها و شرایط مورد استفاده در آزمایش بهینه سازی

		کد				
فاکتور ها	نشانه	-۱/۶۸۲	-۱	۰	۱	+۱/۶۸۲
غلظت آنزیم (درصد)	X_1	۰/۶۶	۱	۱/۵	۲	۲/۳۴
زمان آبکافت (دقیقه)	X_2	۱۹/۷۷	۳۰	۴۵	۶۰	۷۰/۲۳
دمای آبکافت (درجه سانتی گراد)	X_3	۴۱/۵۹	۴۵	۵۰	۵۵	۵۸/۴۱

در شکل شماره ۲ تاثیر میزان مصرف آنزیم و دما روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی وقتی که زمان در سطح ۴۵ دقیقه ثابت است مشاهده می‌گردد. با افزایش غلظت آنزیم و در دماهای پایین تر فعالیت حذف رادیکال آزاد پپتیدهای حاصله بیشترین است و افزایش دما باعث کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌گردد. در شکل ۳ تاثیر میزان مصرف آنزیم و زمان روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی در زمانی که دما در سطح ۵۰ درجه سانتی گراد ثابت است مشاهده می‌گردد. با افزایش غلظت آنزیم و در زمان محدود آبکافت پپتیدهای حاصله فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان می‌دهند اما با افزایش زمان آبکافت و کاهش غلظت آنزیم از فعالیت آنتی اکسیدانی محصول کاسته می‌شود.

روش پاسخ سطحی به شکل موفقیت آمیزی برای بهینه سازی پارامترهای تاثیر گزار بر روند آبکافت پروتئین ها مورد استفاده قرار گرفته است. این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایشات، ساخت مدل ها، تعیین تاثیر چندین فاکتور و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ های مورد نیاز است. شکل های سه بعدی پاسخ وقتی یکی از متغیرها در سطح مرکزی ثابت است و دوتای دیگر تغییر می‌کند در شکل های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل ها دیده می‌شود با افزایش غلظت آنزیم در دما و زمان محدود پپتیدهای حاصل بالاترین فعالیت آنتی اکسیدان را نشان می‌دهند. این شکل ها نشان می‌دهد که هر سه فاکتور غلظت آنزیم، زمان و دما آبکافت پروتئین را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

یکی از نکات مهم در مورد واکنش های کاتالیز شده آنزیمی‌این است که همچون سایر واکنش های شیمیایی باید از قوانین ترمودینامیک پیروری کنند. بویژه واکنش تنها در صورتی پیش می‌رود که با یک کاهش سطح انرژی آزاد اصلی همراه باشد به عبارت دیگر انرژی گیبس در آن منفی باشد. در نتیجه غلظت سوبسترا باید در سطح مشخصی باشد تا واکنش انجام گیرد و میزان فرآورده نهایی بهینه باشد (Barman, 1969). در این خصوص شرایط محیطی بسیار تاثیر گزارند. در نتیجه در مطالعه کینتیک آنزیم ها غلظت آنزیم، pH، دما، رطوبت، مقاومت یونی و حضور یا عدم حضور مواد بازدارنده، فعال کننده و یا کوفاکتورها بسیار موثر است.

در مورد غلظت باید گفت که آنزیم با سوبسترا تشکیل یک کمپلکس یک به یک استوکیومتری می‌دهد و تنها این ترکیب است که می‌تواند به محصول شکسته شود. بنابراین با افزایش غلظت آنزیم سوبسترا اشباع شده و فعالیت آنزیم به سمت حداکثر پیش می‌رود.

البته باید توجه داشت که ممکن است با گذشت زمان پایداری آنزیم کم شود و واکنش دیگر از قوانین ترمودینامیک پیروی نکند و تجمع محصول به حدی برسد که خاصیت بازدارندگی داشته باشد. همچنین آنزیم ها در دمای بالا ناپایدارند و با افزایش دما آنزیم ها با سرعت بیشتری دناتوره می‌شوند (Styer, 1988).

مطالعات متعددی روی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین های آبکافت ماهی انجام شده است (Taheri *et al*., 2010 ; طاهری و بیتا، ۱۳۹۰) حذف رادیکال آزاد مکانیسم اولیه ای است که توسط آن مواد آنتی اکسیدان می‌توانند از واکنش های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال های آزادی است که در دمای اتاق پایدار است (Zhong, 2011). وقتی DPPH در حضور یک ماده الکترون دهنده مثل آنتی اکسیدان قرار می‌گیرد یک الکترون یا هیدروژن می‌پذیرد تا به یک مولکول دی مگنتیک پایدار تبدیل شود و درنتیجه مهار شده و جذب در ۵۱۷ نانومتر کم می‌شود.

پراکسیداسیون از طریق رادیکال های آزاد واسطه که هیدروژن را از کربن متیلن اسیدهای چرب غیر اشباع جذب می‌کنند ایجاد می‌شود (Rajapakes *et al.,* 2005). پپتیدهای آنتی اکسیدان از منابع مختلف قدرت های متفاوتی در حذف رادیکال آزاد دارند اما مکانیسم حذف رادیکالهای آزاد وابسته به وزن مولکولی و خصوصیات شیمیایی مثل آبگریزی و توانایی انتقال الکترون اسیدهای آمینه در توالی پپتیدهاست (Qian *et al.,* 2008). DPPH عموماً برای شناسایی مواد کاهنده به کار می‌رود (Baea and Suh, 2006).

مکانیسم دقیق فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها کاملاً شناخته شده نیست اما مطالعات متعدد نشان داده است که این پپتیدها پراکسیداسیون لیپیدها را محدود می‌کنند، رادیکال های آزاد را جمع می‌کنند (Moure *et al.,*2006; Qian *et al.,* 2008) و کلاته کننده یا انتقال دهنده یون های فلزی اند (Rajapakse *et al.,* 2005). بعلاوه گزارش شده است که پپتیدهای آنتی اکسیدان سلول‌ها را از آسیب توسط گونه های فعال اکسیژن با تحریک ژن ها

حفظ می‌کنند. مشخص شده است که دی پپتید متیونین- تیروزین ماهیچه ساردین با تحریک بیان ژن هِم اکسیژناز -۱ و فریتی (پروتئین حفاظتی آنتی اکسیدان) در سلول های اندوتلیال از فشار اکسیدانی کم می‌کند (Erdmann, 2006). بعلاوه مطالعه دیگری نشان داده است که این پروتئین ها قادر به افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش غلظت مالون آلدهید در مطالعات درون سلولی می‌باشند (Fu, 2003).

در مطالعه حاضر از آنزیم پاپایین استفاده شده است که توانسته در رنج دمایی کم و زمان محدود آبکافت پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدان بالا تولید کند و با افزایش زمان و دمای واکنش از قدرت آنتی اکسیدانی پپتیدها کاسته شده است. این نتیجه بر خلاف نتایج برخی یافته های دیگر است که افزایش زمان و دمای آبکافت را باعث افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی دانسته اند. شاید بتوان گفت ذات آنزیم به کار رفته در این تحقیق به دلیل تفاوت در محل اختصاصی اتصال به پروتئین متفاوت باشد. فاکتورهای متفاوتی می‌تواند روی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال، تاثیر گذارد. شرایط استخراج پروتئین، درجه آبکافت، نوع آنزیم پروتئازی (Gibbs *et al.*, 2004)، ساختار پپتیدی (Saito *et al.*, 2003) و غلظت پپتیدها از آن عوامل می‌باشد. بعلاوه وزن مولکولی پپتیدها می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی را تحت تاثیر قرار دهد.

نتایج آنالیز واریانس

جدول ۲ نتایج آنالیز واریانس را نشان می‌دهد بر این اساس مدل در سطح احتمال ۹۹٪ معنی دار است. همچنین متغیر های مستقل اختلاف معنی داری نشان دادند و سطح نتایج متقابل غلظت آنزیم و دما اختلاف معنی داری در سطح احتمال ۹۵٪ نشان داد. شکل۲ نیز نتایج حاصل از تخمین مدل و نتایج واقعی را مقایسه نموده است. بر اساس نتایج ضریب تعیین ۰/۹ و ضریب تعیین اصلاح شده ۰/۸۶ بدست آمد.

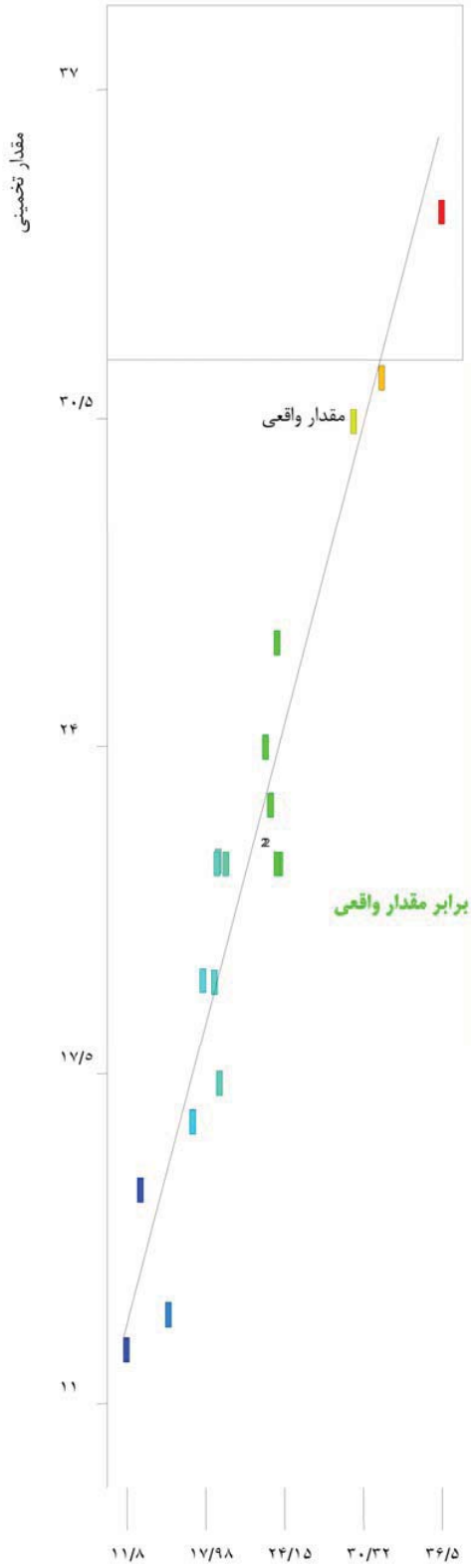
تعیین مدل پاسخ سطحی

از رگرسیون برای تعیین یک مدل پاسخ سطحی بر اساس برآیند پاسخ های خطی و درجه دو / تداخلی استفاده شد. مدل رگرسیونی برای تخمین فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH برای مقادیر واقعی در فرمول (۴) آمده است:

(۴)

$$\text{فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH} = (+۳۴/۰۳۶۰۸) + (+۵۸/۰۱۷۷۳)X_1 + (-۱/۰۸۸۹۸)X_2 + (+۰/۲۰۰۵۸)X_2 + (-۱/۰۰۵)X_3X_1$$

نتایج آنالیز واریانس در جدول نشان می‌دهد که مدل ریاضی در سطح ۹۹٪ معنی دار است.



شکل ۲ –مقایسه مقدار تخمینی از مدل در برابر مقدار واقعی

جدول ۲ – جدول آنالیز واریانس درجه هیدرولیزاسیون تحت تاثیر متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهینه سازی

فاکتورها	SS	df	MS	F	p
مدل	۶۳۲/۱۶	۶	۱۰۵/۳۶	۲۰/۹۷	۰/۰۰۰۱
متغیرهای مستقل					
نسبت آنزیم به سوبسترا (X_1)	۴۴۷/۰۴	۱	۴۴۷/۰۴	۸۸/۹۷	۰/۰۰۰۱
زمان (X_2)	۲۵/۷۲	۱	۲۵/۷۲	۵/۱۲	۰/۰۴۱۵
دما (X_3)	۰/۳۱	۱	۰/۳۱	۳/۷۹	۰/۰۰۰۹
روابط دوتایی					
$X_2 \times X_1$	۳	۱	۳	۰/۶	۰/۴۵۳۴
$X_3 X \times_1$	۵۰/۵	۱	۵۰/۵	۱۰/۰۵	۰/۰۰۴۷
$X_3 \times X_2$	۱۳/۷۸	۱	۱۳/۷۸	۲/۷۴	۰/۱۲۱۶
فقدان تناسب[1]	۳۸/۶۳	۸	۴/۸۳	۰/۹	۰/۵۷۲۶
خطای خالص[2]	۲۶/۶۹	۵	۵/۳۴		
تصحیح کلی[3]	۶۹۷/۴۸	۱۹			

ضریب تعیین کلی و ضریب تعیین اصلاح شده نشان می‌دهند که مدل رگرسیونی واکنش را به خوبی نشان می‌دهد و می‌تواند تغییرات کلی را درون رنج مقادیر مورد مطالعه توضیح دهد. مدل دقت کافی را براساس میزان رضایت R^2 نشان می‌دهد زیرا ضریب دقت مورد قبول برای مدل بالای ۴ می‌باشد و در مدل حاضر برابر ۱۶/۹۶ می‌باشد. در مدل رگرسیونی مشخص شد که فقدان تناسب مدل معنی دار نیست و این بدین معنی است که مدل از تناسب خوبی برخوردار است.

آزمایش مدل تعیین شده برای اطمینان از تطابق کافی با سیستم واقعی لازم است در نتیجه در آنالیز بعدی هر کدام از مقادیر مشاهده شده برای حذف رادیکال آزاد با مقادیر تخمین زده شده مقایسه شد. مقایسه پلات هم ارجی سطح نسبتاً قابل قبولی را ارائه می‌دهد. تمام این نتایج تفسیر ریاضی قابل قبولی از روند حذف رادیکال آزاد DPPH توسط مدل را نشان می‌دهد.

بهینه سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهینه سازی میزان دما حداقل و میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد حداکثر در نظر گرفته شد. همچنین زمان و غلظت آنزیم آزاد شد تا در رنج دمایی تعریف شده باشد. نتیجه حاصل از مدل عبارت بود از غلظت آنزیم ۲٪ , زمان ۳۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه سانتی گراد که در نتیجه بر اساس چنین شرایطی میزان حذف رادیکال آزاد DPPH برابر ۶۴/۵ درصد بدست آمد.

برای تعیین اعتبار مدل ۳ آزمایش تحت شرایط بهینه انجام شد که میزان حذف رادیکال آزاد ۰/۳۸ ± ۶۴/۱۴ درصد بدست آمد. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از تخمین مدل همپوشانی دارد و درنتیجه اثبات می‌کند که مدل قوی است و برای تخمین نتایج آزمایش قابل کاربرد است.

ترکیب اسید آمینه پروتئین آبکافت تهیه شده بر اساس شرایط بهینه

پودر پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی زرد متمایل به سفید بود و ترکیب اسیدهای آمینه آن در جدول ۴ موجود می‌باشد. از شاخص شیمیایی جهت تعیین ارزش غذایی این پروتئین استفاده شد. براین اساس متیونین و هیستیدین بر اساس هر دو رفرنس اسیدهای آمینه محدود کننده بودند. بر اساس رفرنس فائو اسیدهای آمینه ایزو لوسین و لوسین نیز محدود کننده بودند و بر اساس رفرنس NRC فنیل آلانین محدود کننده بود. بقیه اسیدهای آمینه ضروری بر اساس رفرنس های استاندارد در حد مورد نیاز موجود بود. بیشترین میزان اسیدهای آمینه غیر ضروری موجود گلایسین با مقدار ۱۵٪ بود.

خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب، ساختار و آبگریزی می‌باشد (Chen *et al.,* 1998). در این میان ترکیب اسیدهای آمینه نقشی اساسی ایفا می‌کند. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها، خواص آنتی اکسیدان پروتئین آبکافت را تعیین می‌کند (Wu *et al.,* 2003). همچنین توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز در این امر مهم است (Kim *et al.,* 2010). در گزارش ها نوع آنزیم و پی اچ و دمای آبکافت روی محتوای اسید آمینه تولید شده تاثیر دارد.

1- Lack of fit
2- Pure error
3- Corrected total

گزارش شده است که اسیدهای آمینه عطرزا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین (Rajapaks *et al.,* 2005) و اسیدهای آمینه آبگریز والین، لوسین، آلانین و متیونین نقش حیاتی در فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می‌کنند (Kim *et al.,* 2001; Mendis *et al.,* 2005). Suetsuna و همکاران (2000) پیشنهاد کردند که گروه های فنولیک هیدروکسیل در اسیدهای آمینه آروماتیک عامل مهار کردن رادیکال آزاد است که دهنده الکترون اند و اسیدهای آمینه هیستیدین، پرولین، آلانین و لوسین در این امر دخیلند.

Davalos و همکاران (2004) گزارش کردند که بین اسیدهای آمینه تیروزین، تریپتوفان و متیونین بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی را دارند و سپس هیستیدین، سیستئین و فنیل آلانین قرار دارد.

البته باید توجه داشت که در کنار ترکیب اسیدهای آمینه توالی قرار گرفتن اسیدهای آمینه در پپتیدها هم مهم است. شاید بتوان گفت در تحقیق حاضر افزایش دما و زمان واکنش باعث تغییر توالی اسیدهای آمینه از حالت بهینه حداکثر می‌گردد و از فعالیت آنتی اکسیدانی آنها کم می‌کند.

از سوی دیگر ارزش غذایی مواد غذایی به نوع و مقدار اسیدهای آمینه موجود مورد نیاز برای بدن دارد. در مطالعه حاضر نیز از شاخص شیمیایی جهت تعیین ارزش غذایی این پروتئین استفاده شد. شاخص شیمیایی سطح اسیدهای آمینه ضروری بین نمونه مورد مطالعه و پروتئین استاندارد را مقایسه می‌کند. در مطالعه حاضر شاخص شیمیایی بر اساس پروتئین رفرنس فائو و NRC محاسبه گردید. براین اساس متیونین بر اساس هر دو رفرنس اسیدهای آمینه محدود کننده بودند. بر اساس رفرنس فائو اسیدهای آمینه ایزو لوسین و لوسین نیز محدود کننده بودند. بقیه اسیدهای آمینه ضروری بر اساس رفرنس های استاندارد در حد مورد نیاز موجود بود. بیشترین میزان اسید های آمینه غیر ضروری موجود گلایسین با مقدار ۱۵٪ بود.

جدول ٤ - ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با پروتئین رفرنس FAO/WHO

اسید آمینه	درصد اسید آمینه			شاخص شیمیایی	
	پروتئین آبکافت	پروتئین رفرنس الف[1]	پروتئین رفرنس ب[2]	الف	ب
اسیدهای آمینه ضروری					
هیستیدین	۲/۲	۲	۲/۱	۱/۱	۱/۰۴
ایزولوسین	۲/۷	۴	۲/۵	۰/۶۷	۱/۰۸
لوسین	۶/۱	۷	۳/۳	۰/۸۷	۱/۸۴
لیزین	۵/۸	۵/۵	۵/۷	۱/۰۵	۱/۰۱
متیونین	۲/۱	۳/۵	۳/۱	۰/۶	۰/۶۷
فنیل آلانین	۵	۴/۲۹	۶/۵	۲/۷۹	۱/۸۴
تیروزین	۷	-	-	–	–
ترئونین	۶/۴۵	۴	۳/۹	۱/۶۱	۱/۶۵
آرژینین	۵/۱۲	۵	۱/۳۱	۱/۰۲	۳/۹۳
والین	۵/۶۱	۵/۴۲	۳/۶	۱/۰۳	۱/۵۵
اسیدهای آمینه غیر ضروری					
آسپارتیک اسید	۱۳/۱				
گلوتامیک اسید	۹/۷				
سرین	۳/۳				
گلایسین	۱۵				
آلانین	۲/۲۳				

[1] میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس رفرنس FAO/WHO

[2] میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس رفرنس(1993) NRC

در این مطالعه از ماهی کامل استفاده شد و مشاهده مقدار بالای گلایسین ممکن است به علت وجود پوست و استخوان ماهی باشد که محتوای کلاژن بالایی دارد و کلاژن میزان بالایی گلایسین دارد. در جمع بندی می‌توان گفت پروتئین آبکافت تولید شده از ماهی ساردین پهلو طلایی با آنزیم پاپایین قدرت آنتی اکسیدانی خوبی در شرایط بهینه گزارش شده توسط مدل حاصل از این آزمایش نشان می‌دهد که ترکیب اسیدهای آمینه مناسب در این مسئله دخیل است.

نتیجه‌گیری

ماهیان پلاژیک ریز مانند ساردین پهلو طلایی منبع بسیار خوبی برای تهیه محصولات با ارزش افزوده می‌باشند و در صورتی که از این منبع در شرایط بهینه ذکر شده در این تحقیق پروتئین آبکافت تولید شود پپتیدها و اسیدهای آمینه تولیدی توانایی بسیار خوبی در حذف رادیکال آزاد خواهند داشت و می‌توانند سیستم های بیولوژیک و غذایی را از خطر این رادیکال های آزاد و اکسیداسیون حفظ کنند. لذا استفاده از این پروتئین آبکافت در صنعت غذایی به عنوان مکمل می‌تواند اثر سلامتی بخش داشته باشد. در این خصوص مطالعات تکمیلی در سیستم های مدل و درون موجود زنده برای توصیه غذایی این فرآورده ضروری می‌نماید.

سپاسگزاری

این تحقیق با حمایت مادی و معنوی دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است و نویسندگان از این دانشگاه به جهت فراهم آوردن امکانات تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایند.

منابع

طاهری، ع.، بیتا، س. ۱۳۹۰. خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده احشای یال اسبی ماهی (*Trichiurus lepturus*) تولید شده با آنزیم پروتامکس. بیستمین کنگره ملی علوم و صنایع غذایی ایران، دانشگاه صنعتی شریف.

Baea, S.H., & Suh, H.J. 2006. Antioxidant activities of fi ve different mulberry cultivars in Korea. LWT-Food Science and Technology, 40, 955−962.

Barman, T.E. 1969. Enzyme handbook;Springer Verlag,Berlin.

Bhaskar, N., Modi, V.K., Govindaraju, K., Radha, C., Lalitha, R.G. 2007. Utilization of meat industry by-products: protein hydrolysate from sheep visceral mass. Bioresource Technology, 98, 388–394.

Borek, C., 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract.Journal of Nutrition, 13, 1010–1015.

Cheison, S. C., Wang, Z., & Xu, S. Y. 2007. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. Journal of Food Engineering, 80, 1134–1145.

Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F., Fujimoto, K., Nokihara, K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J Agric Food Chem, 46, 49–53.

Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P., Berge, J.P.2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. Process Biochemistry, 41, 2327-2332.

Erdmann, K., Grosser, N., Schipporeit, K., Schroder, H. 2006. The ACE inhibitory dipeptide Met-Tyr diminishes free radical formation in human endothelial cells via induction of heme oxygenase-1 and ferritin. J Nutr,136, 2148–52.

FAO/WHO, 1985. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724, pp. 116–129.

Flynn, K.J. 1988. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. Chem Ecol, 3, 269–93.

Fu, X. 2003. Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats. Chin J Vet Sci Technol,11, 49–50.

Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C. 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Res Int, 37,123–31.

Iran Fisheries Organisation, unpublished data. 2008.

Je, J.Y., Park, P.J., Kim, S.K. 2004. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Res Intern, 38(1), 45–50.

Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, K.S., Joo, D.S., Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatine hydrolysate of Alaska Pollack skin. J Agric Food Chem, 49,1984–9.

Kim, K.M., Lee, D.S., Nam, M.H., Yoo, H.S., Kim, S.B., Chun, B.S., Lee Y.B. 2010. Optimization of Alcalase for Krill Byproduct Hydrolysis and Antioxidative Activities by Response Surface Methodology, J Food Sci Nutr, 15, 316 - 321.

Kim, S.K., Kim, Y.T., Byun, H.G., Nam, K.S., Joo, D.S., Shahidi, F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. J Agric Food Chem, 49,1984–1989.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. 2000a. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 48, 657–666.

Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. 2000b. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(1), 43–81.

Liaset, B., Lied, E., Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80, 581–589.

Lindroth, P., Mopper, K. 1979. High performance liquid chromatographic determination of subpicomole amounts of amino acids by precolumn fluorescence derivatization with o-phthaldialdehyde. Analyt Chem, 51,1667–74.

Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. J Agric Food Chem, 53, 581–7.

Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C. 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochem, 41, 447–56.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. 2005.Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering, 70, 571–578.

NRC, 1993. National Research Council – nutrient requirements of Fish.National Academy of Sciences, Washington, 124p.

Picot, L., Bordenave, S., Didelot, F.A.I. et al. 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Process Biochemistry, 41, 1217–1222.

Qian, Z.J., Jung, W.K., Kim, S.K. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresour Technol, 99,1690–8.

Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. J Nutr Biochem, 16(9), 562–9.

Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W.K., Je, J.Y., Kim, S.K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Res Int, 38,175–82.

Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., et al. 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. J Agric Food Chem , 51, 3668–74.

Shahidi, F., Amarowick, R. 1996. Antioxidant activity of protein hydrolysates from aquatic species. JAOCS, 73,1197–9.

Slizyte, R., Mozuraityte, R., Martınez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., Rustad, T. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. Process Biochemistry, 668-677.

Suetsuna, K., Ukeda, H., Ochi, H. 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J Nutr Biochem, 11, 128–131.

Styer, L. 1988. Biochemistry,3rd edn. W.,H.Freeman and Co., San Francisco.

Suetsuna, K., Maekawa, K. & Chen, J. 2004. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Journal of Nutritional Biochemistry, 15.

Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaie, M. 2011. Optimization of gold stripe sardine (*Sardinella gibossa*) protein hydrolysate using Alcalase® 2.4L by RSM, CyTA Journal of Food, 9(2), 114–120.

Taheri, A., Farvin, S., Jacobsen, C., Baron, C. P. 2010. Antioxidant activity of peptides isolated from salted herring brine. WEFTA international conference, Turkey.

Viera, G.H.F., Martin, A.M., Sampaiao, S.S., Omar, S., Gonsalves, R.C.F. 1995. Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (Panulirus spp.) processing wastes. Journal of the Science of Food and Agriculture, 69, 61–65.

Wu, H.C., Chen, H.M., & 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.

Zhong , s. et al., 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry, Food Chemistry, 126, 1636–1642.