



بهینه‌سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ

علیرضا مهرگان نیکو^{۱*}، علیرضا صادقی ماهونک^۲، محمد قربانی^۲

علی طاهری^۳ و مهران اعلمی^۲

دانشجوی کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استادیار گروه شیلات دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
تاریخ دریافت: ۹۱/۱۲/۲۱؛ تاریخ پذیرش: ۹۲/۰۲/۲۱

چکیده

هدف از انجام این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بود. پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) که یک ماهی کم ارزش است از طریق هیدرولیز آنزیمی، توسط آنزیم آلکالاز تهیه گردید و عوامل مؤثر در هیدرولیز، جهت دستیابی به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها توسط روش سطح پاسخ (RSM) با طرح مرکب مرکزی (CCD) بهینه‌سازی شدند. اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم به‌عنوان سه متغیر مستقل در هیدرولیز، بر قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH توسط معادله درجه دوم برازش گردیدند. مدل ریاضی مشخص کننده ناحیه‌ای با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بیشتر از ۵۸/۲۲ درصد) در شرایط بحرانی منطبق با دمای ۴۸/۱۱ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه و فعالیت آنزیمی ۶۴/۴۳ واحد آنسون بر کیلوگرم بود. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و نیز استفاده‌های دارویی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده ماهی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، *Carassius carassius*، آلکالاز، روش سطح پاسخ

*مسئول مکاتبه: alireza.mn@gmail.com

مقدمه

پراکسیداسیون چربی به عنوان اصلی ترین مسیر تغییرات کیفیت که عطر، طعم، بافت و ظاهر غذاها را تحت تأثیر قرار می دهد شناخته شده است (راجاپاکس و همکاران، ۲۰۰۵). علاوه بر این مشخص گردیده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در تعدادی از بیماری های خاص دارد که عامل این بیماری ها پراکسیدهای چربی و ترکیبات مولکولی با وزن کم تولید شده در مرحله نهایی واکنش اکسیداسیون می باشند. از این رو به منظور پیش گیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری ها ضروری است که جلوی پراکسیداسیون چربی ها و تشکیل رادیکال های آزاد به وجود آمده در سلول های زنده و محصولات غذایی گرفته شود (لی و همکاران، ۲۰۰۸).

تعادل آنتی اکسیدان- پرواکسیدان در بدن انسان می تواند طی افزایش سن و به علت سایر عوامل مانده آلوده کننده های محیطی، خستگی، دریافت کالری اضافه و رژیم غذایی پرچرب دستخوش تغییر شود. با پیشرفت سن قابلیت آنتی اکسیدانی سلولی و پلاسمایی و نیز جذب مواد مغذی، شامل آنتی اکسیدان ها به تدریج کاهش می یابد و منجر به افزایش آسیب پذیری پروتئین ها به حمله رادیکال های آزاد می شود. سایر عوامل محیطی ذکر شده می تواند سیستم ایمنی بدن را تضعیف کرده و بدن را نسبت به حمله اکسیداتیو آسیب پذیر نماید. به منظور بالا بردن سلامت انسان مشخص گردیده که استفاده از آنتی- اکسیدان های رژیمی با افزایش بار آنتی اکسیدانی بدن اقدامی موثر و عملی می باشد (ریزیوی و همکاران، ۲۰۰۶؛ المادفا و میر، ۲۰۰۸).

پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیوشیمیایی متعددی از خود بروز می دهند. این پپتیدها در اندازه های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینو (سرمدی و اسمائیل، ۲۰۱۰) و جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می باشند (سان و همکاران، ۲۰۰۴)؛ ساختار آمینواسیدی و توالی های آنها فعالیت زیست فعالی را تحت تأثیر قرار می دهند. براساس ویژگی های ساختاری و ترکیب آمینواسیدی، آنها نقش های متعددی مانند مهارکنندگی عناصر کمیاب، تقویت کنندگی سیستم ایمنی، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی اکسیدانی، کاهش دهندگی کلسترول و فعالیت ضد فشار خون بالا از خود نشان می دهند. با این حال پپتیدهای متعددی یافت شده اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می دهند (سرمدی و اسمائیل، ۲۰۱۰). قابلیت آنتی اکسیدانی این هیدرولیز شده های پروتئینی به تأثیرات چندگانه ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی ها شامل توانایی آنها در زدودن رادیکال های آزاد، عمل

به‌عنوان شلاته کننده فلزات، خاموش کننده اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغاز کننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن می‌باشند (لی و همکاران، ۲۰۰۸).

به‌کارگیری تکنولوژی آنزیمی به‌منظور بازیابی و تغییرات پروتئینی، منجر به تولید طیف گسترده‌ای از اجزاء غذایی و محصولات صنعتی گردیده است. عموماً پروتئازها از منابع مختلفی جهت هیدرولیز هرچه انتخابی‌تر پروتئین‌ها به‌کار گرفته می‌شوند. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال قوی می‌باشد. مشخص گردیده پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی قابلیت استفاده در کاربردهای تغذیه‌ای و دارویی دارند (نالیانون و همکاران، ۲۰۱۱).

همچنین مشخص گردیده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی مانند ژلاتین پوست از اسنپر قرمز^۱ (خانتافانت و بنجاکول، ۲۰۰۸)، یا پروتئین هیدرولیز شده‌ی گوشت از تراولی زرد^۲ (کلومپونگ و همکاران، ۲۰۰۹)، پروتئین هیدرولیز شده سویا (چن و همکاران، ۱۹۹۵)، هیدرولیز شده‌های پروتئین‌های شیر مانند آلفالاکتالبومین^۳ و بتالاکتوگلوبولین^۴ (هرناندز و همکاران، ۲۰۰۵)، پروتئین هیدرولیز شده سفیده تخم‌مرغ (داوالوس و همکاران، ۲۰۰۴)، پروتئین هیدرولیز شده گلوتن (ماریا و همکاران، ۲۰۰۷)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود نشان می‌دهند.

روش سطح پاسخ^۵ روشی مفید است که جهت بهینه‌سازی فرایندهای غذایی به‌کار گرفته می‌شود (دینیز و مارتین، ۱۹۹۶). تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به‌تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید. به‌علاوه این روش می‌تواند مدلی ریاضی که دقیقاً کل فرایند را توصیف می‌کند را ایجاد نماید (سومایا مارتینز و همکاران، ۲۰۰۵). هدف این پژوهش تجزیه و تحلیل پاسخ سطحی اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس با استفاده از آنزیم آلكالاز می‌باشد.

ماهی کاراس (*Carassius carassius*) گونه‌ای از ماهیان آب شیرین و از خانواده‌ی کپورماهیان است که به‌طور عمده در دریاچه‌ها و رودخانه‌ها زیست می‌کند. این ماهی به‌واسطه اندازه کوچک، مزه و بوی نامناسب فاقد ارزش تجاری می‌باشد و فقط در برخی کشورها به‌عنوان منبع مهم پروتئینی مطرح است.

- 1- Red snapper
- 2- Yellow travelly
- 3- Alpha-lactalbumin
- 4- Beta-lactoglobulin
- 5- Response Surface Methodology

به دلیل قیمت بسیار پایین و وفور این ماهی فراوری محصولات با ارزش افزوده از این گونه ماهی مطرح می‌گردد (فائو، ۲۰۱۱؛ آی‌آف‌آی‌اس، ۲۰۰۹). از این رو به منظور یافتن روش‌های جدید جهت استفاده بهینه از منابع با ارزش اقتصادی پایین‌تر و تبدیل آن به ماده‌ای با ارزش مانند پروتئین‌های هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دارای اثرات سلامتی بخش این پژوهش صورت پذیرفته است.

مواد و روش‌ها

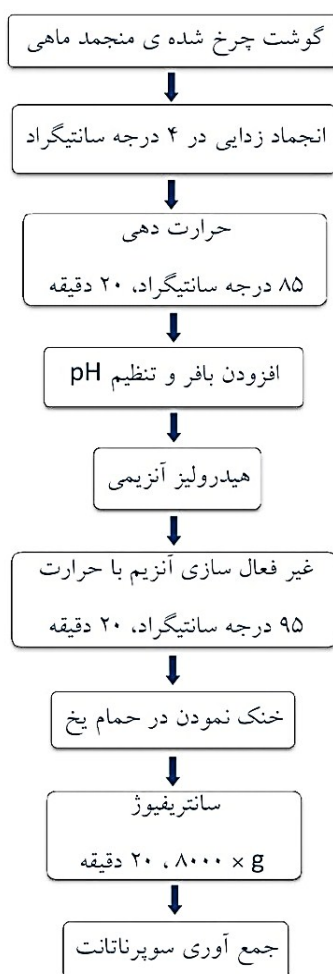
ماهی کاراس با وزن متوسط ۱۰۷ گرم از بازار ماهی گرگان تهیه گردید. آنزیم آلکالاز (با فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون بر گرم^۱ و دانسیته ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر) یک اندوپروتئیناز^۲ گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس^۳ می‌باشد. آنزیم از نمایندگی شرکت نووایمز^۴ دانمارک در ایران تهیه شد و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. اتانول، بافر تریس، هیدروکلریدریک اسید از شرکت مرک و معرف DPPH^۵ از شرکت سیگما بوده و تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس: ماهی کاراس پس از پوست‌گیری، سر و دم زنی و جدا نمودن امعاء و احشاء با آب شسته شده، سه بار توسط چرخ گوشت (ساخت انگلستان، شرکت کنود^۶ مدل KM010) چرخ گردید و سپس در بسته‌های پلاستیکی زیپ‌دار تا زمان آزمایش در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد (ساخت برزیل، شرکت ویرل پول^۷ مدل WVG301) نگهداری شد. مراحل تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس در شکل ۱ نشان داده شده است. گوشت چرخ شده منجمد ماهی کاراس به منظور انجمادزدایی در طول شب در یخچال گذاشته شد، سپس درون فلاسک‌ها توزین شده و به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های با منشاء داخلی درون حمام آب (ساخت آلمان، شرکت ممرت^۸ مدل WNB 22) ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت (گرارد و همکاران، ۲۰۰۲). نمونه‌های

۱- یک واحد آنسون (Anson unit) عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک میلی‌اکی والان اسید آمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۷/۵ (آسپمو و همکاران، ۲۰۰۵).

- 2- Endoproteinase
- 3- *Bacillus licheniformis*
- 4- Novozymes
- 5- 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl
- 6- Kenwood
- 7- Whirlpool
- 8- Memmert

حرارت دیده با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲ به حالت سوسپانسیون یکنواخت و با pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز ($pH = 8/5$)، در آمده (طاهری و همکاران، ۲۰۱۱) و سپس در دمای آزمایش، آنزیم براساس فعالیت تعریف شده به سوسپانسیون اضافه شد.



شکل ۱- مراحل تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس (*C. carassius*)

تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویزن^۱ مدل VS-8480) و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای مورد نظر انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ سرد گردید و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل^۲، مدل Combi - 514R) با دور ۸۰۰۰×g در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت (اویسی پور و همکاران، ۲۰۰۹).

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH: برای این منظور ۵۰۰ میکرولیتر از هر نمونه با ۵۰۰ میکرولیتر از اتانول ۹۹/۵ درصد و ۲۵ میکرولیتر از DPPH ۰/۰۲ درصد در اتانول ۹۹/۵ درصد مخلوط گردید؛ مخلوط برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه‌داشته شده و جذب رادیکال DPPH در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (ساخت انگلستان، پی جی اینسترومنت^۳ مدل T80) اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به رابطه زیر محاسبه شد.

جذب نمونه - جذب کنترل

$$\text{فعالیت زدودن رادیکال DPPH (درصد)} = \frac{\text{جذب کنترل}}{\text{جذب نمونه}} \times 100$$

جذب کنترل

نمونه کنترل به همان طریق تهیه شده با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. جذب کمتر مخلوط نشان دهنده فعالیت مهار رادیکالی و DPPH بالاتر می‌باشد (بوگاتف و همکاران، ۲۰۰۹).

آزمایشات بهینه‌سازی: به منظور بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی^۴ با ۵ سطح (+α، +۱، ۰، -۱ و -α) و ۶ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). محدوده متغیرهای مستقل زمان (X_۱)، دما (X_۲) و فعالیت آنزیم (X_۳) از آزمون‌های اولیه استنتاج گردید (داده‌ها عنوان نگردیده‌اند). طرح مرکب مرکزی در طرح آزمایش شامل ۸ نقطه فاکتوریل، شش نقطه محوری و شش تکرار در نقطه مرکزی بود (جدول

1- Vision Scientific Co., LTd.

2- Hanil science industrial

3- PG instruments

4- Central Composite Design

۲). نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به هر تیمار در جدول ۱ نشان داده شده است. تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چندجمله‌ای درجه دوم به منظور پیش‌بینی پاسخ، در نظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت معادله زیر است:

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

که Y متغیر وابسته (فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقدار واقعی) می‌باشد، β_0 ثابت بوده و β_i و β_{ii} و β_{ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل هستند. X_i و X_j سطح متغیرهای مستقل بوده و آنها به ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه دوم و متقاطع^۱ متغیرهای X_1 ، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می‌نماید. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده‌های آزمایشی به منظور انطباق مدل ریاضی، تعیین ضرایب رگرسیونی و تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسط نرم‌افزار Design Expert^۲ صورت پذیرفتند.

جدول ۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*C. carassius*).

سطوح و حدود متغیرها					متغیرهای مستقل
$+\alpha^*$	+۱	۰	-۱	$-\alpha$	
۲۳۶	۱۹۵	۱۳۵	۷۵	۳۴	زمان (دقیقه)
۵۷/۷۵	۵۴	۴۸/۵	۴۳	۳۹/۲۵	دما (درجه سانتی‌گراد)
۹۳/۶۳	۸۰	۶۰	۴۰	۲۶/۳۶	فعالیت آنزیمی (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین)

* مقدار α برابر ۱/۳۸۱۸ می‌باشد.

1- Cross

2- Design Expert, 6.0.2 trial, Stat-Ease Inc

جدول ۲- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح کدبندی شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*C. carassius*).

شماره تیمار	زمان (X ₁)	دما (X ₂)	فعالیت آنزیم (X ₁)	فعالیت آنتی اکسیدانی (درصد)
۱	-۱	-۱	-۱	۳۶/۹۱
۲	۱	-۱	-۱	۴۹/۳۴
۳	-۱	۱	-۱	۳۸/۳۰
۴	۱	۱	-۱	۴۲/۱۶
۵	-۱	-۱	۱	۴۰/۵۹
۶	۱	-۱	۱	۴۵/۶۶
۷	-۱	۱	۱	۳۹/۴۷
۸	۱	۱	۱	۴۳/۹۲
۹	-۱/۶۸۱۸	۰	۰	۳۸/۶۷
۱۰	۱/۶۸۱۸	۰	۰	۴۸/۱۶
۱۱	۰	-۱/۶۸۱۸	۰	۴۰/۲۸
۱۲	۰	۱/۶۸۱۸	۰	۳۹/۳۸
۱۳	۰	۰	-۱/۶۸۱۸	۴۷/۱۲
۱۴	۰	۰	۱/۶۸۱۸	۵۶/۴۴
۱۵	۰	۰	۰	۵۹/۱۵
۱۶	۰	۰	۰	۵۸/۸۱
۱۷	۰	۰	۰	۵۷/۱۷
۱۸	۰	۰	۰	۵۷/۹۶
۱۹	۰	۰	۰	۶۰/۳۸
۲۰	۰	۰	۰	۵۷/۸۲

نتایج و بحث

اثرات عوامل مختلف شامل زمان، دما و فعالیت آنزیم بر قابلیت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH در جدول ۳ نشان داده شده است.

جدول ۳- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ.

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F	P
مدل	۹	۱۱۹۴/۸۲۰	۱۳۲/۷۵۸	۱۷/۹۵۹	< ۰/۰۰۰۱
زمان	۱	۱۲۷/۷۵۶	۱۲۷/۷۵۶	۱۷/۲۸۳	۰/۰۰۲۰
دما	۱	۷/۵۶۴	۷/۵۶۴	۱/۰۲۳	۰/۳۳۵۶
فعالیت آنزیم	۱	۲۵/۳۴۴	۲۵/۳۴۴	۳/۴۲۹	۰/۰۹۳۹
زمان × زمان	۱	۴۳۰/۲۹۱	۴۳۰/۲۹۱	۵۸/۲۱۰	< ۰/۰۰۰۱
دما × دما	۱	۶۵۳/۰۶۴	۶۵۳/۰۶۴	۸۸/۳۴۷	< ۰/۰۰۰۱
فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم	۱	۹۰/۵۵۹	۹۰/۵۵۹	۱۲/۲۵۱	۰/۰۰۵۷
دما × زمان	۱	۱۰/۵۵۷	۱۰/۵۵۷	۱/۴۲۸	۰/۲۵۹۶
فعالیت آنزیم × زمان	۱	۵/۷۲۹	۵/۷۲۹	۰/۷۷۵	۰/۳۹۹۳
دما × فعالیت آنزیم	۱	۱/۰۷۳	۱/۰۷۳	۰/۱۴۵	۰/۷۱۱۲
باقیمانده	۱۰	۷۳/۹۲۱	۷/۳۹۲		
فقدان برازش ^۱	۵	۴۵/۳۰۵	۹/۰۶۱	۱/۵۸۳	۰/۳۱۳۲
خطای خالص	۵	۲۸/۶۱۶	۵/۷۲۳	۱۷/۹۵۹	
کل	۱۹	۱۲۶۸/۷۴۰			

ضرایب رگرسیون چندگانه^۲ از طریق روش حداقل مربعات^۳ به منظور پیش‌بینی مدل چندجمله‌ای درجه دوم^۴ برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ۴)، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

$$DPPH = -0.2225 (\text{زمان} \times \text{زمان}) - 0.0015 \text{ زمان} + 0.6719 \text{ زمان} - 0.3928 = \text{فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

$$(\text{فعالیت آنزیم} \times \text{فعالیت آنزیم}) - 0.0063 (\text{دما} \times \text{دما})$$

- 1- Lack of fit
- 2- Multiple regression coefficients
- 3- least-squares technique
- 4- Quadratic polynomial model

جدول ۴- ضرایب رگرسیونی مدل برآورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش‌بینی معادله مدل متغیرهای مستقل.

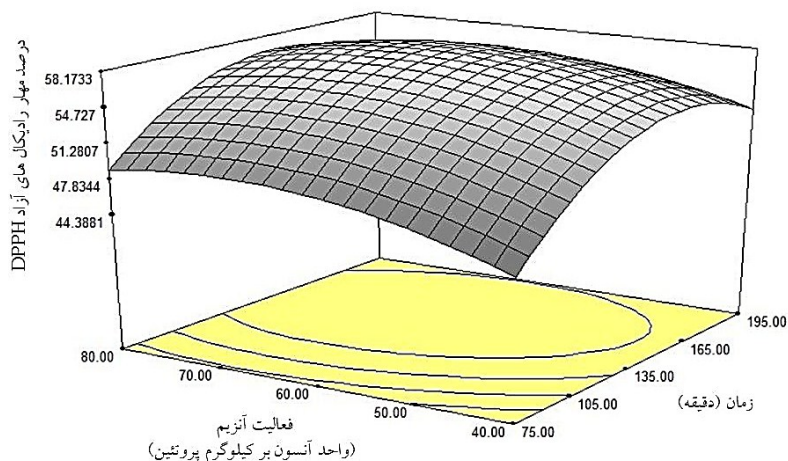
ضریب	متغیر مدل
-۵۳۹/۲۸	ثابت
۰/۶۷۱۹ **	زمان
۲۱/۷۲۰۹ ns	دما
۰/۷۵۳۹ ns	فعالیت آنزیم
-۰/۰۰۱۵ **	زمان × زمان
-۰/۲۲۲۵ **	دما × دما
-۰/۰۰۶۳ **	فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم
-۰/۰۰۳۵ ns	دما × زمان
-۰/۰۰۰۷ ns	فعالیت آنزیم × زمان
۰/۰۰۳۳ ns	فعالیت آنزیم × دما

** معنی‌داری در سطح ۱ درصد؛ ns عدم وجود اختلاف معنی‌دار

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. $R^2=0/9417$ بیانگر این است که مدل رگرسیون واکنش را به‌خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۴/۱۷ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 معیاری است برای این که مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است (طاهری و همکاران، ۲۰۱۱) و در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده که به ترتیب ۰/۹۴۱۷ و ۰/۸۸۹۳ به‌دست آمدند، بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده است.

مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که برای $P>0/05$ معنی‌دار نبود. از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود ($P>0/05$) مدل بر اساس مهار رادیکال‌های آزاد DPPH برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد (طاهری، ۲۰۱۱)، بنابراین این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

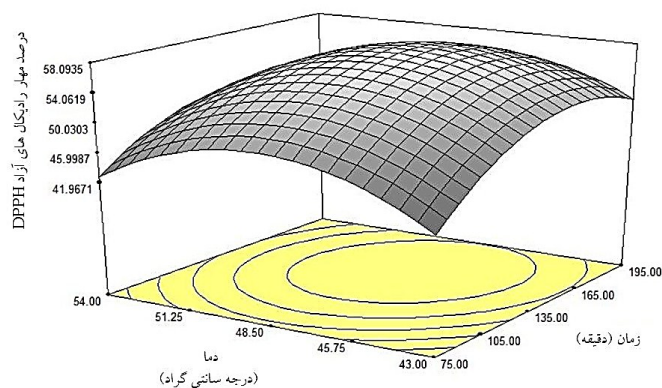
1- Adjusted R-Squared



شکل ۲- نمودار سه بعدی و کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH در فعالیتهای آنزیم و زمانهای مورد آزمایش.

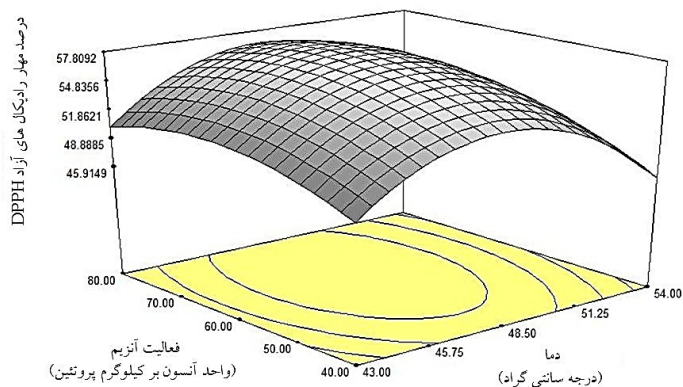
به منظور تعیین شرایط بهینه هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی جهت حصول بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال های آزاد DPPH، نمودارهای سه بعدی سطحی و کانتور^۱ برای متغیرها در شکل های ۳ تا ۵ ترسیم شده است. هر شکل اثرات دو متغیر را روی پاسخ نمایش می دهند، که در هر نمودار متغیر سوم در میزان بهینه اش ثابت نگه داشته شده است. همان طور که در شکل ۲ مشخص است با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی در یک فعالیت آنزیمی ثابت، افزایش یافته و در زمان های نهایی هیدرولیز دست خوش کاهش شده است. مطابق این شکل بالارفتن فعالیت آنزیم در یک زمان ثابت اثر کمتری در تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی داشته است. این شرایط تقریباً مشابه با روند مشاهده شده در پژوهش طاهری بوده که بهینه سازی خواص آنتی اکسیدانی ماهی ساردین رنگین کمان (*Dussumieria acuta*) را در هیدرولیز آنزیمی با آنزیم پروتامکس^۲ انجام داده است (طاهری، ۲۰۱۱). توجه تغییرات فعالیت آنتی اکسیدانی با گذشت زمان در اثر تغییر طول زنجیره های پپتیدی حاصل با افزایش هیدرولیز می باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده اند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتر از خود نشان می دهند (راجاپاکس و همکاران، ۲۰۰۵).

1- Contour plot
2- Protamex



شکل ۳- نمودار سه بعدی و کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH در دماها و زمان های مورد آزمایش.

در شکل ۳ که تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH در دماها و زمان های مورد آزمایش را نشان می دهد، مشخص است که متغیر دما در نواحی میانی خود بیشترین اثر را در مهار رادیکال های آزاد DPPH داشته در حالی که زمان از محدوده بیشتر از ۱۱۰ دقیقه بیشترین اثر را داشته است. تغییر در اندازه، میزان و ساختار آمینواسیدها و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی را تحت تاثیر قرار می دهد (وو و همکاران، ۲۰۰۳).



شکل ۴- نمودار سه بعدی و کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال های آزاد DPPH در فعالیت های آنزیم و دماهای مورد آزمایش.

شکل ۴ که بیانگر تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در فعالیتهای آنزیم و دماهای مورد آزمایش است نیز بیان می‌دارد که دماهای میانی آزمایش بالاترین تاثیر را در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH داشته و این که با بالا رفتن فعالیت آنزیم در یک دمای ثابت تغییرات مهارکنندگی بطئی بوده درحالی که در یک فعالیت آنزیم ثابت با افزایش دمای هیدرولیز ابتدا قدرت مهارکنندگی بالا رفته و سپس از میزان آن کاسته شده است.

بهینه‌سازی و اعتبارسنجی^۱ مدل: شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به‌دست آمدند. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت بهینه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH مطابق با شرایط زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه، دمای ۴۸/۱۱ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۴/۴۳ واحد آنسون بر کیلوگرم به‌دست آمد که با درجه مقبولیت^۲ ۹۰/۸۰ درصد منطبق با ۵۸/۲۲ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش‌بینی شده توسط مدل اجرا گردید (در سه تکرار) که قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در این شرایط ۵۷/۹۳ درصد بود. مقادیر آزمایشی مطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل بود که بیانگر شرایط بهینه جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی از ماهی کاراس می‌باشد.

نتیجه‌گیری

ماهی کاراس یک ماهی با ارزش اقتصادی پایین است که به‌دلیل بو و مزه نامناسب مطلوبیت اندکی دارد. در این مطالعه تولید پروتئین هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهینه از این ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز توسط روش سطح پاسخ صورت پذیرفت. روش سطح پاسخ، به‌عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان می‌دهد که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در فرمولاسیون غذایی و نیز به‌عنوان ترکیب دارویی به کار گرفته شوند. اگرچه لازم است آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی درون زیستی^۳ در این زمینه صورت پذیرد.

- 1- Validation
- 2- Desirability
- 3- In vivo

منابع

- Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40: 1957-1966.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114: 1198-1205.
- Chen, H.M., Muramoto, K. and Yamauchi, F. 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-Conglycinin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 574-578.
- Davalos, A., Miguel, M., Bartolome, B. and Lopez-Fandino, R. 2004. Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. *Journal of Food Protection*, 67: 1939-1944.
- Diniz, F.M. and Martin, A.M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effect of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) muscle. *International Journal of Food Science and Technology*, 31: 419-426.
- Elmadfa, I. and Meyer, A. 2008. Body composition, changing physiological functions and nutrient requirements of the elderly. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 52: 2-5.
- FAO (Food and Agriculture Organization). 2012. Fisheries and Aquaculture Department, Cultured Aquatic Species Information Programme. Available online at: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Carassius_carassius/en.
- Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19-20, 489-498.
- Hernandez-Ledesma, B., Davalos, A., Bartolome, B. and Amigo, L. 2005. Preparation of antioxidant enzymatic hydrolysates from a-lactalbumin and b-actoglobulin. Identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 588-593.
- IFIS (International Food Information Service). 2009. Dictionary of food science and technology. John Wiley and Sons, United Kingdom, Pp: 114-115.
- Khantaphant, S. and Benjakul, S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 151: 410-419.
- Klompong, V., Benjakul, S., Yachai, M., Visessanguan, W., Shahidi, F. and Hayes, K.D. 2009. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*). *Journal of Food Science*, 74: 126-133.
- Li, Y., Jiang B., Zhang, T., Mu, W. and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106:444-450.

- Maria, D.C., Antonella, F., Iolanda, A., Rosa, C.B., Agustin, O.A., and Dolfo, M. R. 2007. In vitro release of angiotensin converting enzyme inhibitors, peroxy-radical scavengers and antibacterial compounds by enzymatic hydrolysis of glycated gluten. *Journal of Cereal Science*, 45: 327-334.
- Meisel, H., and Fitzgerald, R.J. 2003. Biofunctional peptides from milk proteins: mineral binding and cytomodulatory effects. *Current Pharmaceutical Design*, 9: 1289-1295.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124: 1354-1362.
- Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242.
- Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., and Kim, S.K. 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 16: 562-569.
- Rizvi, S.I., Jha, R. and Maurya, P.K. 2006. Erythrocyte plasma membrane redox system in human aging. *Rejuvenation Research*, 9, 470-474.
- Sarmadi, B.H. and Ismail, A. 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, 31, 1949-1956.
- Sumaya-Martínez, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa, S., and Prado-Barragán, L.A. 2005. Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85: 98-104.
- Sun, J., He, H. and Xie, B. 2004. Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 6646-6652.
- Taheri, A. 2011. Antioxidative properties of rainbow sardine (*Dussumieria acuta*) protein hydrolysate; optimization using response surface methodology. *International Food Congress-Novel Approaches in Food Industry, Izmir, Turkey*, Pp: 39-43.
- Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., and Habibi-Rezaei, M. 2011. Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L. *International Journal of Food Engineering*, 7: 1556-3758.
- Wu, H.C., Chen, H.M., and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36: 949-957.

Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by response surface methodology

A.R. Mehregan Nikoo^{*1}, A.R. Sadeghi Mahoonak², M. Ghorbani²,
A.Taheri³ and M. Alami²

¹M.Sc. student, Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ²Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, ³ Assistant Prof., Dept. of Fisheries (Seafood Sciences), Faculty of Marine Science of Chabahar Maritime University

Abstract

The objective of this study was to produce fish protein hydrolysate (FPH) with the most antioxidant activity, by enzymatic hydrolysis from (*Carassius carassius*). The protein of crucian carp a low value fish was hydrolyzed by Alcalase 2.4L and the optimal hydrolysis parameters of strongest antioxidant capacity of peptides were obtained using response surface methodology (RSM) by the central rotatable composite design (CRCD). The combined effects of temperature, time and enzyme activity on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical scavenging capacity of FPH were well fitted to a quadric equation with using Design expert software. The mathematical model presented a plateau region with maximum Antioxidant activity (>58.22%) at the following critical values: temperature = 48.11^oC, time = 151.27 min and enzyme activity = 64.43 Anson unit per kilogram protein. Results indicated that crucian carp protein hydrolysate has the potential to apply as a natural antioxidant in foods ingredient and pharmaceutical applications in the future.

Keywords: Fish Protein Hydrolysate, Antioxidant activity, *Carassius carassius*, Alcalase, Response Surface Methodology

*Corresponding author; alireza.mn@gmail.com