Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوازدهم، شماره 3، پاییز 1396، صفحات 108-99

بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیز شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی از امعاء و احشاء ماهی تن زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم پروتامکس

سمانه پزشک[1]، سید مهدی اجاق[2]، مسعود رضایی[3]، بهاره شعبانپور[4]

1- دانشجوی دکترای فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران
پست الکترونیکی: mahdi_ojagh@yahoo.com

3- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، گلستان، ایران

4- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گلستان، ایران

تاریخ دریافت: 95/3/15 تاریخ پذیرش: 95/7/5

چکیده

سابقه و هدف: پپتیدهای زیست فعال موجود در پروتئین هیدرولیز شده منجر به فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی در این پروتئین‌ها شده است. ضایعات غذایی، به عنوان یک ماده بالقوه برای تولید پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌شود. هدف از این مطالعه، تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء تن زردباله در شرایط بهینه با بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بعد از تهیه امعاء و احشاء تن زردباله بهینه‌سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده با تاکید بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن با استفاده از روش سطح پاسخ بر پایه طرح مرکب مرکزی انجام گرفت. جهت بهینه‌سازی چهار فاکتور pH، درجه حرارت، زمان واکنش و نسبت آنزیم به سوبسترا به کار گرفته شدند. طول زنجیره پپتیدی و خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد و آزمون قدرت احیاءکنندگی اندازه‌گیری شدند.

یافته‌ها: تأثیر هر یک از متغیرهای pH، درجه حرارت، زمان واکنش و نسبت آنزیم به سوبسترا بر میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی و طول زنجیره پپتیدی معنی‌دار بود ($p<0/05$). با این وجود هیچ ارتباط مستقیمی بین این دو پارامتر وجود نداشت. بالا بودن ضریب همبستگی 0/982 (خاصیت آنتی‌اکسیدانی) و 0/967 (طول زنجیره پپتیدی) حاکی از توانایی خوب مدل در پیش بینی شرایط واکنش بود. با توجه به نتایج، تیمار بهینه دارای فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH 81/43، قدرت کاهندگی آهن 0/1 و طول زنجیره پپتیدی 2/98 است (ران 10).

نتیجه‌گیری: در ارتباط با پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنچه که مهم‌ترین نقش را ایفا می‌کند ویژگی‌های ذاتی پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد

واژگان کلیدی: روش پاسخ سطحی، تن زردباله، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، پروتامکس

• مقدمه

در سال‌های اخیر تحقیقات بر روی آنتی‌اکسیدان‌ها علاقه زیادی را در بسیاری از مناطق دنیا به خود جلب کرده است. آنتی‌اکسیدان‌ها جهت جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو به واسطه رادیکال‌های آزاد تولید شده توسط اکسیداسیون و انواع اکسیژن یا نیتروژن فعال و همچنین برای جلوگیری از وقوع انواع اختلالات سلامتی از جمله فرآیندهای پیری، سرطان، دیابت، التهاب و اختلالات عصبی مانند بیماری آلزایمر شناخته شده است (1). اگرچه ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به طور عمده در میوه‌ها و سبزیجات وجود دارند، با این وجود پروتئین هیدرولیز شده مواد غذایی مانند کازئین شیر، پروتئین سویا، پروتئین زرده تخم مرغ و پروتئین محصولات دریایی نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داده‌اند (2). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به طور عمده به دلیل پپتیدهای زیست فعال موجود در آن می‌باشد که ترکیب اسیدهای آمینه یک فاکتور بسیار مهم در عملکرد این پپتیدها محسوب می‌شود. اثر آنزیم نیز در خصوصیات کاربردی پپتید مهم است زیرا تأثیر زیادی بر روی اندازه مولکول‌ها و آبگریزی

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

هیدرولیز شده‌ها دارد، بنابراین پپتیدهای به دست آمده پروفایل مولکولی و سطح انرژی متفاوت دارند (3).

ضایعات غذایی و به طور خاص ضایعات ماهی، به عنوان یک ماده بالقوه برای تولید پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌شود. پپتیدهای زیست فعال توالی‌های کوتاهی، به طول در حدود 2 - 20 اسیدهای آمینه دارند که در داخل بدن موجود زنده مزایای فیزیولوژیک اعمال می‌کنند. آنها در توالی پروتئین منشا غیر فعال هستند و ممکن است با هیدرولیز پروتئولیتیک با استفاده آنزیم‌های تجاری موجود و یا میکروارگانیسم‌های پروتئولیتیک و روش‌های تخمیر آزاد شوند. پس از هضم، پپتیدهای فعال زیستی می‌تواند در روده جذب و به طور مستقیم وارد جریان خون شوند و اثر فیزیولوژیکی خود را در نقاط مورد نظر اعمال کنند (4).

همان طور که اشاره شد پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ماهی و ضایعات آن، از جمله بهترین منابع برای تولید پپتیدهای زیست فعال هستند. از طرفی هیدرولیز آنزیمی می‌تواند یک روش مؤثر برای تولید پروتئین هیدرولیز شده و استفاده از مواد مغذی این ضایعات باشد. تحقیقات نشان داده است که آنزیم‌های با منشاء میکروبی (آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز) نسبت به آنزیم‌های با منشاء گیاهی (پاپاین) و جانوری (تریپسین و کموتریپسین)، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به پایداری بیشتر در حرارت و pH های بالا و خصوصیات مناسب پروتئولتیکی اشاره نمود (5). افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (مثل کنترل دما، pH، مدت زمان واکنش و ...) می‌تواند زمینه را برای تولید پپتیدهای با خواص زیست فعال متفاوت فراهم کند و آنچه از اهمیت برخوردار است این است که آنزیم‌هائی که بدین منظور استفاده می‌شوند می‌بایست از باکتری‌های غیربیماری‌زا استخراج گردند (6). پروتامکس یک پروتئاز تهیه شده از باکتری *Bacillus subtilis* می‌باشد که به دلیل تولید پروتئین با درجه هیدرولیز بالا در زمان کوتاه و با تلخی کمتر نسبت به آنزیم‌های دیگر، به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرد (7).

ماهی تن یکی از اقتصادی‌ترین و مهم‌ترین گونه‌های ماهی آب‌های جنوب کشور است. در بحث فرآوری غذاهای دریایی تلاش بر آن است تا از مواد خام جهت تولید محصول هدف حداکثر بهره‌برداری صورت گیرد با این حال تولید مقدار قابل توجهی دورریز ضایعات به عنوان محصولات کم ارزش همانند سر ماهی تن، احشاء و دم اجتناب‌ناپذیر می‌باشد (8). یکی از مهم‌ترین گونه های تن ماهیان، ماهی تن زردباله (*Thunnus albacares*) می‌باشد که بر اساس آمار رسمی ، از 200 هزار تن صید تن ماهیان در سال، رقمی معادل 41 هزار تن را به خود اختصاص داده است (سازمان شیلات ایران، 1385). این میزان نسبتاً بالای صید و در کنار آن، صنایع عمل‌آوری، می تواند میزان زیادی از ضایعات را به دنبال داشته باشد (9). لذا با توجه به مطالب ارائه شده در تحقیق حاضر تأثیر شرایط مختلف هیدرولیز بر اندازه پپتید و خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء تن زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم پروتامکس مورد بررسی قرار گرفت.

• مواد و روش‌ها

مواد: امعاء و احشاء ماهی تن زردباله به عنوان ماده خام اولیه، از کارخانه تولید کنسرو ماهی تن در بابلسر تهیه و به صورت منجمد به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور، ایران) انتقال داده شدند. نمونه‌ها در چرخ گوشت کاملا خرد و مخلوط شدند و تا زمان مصرف در دمای 20- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنزیم پروتامکس استخراج شده از باکتری *Bacillus* sp با فعالیت آنزیمی 1/5 واحد آنسون بر گرم از نمایندگی شرکت نووزایم (دانمارک) در ایران تهیه و تا زمان آزمایش در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تولید پروتئین هیدرولیز شده: برای انجام آزمایش نمونه‌ها در دمای 4 درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی شدند و سپس در اندازه‌های 50 گرمی در ارلن‌های 250 میلی‌لیتری به نسبت 1 به 2 با آب مقطر مخلوط شدند. مخلوط تهیه شده توسط دستگاه هموژنایزر (IKA t25, German) به مدت 2 دقیقه در دمای معین همگن و سپس به منظور غیرفعال کردن آنزیم‌های داخلی در دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه در حمام آبی قرار داده شد. هیدرولیز پروتئینی جهت بهینه‌سازی توسط آنزیم پروتامکس در شرایط ذکر شده در جدول 1 انجام گرفت.

جدول 1. فاکتورهای مستقل و سطوح مورد استفاده برای بهینه سازی شرایط هیدرولیز با آنزیم پروتامکس

فاکتور	سطوح آزمایش	کد
دما	35، 45، 60 (درجه سانتی‌گراد)	1-، 0، 1+
زمان	1، 2، 3 (ساعت)	1-، 0، 1+
pH	5، 7، 9	1-، 0، 1+
نسبت آنزیم به سوبسترا (%)	1، 2، 3	1-، 0، 1+

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

با استفاده از سود 2 نرمال و اسید استیک pH مورد نظر تنظیم و هیدرولیز در دستگاه انکوباتور شیکردار (COMECTA, Spain) با دور rpm 150 انجام شد. در پایان فرآیند آنزیمی نمونه هیدرولیز شده جهت غیر فعال شدن آنزیم پروتامکس در حمام آبی 90 درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه قرار داده شدند.

آزمایشات بهینه سازی: بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز با استفاده از روش سطح پاسخ RSM (Response surface methodology) بر پایه طرح مرکب مرکزی CCD (Central composite design) انجام شد. چهار فاکتور pH، درجه حرارت، زمان واکنش و نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) در سه سطح مساوی (1+ و 0 و 1-) به کار گرفته شدند (جدول 2). pH با استفاده از سود 2 نرمال و اسید استیک تنظیم و هیدرولیز در دستگاه انکوباتور شیکردار با rpm 150 انجام شد. در پایان فرآیند نمونه‌های هیدرولیز شده جهت غیر فعالسازی آنزیم پروتامکس به مدت 15 دقیقه در حمام آبی 90 درجه سانتی‌گراد حرارت داده شدند. پس از سرد شدن نمونه‌ها در دمای محیط، به مدت 20 دقیقه و در دمای 10 درجه سانتی‌گراد و با دور g 6000 به منظور جمع آوری سوپرناتنت، سانتریفیوژ شدند (2).

جدول 2. طرح آزمایش و سطوح کدبندی شده متغیرهای مستقل، اندازه پپتید و میزان خواص آنتی‌اکسیدانی

run	Coded levels of variable				Response		
	X_1	X_2	X_3	X_4	PCL	DPPH	FRAP
1	1	1	1	1-	1/99	34/6	0/09
2	0	0	2	0	2/61	42/91	0/07
3	1-	1	1-	1	1/72	40/93	0/09
4	0	0	0	0	2/11	51/12	0/1
5	1	1-	1-	1-	2/02	27/48	0/08
6	0	0	0	2-	2/55	51/07	0/1
7	1	1	1-	1-	2/6	39/86	0/05
8	0	2-	0	0	2/24	42/1	0/09
9	0	0	0	0	2/25	44/29	0/08
10	-1	-1	1	-1	2/98	81/43	0/1
11	-1	-1	-1	-1	2/83	76/94	0/08
12	-1	1	-1	-1	1/76	39/61	0/08
13	-1	1-	1	1	2/72	54/28	0/07
14	0	0	2-	0	2/4	51/16	0/08
15	1	-1	1	1	2/96	61/84	0/09
16	-1	1	1	1	1/76	39/18	0/08
17	-1	1	1	-1	2/07	47/07	0/08
18	1	-1	1	-1	2/86	51/26	0/08
19	0	0	0	0	2/06	51/07	0/07
20	0	0	0	2	2/68	60/52	0/08
21	2	0	0	0	2/19	10/33	0/2
22	0	2	0	0	1/53	37/28	0/05
23	0	0	0	0	2/09	49/41	0/08
24	1	1	1	1	2/1	44/39	0/09
25	1	1	-1	1	1/84	31/33	0/1
26	-1	-1	-1	1	2/85	82/3	0/07
27	1	-1	-1	1	2/41	38/2	0/08
28	2-	0	0	0	2/89	55/5	0/15

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

اندازه‌گیری طول زنجیره پپتید: طول تقریبی پپتید PCL (Peptide chain length) به روش Kristinsson و Rasco (10) اندازه‌گیری شد. در این روش مطابق رابطه زیر از درجه هیدرولیز جهت محاسبه طول تقریبی زنجیره پپتید استفاده گردید. در این رابطه درجه هیدرولیز (DH) بر حسب درصد به کار برده شده است.

$$PCL = \frac{100}{DH}$$ (رابطه 1)

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز مطابق روش Hoyle وMerritt (11) انجام شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرو استیک اسید (TCA) 10 درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد.

(رابطه 2)

$$DH = \frac{\text{پروتئین حل شده در محلول 10 درصد از } TCA}{\text{کل پروتئین‌های نمونه}}$$

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH : بدین منظور DPPH 0/16 مولار با استفاده از متانول تهیه شد و سپس 500 میکرولیتر از هر نمونه با 500 میکرولیتر از DPPH مخلوط و در دمای اتاق در تاریکی گذاشته شد. نمونه-ی کنترل نیز به همان طریق تهیه شد؛ با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. بعد از 30 دقیقه از هر نمونه در خانه‌های پلیت 96 خانه ریخته شد و در طول موج 517 نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوانده شد (12). فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به رابطه زیر محاسبه شد.

(رابطه 3)

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

آزمون قدرت کاهندگی آهن FRAP: جهت اندازه‌گیری قدرت کاهندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده، ابتدا 100 میکرولیتر نمونه محلول هر کدام از نمونه‌ها را با 250 میکرولیتر بافرفسفات 0/2 مولار (pH= 6/6) و 250 میکرولیتر فری سیانید پتاسیم 1 درصد مخلوط شد. مخلوط به مدت 30 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس 250 میکرولیتر تری استیک اسید (10%) به آن اضافه گردید. مخلوط با دور g 1650 به مدت 10 دقیقه به منظور برداشتن 250 میکرولیتر از سوپرناتانت سانتریفیوژ شد و با 250 میکرولیتر آب مقطر و 50 میکرولیتر کلراید آهن 0/1 درصد (در جای تاریک) مخلوط گشت. مخلوط به دست آمده به مدت 10 دقیقه جهت ایجاد رنگ نگهداری شد و سپس از هر نمونه در خانه‌های پلیت 96 خانه ریخته شد و در طول موج 700 نانومتر به وسیله دستگاه الایزا خوانده شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، بیانگر افزایش قدرت احیاکنندگی آن می‌باشد (13).

تجزیه و تحلیل آماری : مهم‌ترین مسئله این تحقیق بررسی آثار اصلی و متقابل فاکتورها بود، از این رو طرح آماری سطح پاسخ انتخاب شد در این مطالعه اثر متغیرهای مستقل شامل : pH ($_1X$)، دما ($_2X$)، زمان ($_3X$) و نسبت آنزیمی ($_4X$) به عنوان متغیرهای مستقل در سه سطح (1+، 0، 1-) مورد آزمایش قرار گرفت (جدول 1). مدل مورد استفاده در روش سطح پاسخ عموما رابطه ی درجه دوم می‌باشد. در روش سطح پاسخ برای هر متغیر وابسته مدلی تعریف می‌شود که آثار اصلی و متقابل فاکتورها را بر روی هر متغیر جداگانه بیان می-نماید ، مدل چند متغیره به صورت معادله زیر می‌باشد.

(رابطه 4)

$$Y=b_0+\Sigma b_i x_i + \Sigma b_{ii} x_i^2 + \Sigma b_{ij} x_i x_j + \varepsilon$$

در معادله مذکور، Y پاسخ پیش بینی شده، b_0 ضریب ثابت، b_i ، b_{ii} و b_{ij} ضرایب برآورد شده توسط مدل می‌باشد. x_i و x_j سطحی از متغیرهای مستقل می‌باشند که نشان دهنده اثرات خطی، درجه دوم و متقابل X_1، X_2، X_3، وX_4 بر پاسخ هستند.

در این تحقیق از طرح کامپوزیت مرکزی با پنج متغیر مستقل شامل pH، دما، زمان و نسبت آنزیمی در سه سطح و 4 تکرار در نقطه مرکزی طرح (برای محاسبه تکرار پذیری فرآیند) جهت بررسی تأثیر شرایط بر پاسخ‌ها و بهینه‌سازی فرآیندهای مذکور استفاده شد (جدول 2) (14).

• یافته‌ها

مدل‌سازی اثر آنزیم پرتامکس بر خواص آنتی‌اکسیدانی و اندازه پپتید : مقادیر درصد خاصیت آنتی‌اکسیدانی در ترکیب‌های متفاوتی از متغیرهای مستقل در جدول 2 آورده شده است. جدول 3 آنالیز واریانس اثر ساده متغیرها را نشان می‌دهد.

جدول 3. آنالیز واریانس اثر متغیرها بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و اندازه پپتید

	میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی		اندازه پپتید	
	ضریب رگرسیونی	عدد p	ضریب رگرسیونی	عدد p
Lack of fitness		0/0551		0/3609
R-Squared	0/9825		0/9677	
Adj R-Squared	0/9740		0/9353	
Pred R-Squared	0/9558		0/8143	

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

معادله رگرسیونی مربوط به میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (A) و اندازه پپتید با توجه به رابطه (4) به صورت زیر برازش شد:

(رابطه 5)

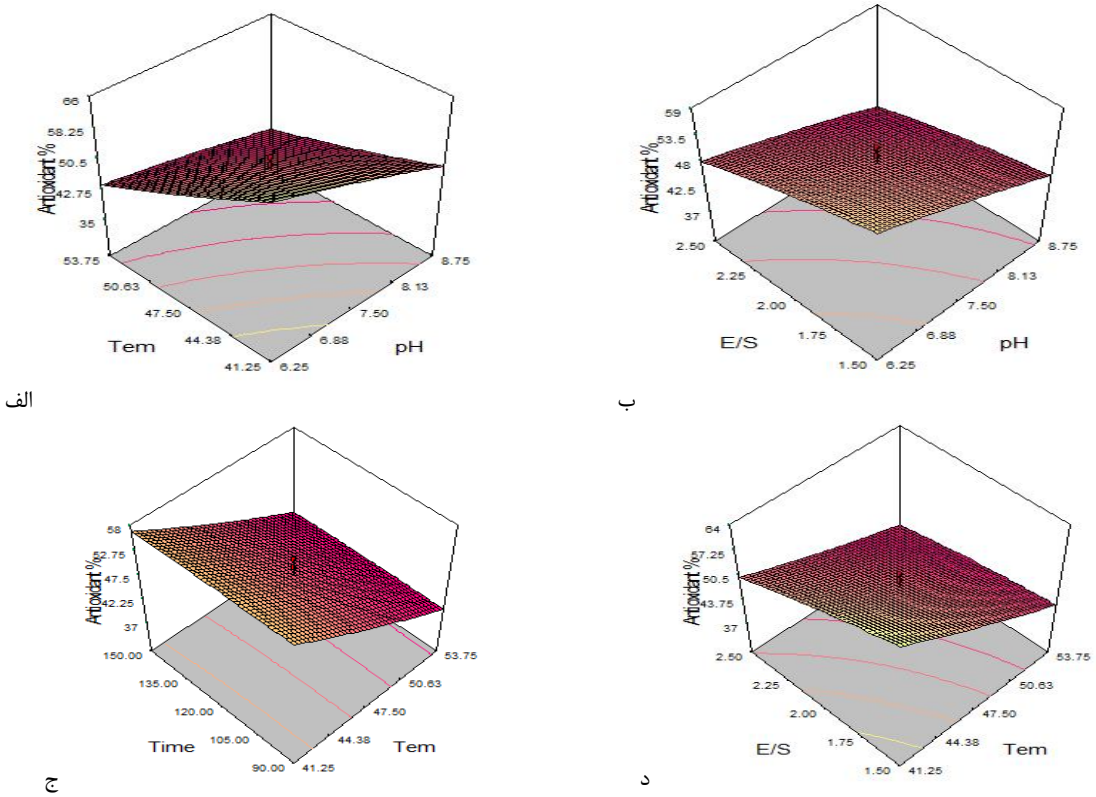
$$Y_{(\text{فعالیت آنتی‌اکسیدانی})} = 24/53 - 3/05X_1 - 4/23X_2 - 0/095X_3 - 2/26X_4 - 23/92A + 1/99X_1X_2 + 0/8X_1X_4 + 3/06X_1A + 0/22X_2X_3 + 1/95X_2X_4 + 4/23X_2A + 2/26X_4A - 0/4X_1^2 + 0/49X_2^2 - 0/17X_3^2 - 0/52X_4^2$$

(رابطه 6)

$$Y_{(\text{طول زنجیره پپتید})} = 2/13 - 0/11X_1 - 0/44X_2 + 0/17X_3 + 0/038X_4 + 0/061\ X_1X_2 + 0/13X_1X_3 + 0/11X_1X_4 - 0/08X_3X_4 + 0/11X_1^2 - 0/18X_2^2 + 0/05X_3^2 + 0/13X_4^2$$

ضریب همبستگی (r^2) مدل آنتی‌اکسیدانی با ارزش بسیار بالایی به دست آمد (0/982). همچنین شاخص عدم تطبیق مدل با داده‌های آزمایشی برای این مدل معنی‌دار نشد ($p<0/05$).

اثر متقابل متغیرهای مستقل، بر درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شکل (1) ارائه شده است. شکل (1- الف) نشان می‌دهد که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در pH پایین‌تر (7/5-6/25) و در درجه حرارت پایین‌تر (41-47) در مقدار ثابت نسبت آنزیمی 2% و زمان 120 دقیقه (نقطه مرکزی) افزایش می‌یابد. شکل (1- ب) اثر متقابل pH و نسبت آنزیمی را برروی میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان می‌دهد. با توجه به شکل برای افزایش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ثابت و مرکزی 47/5 درجه سانتی‌گراد و زمان ثابت و مرکزی 120 دقیقه، با کاهش pH بایستی میزان آنزیم را تا حدودی (1/5%-2%) کاهش داد. اثر متقابل دما و زمان را بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در شکل (1-ج) ارائه شده است (pH در نقطه 7/5 و نسبت آنزیمی 2% ثابت و مرکزی در نظر گرفته شده است). با توجه به شکل با افزایش درجه حرارت بیشتر از 47 درجه سانتی‌گراد از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کاسته می‌شود، این در حالی است که با افزایش زمان فرآیند هیدرولیز بر میزان این خاصیت افزوده می‌شود به طوری که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه در زمان 150 دقیقه مشاهده گردید. در شکل (1-د) اثر متقابل درجه حرارت و نسبت آنزیمی نشان داده شده است. در نقطه مرکزی و ثابت 120 دقیقه و pH 7/5 در درجه حرارت (41-44) و نسبت آنزیمی (1/5%-2%) بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ارزیابی شد.



الف ب ج د

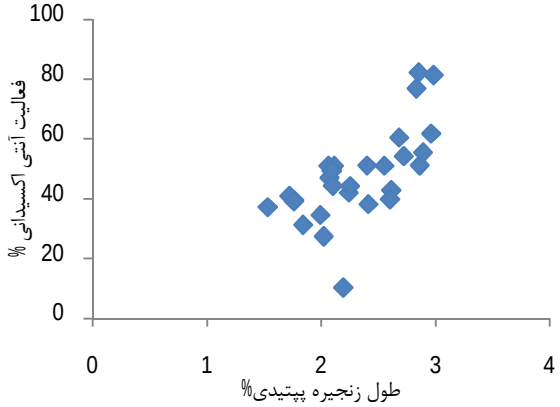
شکل 1. اثر متقابل متغیرهای مستقل بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی (%)، الف: اثر متقابل دما (سانتی‌گراد) و pH، ب: اثر متقابل نسبت آنزیمی (E/S) (حجمی/وزنی) و pH، ج: اثر متقابل دما (سانتی‌گراد) و زمان واکنش (دقیقه)، د: اثر متقابل دما (سانتی‌گراد) و نسبت آنزیمی (E/S) (حجمی/وزنی)

www.SID.ir

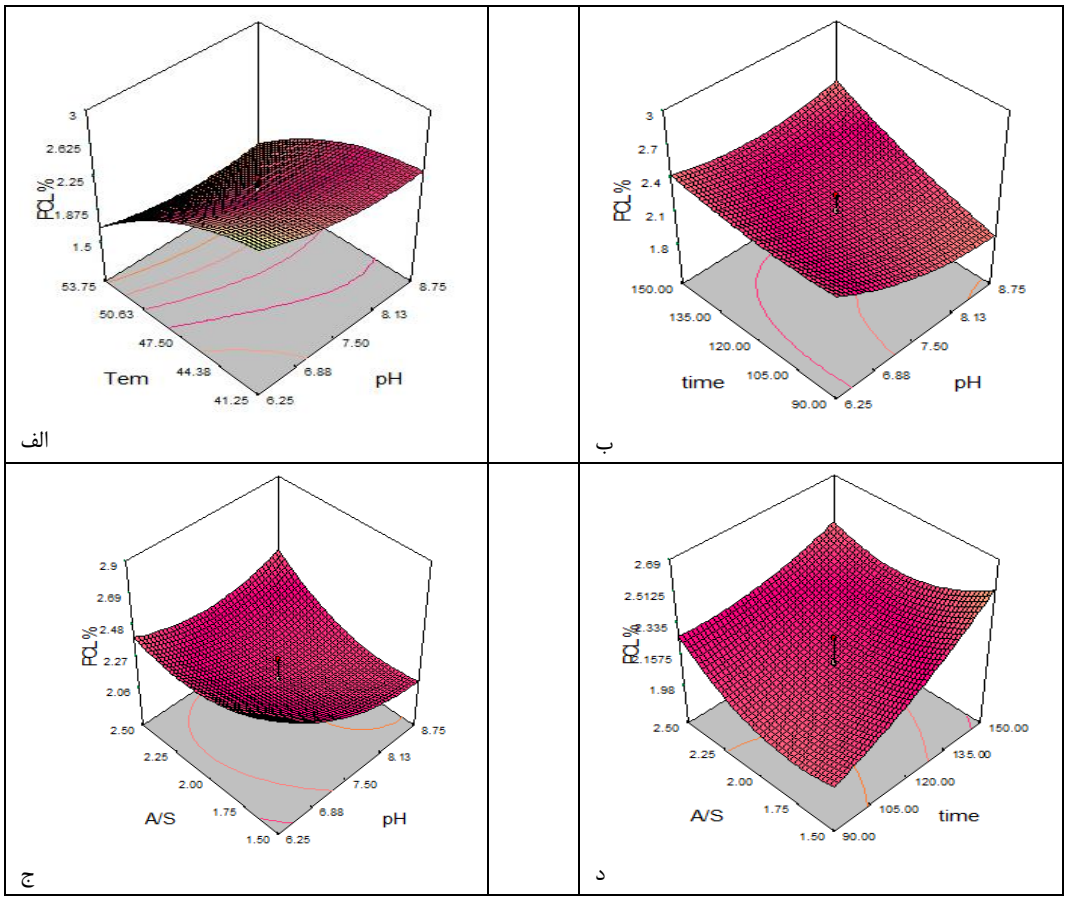
Archive of SID

شکل (2) اثر متقابل متغیرهای مستقل را بر درصد اندازه پپتید نشان می‌دهد. شکل (2- الف) اثر متقابل دما و pH را نشان می‌دهد (زمان در نقطه‌ی 120 و نسبت آنزیمی در نقطه 2% ثابت و مرکزی، در نظر گرفته شد). با توجه به شکل با افزایش درجه حرارت از 50/6 تا 53/75 درجه سانتی‌گراد طول زنجیره پپتید کاهش بیشتری یافته است در حالی که تغییرات pH تأثیر محسوسی را بر طول زنجیره پپتید نشان نمی‌دهد. اثر متقابل زمان و pH بر طول زنجیره پپتیدی در شکل 2-ب نشان داده شده است (دما در نقطه‌ی 47/5 و نسبت آنزیمی در نقطه 2% ثابت و مرکزی، در نظر گرفته شد). با توجه به شکل طول زنجیره پپتیدی با افزایش زمان کاهش می‌یابد در حالی که تأثیر مقدار pH روی این پارامتر مشاهده نشد. شکل‌های 2-ج و 2-د اثرات متقابل pH و نسبت آنزیمی، زمان نسبت آنزیمی را بر طول زنجیره پپتید نشان می‌دهد. شکل‌ها نشان می‌دهند در نسبت آنزیمی حول 2% طول زنجیره پپتید کمتر می‌باشد. تأثیر pH بر روی این پارامتر محسوس نمی‌باشد، درحالی که در تقابل بین نسبت آنزیمی و زمان، طول زنجیره پپتید با افزایش زمان کاهش می‌یابد.

شکل 3 رابطه بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و طول زنجیره پپتیدی را ارائه می‌دهد. در واقع بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به طول زنجیره پپتیدی 2/6-3% است، درحالی که کمترین طول زنجیره پپتیدی دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمتر از 40% می‌باشد.



شکل 3. ارتباط بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و طول زنجیره پپتیدی



شکل 2. اثر متقابل متغیرهای مستقل بر اندازه پپتید (%)، الف: اثر متقابل دما (سانتی‌گراد) و pH، ب: اثر متقابل زمان (دقیقه) و pH، ج: اثر متقابل نسبت آنزیمی (E/S) (حجمی/وزنی) و pH ، د: اثر متقابل زمان (دقیقه) و نسبت آنزیمی (E/S) (حجمی/وزنی)

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

• بحث

رابطه 5 و 6 نشان دهنده این است که تأثیر هر یک از متغیرها بر میزان پاسخ ها معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$). این رابطه‌ها بیانگر این هستند که رابطه بین خواص آنتی‌اکسیدانی و طول زنجیره پپتید با پارامترهای هیدرولیز از نوع درجه دوم می‌باشد. با توجه به جدول 3 بالا بودن ضریب همبستگی 0/982 (خاصیت آنتی‌اکسیدانی) و 0/967 (طول زنجیره پپتیدی) حاکی از توانایی خوب مدل در پیش بینی شرایط واکنش می‌باشد.

نتایج به دست آمده (شکل 1) نشان دهنده آن است که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز تا زمان 150 دقیقه بالاتر رفته و با ادامه افزایش زمان از میزان آن کاسته شد. کاهش میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش زمان هیدرولیز می‌تواند ناشی از پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده پروتئینی باشد که در واقع باعث شکستن زنجیره برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی تشکیل شده در مراحل اولیه هیدرولیز و کاهش آنها می‌گردد (15). تغییر در اندازه، تعداد و ساختار اسیدآمینه ها و پپتیدها در طول زمان هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار می‌دهد (16). با کاهش میزان pH و درجه حرارت در مقدار متوسطی از میزان نسبت آنزیمی (1/5%) مقدار فعالیت آنتی‌اکسیدانی روند افزایشی را نشان داد. نتایج Chabeaud و همکاران (2) نیز نشان داد که شرایط هیدرولیز (pH و درجه حرارت) تأثیر مستقیم بر میزان فعالیت آنزیم و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی می‌گذارد. شرایط بهینه جهت دستیابی به بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی دمای 41/25 درجه سانتی‌گراد، pH 6/25، زمان 150 دقیقه و نسبت آنزیمی 1/5% به دست آمد.

با توجه به نتایج ارائه شده (شکل 2) اندازه پپتید تحت تأثیر سه فاکتور درجه حرارت، زمان و نسبت آنزیمی قرار دارد درحالی که تأثیر فاکتور pH قابل اغماض می‌باشد. معتمدزادگان و همکاران (17) نشان دادند که طول تقریبی زنجیره پپتیدی حاصل از هیدرولیز کیلکا تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می‌باشد. میزان شکسته شدن زنجیره پپتیدی، به میزان و شدت هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئینی که هیدرولیز می‌شود بستگی دارد (18). طول زنجیره پپتیدی فاکتوری است که با کنترل آن می توان از هیدرولیز شدید پروتئین جلوگیری کرد، به دلیل این که افزایش شدت هیدرولیز منجر به ایجاد پپتیدهای بسیار محلول با خواص کارکردی کم می‌گردد (10). در مطالعه حاضر طول زنجیره پپتیدی کمتر با افزایش زمان و دمای هیدرولیز به ترتیب تا 120 دقیقه و 60 درجه سانتی‌گراد و در نسبت آنزیمی متوسط حاصل گردید که در واقع افزایش زمان هیدرولیز (تا180 دقیقه) منجر به افزایش غلظت زیاد پپتیدهای تولید شده گردیده و باعث کاهش سرعت هیدرولیز شده و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می‌دهد (19).

نتایج شکل 3 نشان دهنده این موضوع است که هیچ ارتباط مستقیمی بین دو پارامتر طول زنجیره پپتیدی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی وجود ندارد و این نشان دهنده آن است که طول زنجیره پپتیدی نمی‌تواند به عنوان معیار اصلی جهت تولید پروتئین هیدرولیزه شده‌ای با خواص آنتی‌اکسیدانی باشد. در واقع ویژگی‌های ذاتی پپتیدها نیز در بیان خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نقش مهمی را ایفا می‌کنند. Rajapakse و همکاران (20) در مطالعه بر پروتئین هیدرولیز شده عضله ماهی مرکب عنوان کردند که دلیل عمده خاصیت آنتی‌اکسیدانی این ماده مربوط به حضور پپتیدها و اسیدهای آمینه آبگریز و کاتیونی است. علاوه بر این، به نظر می‌رسد ترکیب و توالی اسید آمینه، با توجه به منبع پروتئینی و آنزیمی نقش اساسی را در این موضوع به عهده دارند (23-21). با توجه به نتایج آورده شده، ران 10 به عنوان تیمار بهینه که به طور نسبتی دارای بالاترین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH 81/43 و همچنین بالاترین قدرت کاهندگی 0/1 با طول زنجیره پپتیدی 2/98 شناخته شد.

نتیجه گیری

مهم‌ترین هدف از تولید پروتئین هیدرولیز شده، استفاده بهینه از بخش پروتئینی مواد غذایی، افزایش جذب و هضم این ترکیبات از طریق کاهش اندازه آنها و افزایش ارزش غذایی و خواص زیستی آنها می‌باشد. مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تن زردباله یک مهار کننده قوی اکسیداسیون می‌باشد و در شرایط مختلف هیدرولیز تحت تأثیر فاکتورهای زمان، دما، pH و نسبت آنزیمی پروتئین های هیدرولیز شده‌ای دارای سطوح متفاوتی از خواص آنتی‌اکسیدانی تولید می‌گردد. در ارتباط با پارامتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مهم‌تر از طول زنجیره پپتیدی آنچه که نقش اصلی را ایفا می‌کند ترکیب و توالی اسید آمینه زنجیره پپتیدی می‌باشد.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

References

1. Zhong S, Maa C, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry . Food Chem. 2011; 126: 1636-1342.

2. Chabeaud A, Dutournié P, Guérard F, Vandanjon L, Bourseau P. Application of Response Surface Methodology to Optimise the Antioxidant Activity of a Saithe (*Pollachius virens*) Hydrolysate. Mar Biotechnol. 2009; 11: 445-455.

3. Wiriyaphan C, Chitsomboon B, Yongsawadigul J. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chem. 2012; 132: 104- 111.

4. Vercruysse L, Van Camp J, Smagghie G. ACE inhibitory peptides derivedfrom enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. J Agric Food Chem. 2005; 53: 8106–8115.

5.-Diniz AM, Martin AM. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. Int J Food Sci Nutr. 1997; 48: 191– 200.

6. Bhaskar N, Sudeepa ES, Rashmi HN, Tamilselvi A. Partial purification and characterization of protease of Bacillus proteolyticus CFR3001 isolated from fish processing waste and its antibacterial activities. Bioresource Technol. 2007; 98(14): 2758-2764.

7. Dumay J, Allery M, Donnay-Moreno C, Barnathan G, Jaouen P, Carbonneau ME, Berge JP. Optimization of hydrolysis of sardine (*Sardina pilchardus*) heads with Protamex: enhancement of lipid and phospholipid extraction. 2009; 89: 1599 –1606.

8. Nguyen HTM, Sylla KSB, Randriamahatody Z, Donnay-Moreno C, Moreau J, Tran LT, Berge JP. Enzymatic Hydrolysis of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) By-Products Using Protamex Protease. Food Technol Biotechnol. 2011; 49: 48-55.

9. Ovissipour M, Abedian Kenari A, Motamedzadegan A, Nazari RM. Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). Food Bioprocess Technol. 2012; 5: 696–705.

10. Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Crc Cr Rev Food Sci. 2000; 40: 43–81.

11. Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). J Food Sci. 1994; 59: 76-79.

12. Morales FJ, Jimenez-Perez J. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescense. Food Chem. 2001; 72: 119–125.

13. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus extracts. J Agric Food Chem. 2001; 49: 4083–4089.

14. Kargozari M, Moini S, Emam Djomeh Z. Prediction of some physical properties of osmodehydratied carrot cubes using response surface methodology. J Food Process Pres. 2010; 34: 1041- 1063.

15. Mehrgan Niko AR, Sadeghi Mahonak AR, Ghorbani M, Taheri A, Alami M, Kamali F. Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius*). Iranian J Res Innov Food Sci Technol. 2012; 2(4): 351-365[in Persian].

16. Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Res Int. 2003; 36: 949-957.

17. Motamedzadegan A, Mortazavi A, Pour Azarang H, Hamzeh N, Shahidi Yasaghi A, Ghorbani Hasansaraei A, et al. Papain effect on the degree of hydrolysis and peptide chain length myofibrillar proteins of kilka (*Clupeonellu grimmi*). Iranian J Agr Sci Nat Resour.2008; 16(3): 20-39[in Persian].

18. Shokrpour Roodbari R, Motamedzadegan A, Hosseiniparvar SH, Ovissipour MR. The effect of neutrase on degree of hydrolysis, nitrogen recovery and peptide chain length of white cheek shark meat protein hydrolysate. Iranian J Food Res. 2012; 32(22): 351-364[in Persian].

19. Pasdar N, Motamedzadegan A, safari R. The effect of hydrolysis conditions on molecular size and grade protein hydrolysate of Yellowfin tuna (*Thunus albacara*) head with Alcalase. J Food Sci Technol Innov. 2012; 5(1): 55-62[in Persian].

20. Rajapakse N, Mendis E, Byun HG, Kim SK. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. J Nutr Biochem. 2005; 16: 562–569.

www.SID.ir

Archive of SID

21. Wu HC, Chen HM, Shiau SY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber australasicus*). Food Res Int. 2003; 36: 949–957.

22. Morales-Medina R, Tamm F, Guadix AM, Guadix EM, Drusch S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (*S. pilchardus*) and horse mackerel (*T. mediterraneus*) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. Food Chem. 2016; 194: 1208-1216.

23. Godinho I, Pires C, Pedro S, Teixeira B, Mendes R, Nunes ML, Batista I. Antioxidant Properties of Fish Protein Hydrolysates Prepared from Cod Protein Hydrolysate by *Bacillus sp.* Appl Biochem Biotechnol. 2016; 178(6): 1095-1112.

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

www.SID.ir

Archive of SID

Optimization of Protein Hydrolysates with Antioxidant Activity of Viscera Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) with the Protamex Enzyme

Pezeshk S[1], Ojagh SM[2], Rezaei M[3], Shabanpour B[4]*

1- PhD Student, Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and the Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

*2-*Corresponding author: Assistant Professor, Dept. of Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and the Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: mahdi_ojagh@yahoo.com*

3- *Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Marin Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran*

4. *Prof., Dept. of Fisheries, Faculty of Fisheries and the Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran*

Received 4 Jun, 2016 **Accepted 26 Sept, 2016**

Background and Objectives: Bioactive peptides in the protein hydrolysate lead to high antioxidant activity of these proteins. Food waste can be used as a potential material for the production of bioactive peptides. The aim of this study was to produce protein hydrolysate of yellowfin tuna viscera in optimal conditions and analyze its antioxidant activity.

Materials & Methods: After performing the preparation of viscera yellowfin tuna to optimize the production of protein hydrolysates with an emphasis on the antioxidant properties using response surface method based on central composite design. Four factors (pH, temperature, reaction time and enzyme to substrate ratio) were used for optimization. Peptide chain length and antioxidant properties (measured by free radical scavenging activity and reducing power assay test) of hydrolyzed protein were measured.

Results: The impact of each variable (pH, temperature, reaction time and ratio of enzyme to substrate) on the amount of antioxidant properties and peptide chain length was significant (p <0/05). However, there was no direct correlation between the two parameters. The high correlation coefficient 982.0 (antioxidant properties) and 967.0 (peptide chain length) showed a good ability to be a model to predict reaction conditions. According to the results, the optimum treatment for free radical scavenging activity DPPH was 43.81 (µmol Trolox equivalents TE/g), FRAP 1.0 (Absorbance at 700 nm) and peptide chain length was 98.2 (Run 10).

Conclusion: The most important role in regards to the antioxidant activity, are the inherent properties of protein hydrolysates.

Keywords: Response surface methodology, Yellowfin tuna, Antioxidant activity, Protamex

Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir at 11:28 +0330 on Saturday November 18th 2017

www.SID.ir