



بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت ساردین پهلوی (*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 پهلوی (*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٪، 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. 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 می توان گفت که مدل حاصل از شرایط خوبی جهت پیش بینی برخوردار است و پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلوی دارای خواص آنتی اکسیدانی مطلوبی در سطح بهینه می باشد و می توان از این فرآورده شیلاتی جهت استفاده به عنوان مکمل غذایی استفاده نمود.

واژه های کلیدی: پروتئین آبکافت، ساردین پهلوی، پاپائین، متیونین، هیستیدین، آنتی اکسیدان

مقدمه

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 می دهد (Slizyte et al., 2009).

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

امروزه بیماری های مرتبط با رادیکال های آزاد باعث آسیب های جدی به بدن می شوند که می تواند 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 می گردد 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 می توانند برای جلوگیری از

۱ و 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

مواد و روش ها

مواد

ماهی ساردین پهلوی طلایی با وزن متوسط 64 ± 7 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 -20 درجه سانتی گراد نگه داری شدند. آنزیم پاپائین از شرکت سینوفارم تهیه و تا زمان مصرف در 4 درجه سانتی گراد نگه داری گردید.

آبکافت

ماهی ساردین پهلوی طلایی در یک چرخ گوشت نیمه صنعتی (شرکت هوتخش) چرخ شد و سپس به ارلن مایرهای 250 میلی لیتری اضافه شد. ارلن ها برای 20 دقیقه در 85 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 10 درجه سانتی گراد برای 20 دقیقه در g 600 جهت جدا کردن اضافات گوشت و چربی سانتریفوژ شد. هر نمونه حاوی نسبت $1:1$ از 100 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 85 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 -20 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 ($1/5$ میلی لیتر، $0/1$ میلی مولار در اتانول 95%) با نمونه مخلوط گردید ($1/5$ میلی لیتر در غلظت های متفاوت نمونه در اتانول 50%). مخلوط تکان داده شد و پس از 30 دقیقه در دمای اتاق جذب در 517 نانومتر سنجیده گردید. برای کنترل محلول اتانول به جای نمونه به کار رفت. بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت $0/2$ میلی گرم بر میلی لیتر برای مقایسه استفاده شد (Shimada و همکاران (1992)). فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول ۱ سنجیده شد:

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

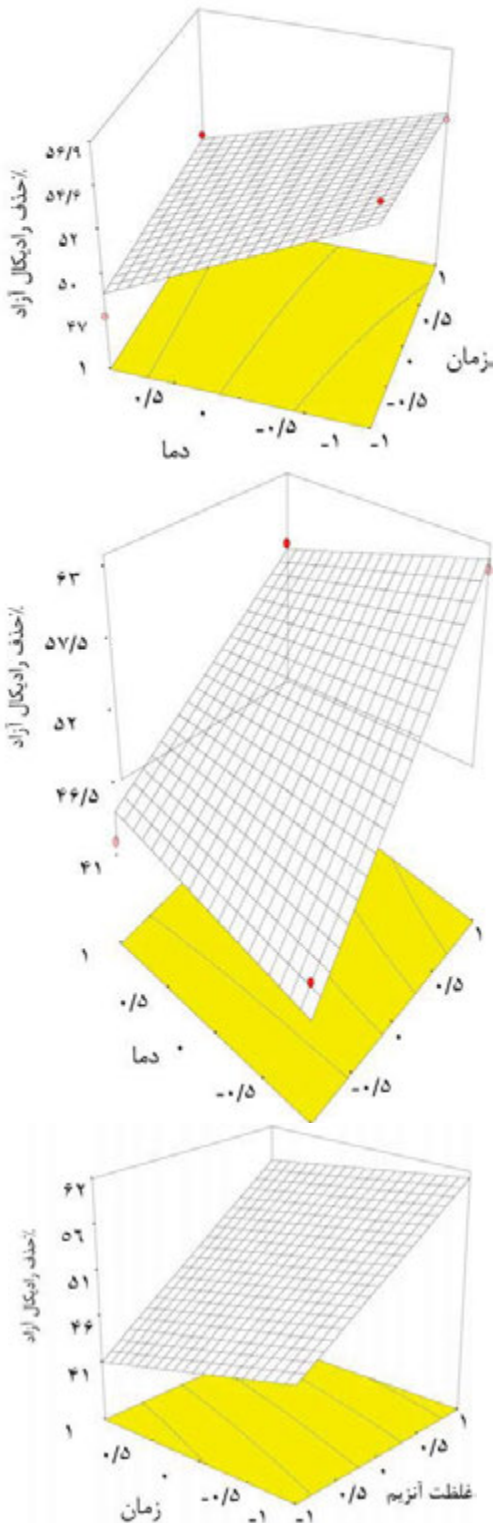
بهینه سازی

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

ساردین ماهیان در خلیج فارس نیز به 21419 تن در سال بالغ است که بیشتر به مصرف تهیه پودر ماهی می رسد (I.F.O., 2008). آبکافت آنزیمی پروتئین ها روشی مناسب برای فرآوری ماهیان کم مصرف می باشد 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 می تواند 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 می گیرند (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 می یابد. یکی از این خواص فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها می باشد 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 می نماید. مطالعات گسترده ای روی بهینه سازی آبکافت آنزیمی ماهیان مختلف و احتشای آنها توسط آنزیم هایی چون آلکالاز، پروتامکس و فلاووروزایم انجام شده است. در این میان استفاده از آنزیم های گیاهی در این خصوص کمتر مطرح شده و آنزیم هایی چون پاپائین می تواند بدین منظور مفید باشد. از سوی دیگر چندین فاکتور مانند pH، زمان، فعالیت آنزیمی و دما بر عملکرد آنزیم تاثیر می گذارد و امکان کنترل فرآیند را فراهم می نمایند (Viera et al., 1995).

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

با توجه به مطالب فوق در تحقیق حاضر به بهینه سازی تولید پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلوی طلایی (*Sardinella gibbosa*) 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.



شکل ۱- اثر زمان، دما و غلظت آنزیم روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت

استفاده گردید. طرح ترکیبی مرکزی^۱ با ۵ سطح برای هر تیمار و ۶ تکرار حول نقطه مرکزی استفاده شد (جدول ۱). این طرح از ۸ نقطه سازگانی^۲، ۶ نقطه محوری^۳ و ۶ نقطه حول نقطه مرکزی^۴ تشکیل شده بود. فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH به عنوان متغیر مستقل در نظر گرفته شد. مدل رگرسیونی چند جمله‌ای درجه ۲ برای پیش بینی میزان پاسخ استفاده گردید (فرمول ۲).

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

Y درجه آبکافت، β_0 عدد ثابت، β_i ، β_{ii} و β_{ij} ضرایب تخمینی مدل، x_i ، x_j سطوح متفاوت متغیرهای وابسته است. این مدل تأثیرات خطی، درجه دوم و متقابل متغیرها را بر روی میزان پاسخ نشان می‌دهد و تأثیر هر متغیر وابسته را بر روی پاسخ تخمین می‌زند. جهت انجام آنالیزها از نرم افزار 7 Graphpad-Prism استفاده شد. در نهایت ۳ آزمایش اضافی برای تعیین صحت محاسبات ریاضی انجام شد.

ترکیب اسید آمینه

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

$$\text{شاخص شیمیایی} = \frac{\text{اسید آمینه ضروری نمونه}}{\text{اسید آمینه ضروری استاندارد}} \quad (3)$$

نتایج و بحث

تأثیر فاکتورهای مختلف روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت

در شکل شماره ۱ تأثیر زمان و دما روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت سردین پهلوی 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 سانتی‌گراد و ۳۰ دقیقه آبکافت بدست می‌آید.

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

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

فاکتورها	نشانه	کد			
		۱	۰	-۱	+۱/۶۸۲
غلظت آنزیم (درصد)	X _۱	۲	۱/۵	۱	۰/۶۶
زمان آبکافت (دقیقه)	X _۲	۶۰	۴۵	۳۰	۱۹/۷۷
دمای آبکافت (درجه سانتی گراد)	X _۳	۵۵	۵۰	۴۵	۴۱/۵۹

در مورد غلظت باید گفت که آنزیم با سوبسترا تشکیل یک کمپلکس یک به یک استوکيومتری 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 آنزیم‌ها در دمای بالا ناپایدارند و با افزایش دما آنزیم‌ها با سرعت بیشتری دناتوره می‌شوند (Styer, 1988).

مطالعات متعددی روی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین‌های 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 واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال‌های 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 در نتیجه مهار شده و جذب در ۵۱۷ نانومتر کم می‌شود.

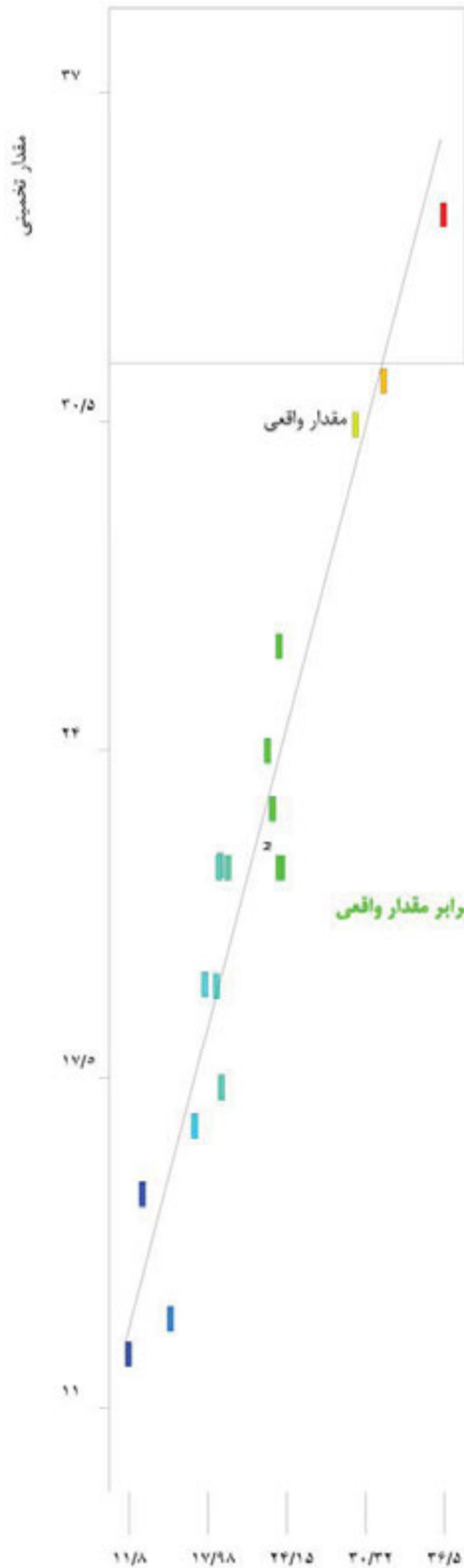
پراکسیداسیون از طریق رادیکال‌های آزاد واسطه که هیدروژن را از کربن متیلن اسیدهای چرب غیر اشباع جذب می‌کنند ایجاد می‌شود (Rajapakse et al., 2005). پپتیدهای آنتی اکسیدان از منابع مختلف قدرت‌های متفاوتی در حذف رادیکال آزاد دارند اما مکانیسم حذف رادیکال‌های آزاد وابسته به وزن مولکولی و خصوصیات شیمیایی مثل آگریزی 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، رادیکال‌های آزاد را جمع می‌کنند (Moure et al., 2006; Qian et al., 2008) و کلاته کننده یا انتقال دهنده یون‌های فلزی اند (Rajapakse et al., 2005). علاوه گزارش شده است که پپتیدهای آنتی اکسیدان سلول‌ها را از آسیب توسط گونه‌های فعال اکسیژن با تحریک ژن‌ها

در شکل شماره ۲ تاثیر میزان مصرف آنزیم و دما روی فعالیت حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت ساردین پهلوی 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 پهلوی 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 پروتئین‌ها مورد استفاده قرار گرفته است. این روش یک روش ریاضی طراحی آزمایشات، ساخت مدل‌ها، تعیین تاثیر چندین فاکتور و جستجوی شرایط بهینه برای پاسخ‌های مورد نیاز است. شکل‌های سه بعدی پاسخ وقتی یکی از متغیرها در سطح مرکزی ثابت است و دوتای دیگر تغییر می‌کند در شکل‌های ۱ تا ۳ نشان داده شده است. همانطور که در شکل‌ها دیده می‌شود با افزایش غلظت آنزیم در دما و زمان محدود پپتیدهای حاصل بالاترین فعالیت آنتی اکسیدان را نشان می‌دهند. این شکل‌ها نشان می‌دهد که هر سه فاکتور غلظت آنزیم، زمان و دما آبکافت پروتئین را تحت تاثیر قرار می‌دهند.

یکی از نکات مهم در مورد واکنش‌های کاتالیز شده آنزیمی این است که همچون سایر واکنش‌های شیمیایی باید از قوانین ترمودینامیک پیروی 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 آنزیم‌ها غلظت آنزیم، pH، دما، رطوبت، مقاومت یونی و حضور یا عدم حضور مواد بازدارنده، فعال کننده و یا کوفاکتورها بسیار موثر است.



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

حفظ می‌کنند. مشخص شده است که دی پپتید متیونین- تیروزین ماهیچه ساردین با تحریک بیان ژن هم 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 گلوکوتایون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش غلظت مالون آلدهید در مطالعات درون سلولی می‌باشند (Fu, 2003).

در مطالعه حاضر از آنزیم پاپابین 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. شکل ۲ 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)

$$\text{فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH} = (+34/03608) + X_1 (+58/01773) + X_2 (-1/08898) + X_3 (+0/20058) + X_2 X_1 (-1/005)$$

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

جدول ۲ - جدول آنالیز واریانس درجه هیدرولیزاسیون تحت تاثیر متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهبود سازی

فاکتورها	SS	df	MS	F	p
مدل	۶۳۲/۱۶	۶	۱۰۵/۳۶	۲۰/۹۷	۰/۰۰۰۱
متغیرهای مستقل					
نسبت آنزیم به سوپسترا (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
$X_3 \times X_1$	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 ^۱	۳۸/۶۳	۸	۴/۸۳	۰/۹	۰/۵۷۲۶
خطای خالص ^۲	۲۶/۶۹	۵	۵/۳۴		
تصحیح کلی ^۳	۶۹۷/۴۸	۱۹			

برای تعیین اعتبار مدل ۳ آزمایش تحت شرایط بهینه انجام شد که میزان حذف رادیکال آزاد $0.38 \pm 64/14$ درصد بدست آمد. نتایج این آزمایش با نتایج حاصل از تخمین مدل همپوشانی دارد و در نتیجه 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 گلايسین 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.

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.

بهبود سازی و اعتبار سنجی مدل

در روند بهبود 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.

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

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. بر این 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.

گزارش شده است که اسیدهای آمینه عطرزا مثل تیروزین، هیستیدین، تربیتوفان و فنیل آلانین (Rajapaks *et al.*, 2005) و اسیدهای آمینه آبرگیز 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، تربیتوفان 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

جدول ۴ - ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت ماهی ساردین پهلو طلایی و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با پروتئین رفرنس FAO/WHO

اسید آمینه	پروتئین آبکافت	پروتئین رفرنس الف ^۱	درصد اسید آمینه		شاخص شیمیایی
			پروتئین رفرنس ب ^۲	الف	
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
آرژنین	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				

^۱ میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس رفرنس FAO/WHO

^۲ میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس رفرنس NRC (1993)

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.

در این مطالعه از ماهی کامل استفاده شد و مشاهده مقدار بالای گلايسين ممکن است به علت وجود پوست و استخوان ماهی باشد که محتوای کلاژن بالایی دارد و کلاژن میزان بالایی گلايسين دارد. در جمع بندی می‌توان گفت پروتئین آبکافت تولید شده از ماهی ساردین پهلوی طلایی با آنزیم پاپاين 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.

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.

نتیجه گیری

ماهیان پلاژیک ریز مانند ساردین پهلوی 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

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 five 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-phthalaldehyde. *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., Martinez-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.