

بهبودسازی خواص آنتی‌اکسیدانی ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی دریایی (*Arius thalassinus*) با استفاده از روش سطح پاسخ

علی طاهری^{۱*}، وحیده مختارنژاد^۲، علی معتمدزادگان^۳

چکیده

رادیکال‌های آزاد در ایجاد بیماری‌های مختلف نقش مهمی دارد، علاوه بر اکسیداسیون باعث کاهش کیفیت غذایی و مصرف آن سبب بیماری می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی خطرات بالقوه سلامتی را به دنبال دارند، بنابراین شناسایی آنتی‌اکسیدان طبیعی ضروری است. هدف این پژوهش، بررسی و بهینه‌سازی شرایط تولید ژلاتین آبکافت با خواص آنتی‌اکسیدانی است.

ژلاتین از پوست گربه ماهی با کاربرد هیدروکسیدسدیم، اسید سولفوریک و اسید سیتریک و شستشو بعد از هر تیمار و در نهایت در ۳ حجم آب مقطر در دمای ۴۵°C به مدت ۱۲ ساعت در شیکر انکوباتور استخراج و تحت شرایط مختلف دمایی، غلظت آنزیم و زمان با کاربرد آنزیم فلاوورزیم مورد آبکافت آنزیمی قرار گرفت. محصولات جهت سنجش کلاته کردن یون آهن فرو با $FeCl_2$ و فروزین مخلوط و بعد از ده دقیقه نگهداری در دمای اتاق جذب آن در ۵۶۲ نانومتر اندازه گیری شد. روش سطح پاسخ جهت بهینه سازی تولید ژلاتین آبکافت استفاده شد. عوامل متغیر این آزمایش عبارت بودند از زمان (دقیقه)، دما (°C) و نسبت آنزیم به سوستر (درصد)؛ درصد کلاته کردن یون آهن فرو نیز به عنوان پاسخ در نظر گرفته شد. نتایج تجزیه واریانس معنی‌داری مدل، دما و نسبت آنزیم به سوستر ($p < 0.05$) و عدم معنی‌داری زمان ($p > 0.05$) را نشان داد.

ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی درصد کلاته کردن یون آهن فرو خوبی در رنج ۸۱-۲۰ درصد را نشان می‌دهد. نتایج پیشنهاد می‌دهند که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل از آبکافت ژلاتین پوست گربه ماهی می‌تواند به عنوان کاندید بلقوه در صنعت دارویی و نیز برای توسعه غذاهای کاربردی باشد.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، ژلاتین، آبکافت، سطح پاسخ

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۸ تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۰

مقدمه

ژلاتین پروتئینی است که از کلاژن استخراج شده و به دلیل خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد خود به طور گسترده در صنایع مختلف مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۰).

پوست خوک اولین ماده خام مورد استفاده برای تولید ژلاتین در سال ۱۹۳۰ بود و همچنان به عنوان مهم‌ترین ماده برای تولیدات صنعتی به کار می‌رود، با این حال شیوع بیماری جنون گاوی و ممنوعیت استفاده از کلاژن خوک در بعضی مناطق بنا به دلایل مذهبی، لازم است تا یک منبع جایگزین ایمن‌تر جستجو گردد (۸). از سوی دیگر اکسیداسیون چربی در محصولات غذایی، کیفیت را کاهش می‌دهد و سبب کاهش ماندگاری می‌شود، علاوه بر مصرف ترکیبات اکسیداتیو باعث بیماری‌های جدی می‌شود (۴). گونه‌های اکسیژن فعال Reactive oxygen species (ROS) و رادیکال‌های آزاد که از طریق واکنش‌های طبیعی بدن طی تنفس در موجودات هوایی تولید می‌شوند در شرایط عادی، به شکل موثر توسط سیستم دفاعی آنتی‌اکسیدانی مانند آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی و عوامل غیرآنزیمی حذف می‌شوند تغییر در تعادل بین تولید و تخریب ROS منجر به تولید بیش از حد و یا کاهش سم زدایی می‌شود که با بیماری‌های مزمن از قبیل بیماری قلبی، دیابت و سرطان مرتبط است (۱۶).

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند بدن انسان را از رادیکال‌های آزاد و اثرات آن محافظت کنند و پراکسیداسیون لیپید را به تعویق اندازند. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مثل BHT (Butylated hydroxy toluene)، BHA (Butylated hydroxyl anisole) یا N-پروپیل گالات آنتی‌اکسیدانی قوی را نشان می‌دهند، اما استفاده از آنها به دلیل خطرات بالقوه سلامتی به شدت

* ۱. دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی

چابهار، چابهار، ایران. taherientor@gmail.com

۲. دانشجوی کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

۳. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، مازندران، ایران

عنوان کاندیدی در برابر استرس اکسیداتیو و همچنین یک ماده بالقوه درصنعت غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد (۱۵) در مطالعه‌ای که توسط Kittiphattanabawon و همکاران در سال ۲۰۱۲ صورت گرفت، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژلاتین آبکافت پوست کوسه با استفاده از آنزیم پاپایا با درجات مختلف آبکافت مورد بررسی قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل، ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (ORAC)، قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهشی آهن (FRAP)، قابلیت کلاته کردن یون آهن فرو، مهار اکسیژن منفرد، ظرفیت مهار اسید هیپوکلریک (HOCl) مورد بررسی قرار گرفت.

تمام شاخص‌های فعالیت آنتی‌اکسیدانی با افزایش درجه آبکافت، افزایش یافت ($P < 0.05$). درجه آبکافت ۴۰-۱۰٪ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH حدود $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۶-۰/۹ و رادیکال آزاد ABTS حدود $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۲۷۰-۷۵ و رادیکال هیدروکسیل $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۶۹/۵-۵/۲۳، ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن (ORAC) رنج $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۲۶۸/۱۶-۷۰۹/۴۲، فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو (Fe^{2+}) در حدود $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۳/۲-۱، مهار اکسیژن منفرد $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۶۸/۶۸-۱۳۶۲/۷۲، ظرفیت مهار اسید هیپوکلریک (HOCl) حدود $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۱۵۰-۱۷۰ و FRAP در درجات مختلف آبکافت به ترتیب میزان $\mu\text{mol TE/g sample}$ ۱/۱، ۳۰/۱۷ و ۲/۲۹ و ۶/۱۸ را نشان داد.

فعالیت کلاته کنندگی و ORAC در ژلاتین آبکافت با درجه آبکافت ۴۰٪ در درجه حرارت (100°C)، مدت زمان ۲۴۰ دقیقه و در یک دامنه گسترده pH (۹-۱) ثابت باقی ماند یا اندکی افزایش را نشان داد. همچنین در شبیه‌سازی مدل سیستم مجاری گوارشی نیز همین نتایج را نشان داد. علاوه بر این، ژلاتین آبکافت با درجه آبکافت ۴۰٪ در سطح ۵۰۰ و ۱۰۰۰ ppm می‌تواند اکسیداسیون لیپید را در دو سیستم مدل (مدل بتاکاروتن لینولئات و مدل گوشت خوک پخته) مهار

کاهش یافته است؛ بنابراین موضوع شناسایی خواص آنتی‌اکسیدانی تولید شده از منابع طبیعی به یک موضوع مورد توجه برای صنایع و تولید غذای سالم تبدیل شده است (۴). در دهه گذشته، مطالعات گوناگونی روی خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای دریایی انجام شده است و بر اساس مطالعات، پروتئین و ژلاتین آبکافت حاصل از آبزیان خواص آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان داده است. در مطالعه‌ای که توسط Ngo و همکاران در سال ۲۰۱۰ انجام شد یک پپتید دارای خواص ضد اکسیدانی از ژلاتین فلس نیل تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) جداسازی شد. ژلاتین با استفاده از آلکالاز، پروناز E، تریپسین و پپسین آبکافت شد. اثر ضد اکسیدانی آبکافت مربوطه با استفاده از فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، رادیکال هیدروکسیل و رادیکال آنیون سوپراکسید مورد بررسی قرار گرفت. علاوه بر این، اثر حفاظتی در مقابل آسیب DNA ناشی از رادیکال‌های هیدروکسیل نیز مشخص شد. نتایج نشان داد آبکافت مشتق شده از آلکالاز فعالیت ضد اکسیدانی بالاتری را در مقایسه با دیگر آبکافت آنزیمی نشان داد، همچنین مهار رادیکال هیدروکسیل کارآمدتر از رادیکال آزاد DPPH و سوپراکسید بود. میزان IC_{50} آبکافت حاصل از آلکالاز (غلظت آبکافت که قادر به مهار ۵۰٪ فعالیت رادیکال آزاد است) در مهار رادیکال آزاد DPPH، هیدروکسیل و سوپراکسید به ترتیب $\mu\text{g/ml}$ ۶۶۰، ۲۶۳ و ۷۲۰ گزارش شد.

توالی پپتیدهای فعال (۱۳۸۲/۵۷ Da) در آبکافت حاصل از آلکالاز شناسایی شد. این پپتیدها هیچ اثر سیتوتوکسیک بر ماکروفاژهای موش (RAW۲۶۴/۷) و فیروبلاست ریه انسان (MRC-5) نشان نداد. علاوه بر رادیکال‌های سوپراکسید، DPPH و هیدروکسیل را در میزان IC_{50} $\mu\text{g/ml}$ ۵۶، ۷/۸۲ و ۱۷/۸۳ به ترتیب مهار کرد. نتایج بدست آمده نشان داد که پپتیدهای مشتق شده از ژلاتین فلس نیل تیلایپا (*O. niloticus*) می‌تواند به

و ۷/۵-۹ و قابلیت کلاته کردن حدود $\mu\text{mol EE/g sampel}$ و ۱۹-۴ و ۱۹-۳ به ترتیب بود، و عنوان کردند آبکافت ژلاتین (GH) با استفاده از پروتئاز خارج سلولی باسیلوس می‌تواند به عنوان منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدانی طبیعی عمل کند که از اکسیداسیون در سیستم‌های مواد غذایی و بیولوژیکی جلوگیری کند (۱۷).

همانطور که از مطالعات پیشین بر می‌آید فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها و پپتیدها می‌تواند در نتیجه مهار رادیکال‌های آزاد تشکیل شده عامل اکسیداسیون، مهار ترکیبات حاوی اکسیژن یا توانایی کلاته کردن یون‌های فلزی و کاهش آنها باشد (۹).

از آنجا که تغییر شرایط آبکافت اعم از دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا می‌تواند خواص کاربردی محصول نهایی را تغییر دهد لذا دستیابی به بهترین شرایط آبکافت جهت حصول خواص آنتی‌اکسیدانی از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد (۲). بهینه‌سازی Response Surface Methodology (RSM) یک روش انتخابی است که به دنبال بهترین گزینه از یک مجموع مشخص از گزینه‌های دیگر، و طرح‌های تجربی مشتق شده از آمار مدرن به عنوان راهی برای دستیابی به هدف و هزینه کمتر از حد معمول می‌باشد (۳).

مرزهای گسترده جنوب ایران دارای غنای گونه‌ای فراوانی از آبزیان با توانایی تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشند. در آبهای دریای مکران و سواحل چابهار گونه گربه ماهی دریایی (*A. thalassinus*) به میزان فراوانی به عنوان صید ضمنی در صیادی دریایی بدست می‌آید که استفاده خوراکی در کشور ندارد و به مصرف تهیه پودر ماهی رسیده و یا صادر می‌شود. این منبع بالقوه شیلاتی قابلیت بالایی برای تولید ژلاتین آبکافت شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی جهت استفاده در صنایع دارویی دارد. تا کنون در کشور ایران مطالعه‌ای روی آبکافت ژلاتین پوست گربه ماهی انجام نشده است لذا در این تحقیق به بررسی یافتن شرایط بهینه تولید ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی دریایی با استفاده از روش سطح پاسخ پرداخته شده است.

کند؛ بنابراین، ژلاتین آبکافت پوست کوسه blacktip (درجه آبکافت ۴۰٪) می‌تواند به طور بالقوه به عنوان یک منبع جایگزین ضد اکسیدان طبیعی استفاده شود (۱۱).

Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۲ ژلاتین پوست تیلایا (TSG) را با استفاده از آنزیم‌های پروپراز E و multifect خنثی آبکافت نمودند. آبکافت با آنزیم پروپراز E بالاترین درجه آبکافت با میزان ۱۸/۰۱ و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل ۶۲/۴۷٪ را در مقایسه با محصول آبکافت multifect خنثی با میزان درجه آبکافت ۱۲/۶۰ و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل ۵۲/۲۱٪ نشان داد.

آبکافت ژلاتین پوست تیلایا (TSGH) حاصل از آبکافت پیش رونده (مترقی) با کاربرد multifect خنثی و پروپراز E بالاترین درجه آبکافت با میزان ۲۲/۱۱٪ و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل ۹۹/۲۴٪ را داشت.

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت مورد استفاده افزایش یافت، میزان IC_{50} TSGH و GSH در مهار رادیکال آزاد DPPH $3/66 \text{ mg/mL}$ و $0/69$ ، در مهار رادیکال آنیون سوپراکسید $0/56 \text{ mg/mL}$ و $0/27$ به ترتیب و در مهار رادیکال هیدروکسیل IC_{50} TSGH $0/74 \text{ mg/mL}$ گزارش شد.

نتایج نشان داد که آبکافت TSG تهیه شده با استفاده از multifect خنثی و پروپراز E می‌تواند به عنوان یک منبع پپتیدهای با فعالیت ضد اکسیدانی بالا خدمت کند و پتانسیل توسعه به عنوان غذاهای سلامت را دارند. مطالعه‌ای که توسط Samart و همکاران در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت فعالیت آنتی-اکسیدانی ژلاتین آبکافت پوست unicorn leatherjacket تهیه شده با پروتئاز خارج سلولی باسیلوس (GH-H11) با درجات مختلف آبکافت در مقایسه با ژلاتین‌هایی که با استفاده از آلکالاز آبکافت شدند (GH-A1) مورد مطالعه قرار دادند، نتایج نشان داد فعالیت آنتی‌اکسیدانی آبکافت حاصل از هر دو پروتئاز با افزایش درجه آبکافت افزایش یافت. میزان مهار رادیکال آزاد GH-A1 و GH-H11 در درجه آبکافت ۴۰-۱۰٪ حدود $7/5-8 \mu\text{mol TE/g sampel}$ و ۳۲-۴۸ و ۳۰-۶۶، قدرت کاهشی ۸-۷/۵

مواد و روش کار

ماهی تازه از ایستگاه‌های صیادی چابهار تهیه شد و در یخ به آزمایشگاه زیست فناوری دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شد، نمونه‌ها در دمای 20°C تا زمان استفاده نگهداری شدند. هیدروکسیدسدیم ($1310-133-2$) اسید سولفوریک ($7664-93-9$)، اسید سیتریک (251275)، الکل اتیلیک (34852)، فروزین ($69898-45-9$) و آنزیم فلاوروزیم ($2322-752-2$) از شرکت سیگما تهیه گردید.

استخراج ژلاتین

پوست ماهی جدا شده و به قطعات 1×1 سانتی‌متر برش زده شد و با آب تمیز شستشو شد. سپس پوست به ترتیب با هیدروکسیدسدیم 0.2% (w/v)، اسید سولفوریک و اسید سیتریک 0.1% (w/v) تیمار شد. در تمامی تیمارها محلول اسید و باز هر چهل دقیقه تعویض شد و این سیکل سه بار با مجموع مدت زمان ۲ ساعت برای هر تیمار تکرار شد، بعد از هر تیمار پوست‌ها جهت رسیدن به pH طبیعی با آب مقطر شسته شدند. نسبت پوست به محلولهای اسید یا باز $1:7$ (w/v) بود. پوست در مرحله بعد با الکل اتیلیک 76% تیمار شد و نسبت پوست به الکل $1:7$ در نظر گرفته شد. در تمامی مراحل از شیکر انکوباتور (مدل KM55) استفاده گردید. در نهایت پوست‌ها با آب مقطر شسته شدند، استخراج نهایی در ۳ حجم آب مقطر در دمای 45°C به مدت ۱۲ ساعت در شیکر انکوباتور انجام شد، عصاره به دست آمده با کاغذ فیلتر واتمن (شماره یک) با استفاده از قیف بوخنر فیلتر شد و جهت خشک شدن محلول ژلاتین از فریز درایر (JFDYL) به مدت ۲۰ ساعت استفاده شد (۱۲). ژلاتین خشک شده در دمای 22°C - برای مطالعات بعدی نگهداری شد.

آبکافت آنزیمی

ژلاتین حاصل از پوست توسط آنزیم فلاوروزیم و در شرایط مختلف و کنترل شده (دما، غلظت آنزیم، زمان) مورد آبکافت قرار گرفت. 100 میلی‌گرم ژلاتین در 10CC آب مقطر حل شد ($0.1\%/w/v$)، پس از رسیدن دمای محلول ژلاتین به دمای مورد

نظر، آنزیم با نسبت‌های مختلف طبق جدول شماره ۲ افزوده و نمونه‌ها به شیکر انکوباتور منتقل شد، پس از مدت زمان در نظر گرفته شده آنزیم‌ها با حرارت‌دهی در 90°C به مدت ۱۰ دقیقه غیر فعال شدند و سپس در 3000 دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی به عنوان ژلاتین آبکافت جمع آوری شد و جهت خشک شدن محلول ژلاتین از فریز درایر استفاده شد (۴).

فعالیت آنتی اکسیدانی

کلاته کردن یون آهن فرو

فعالیت کلاته کردن یون Fe^{2+} با استفاده از روش تغییر یافته Chung و همکاران (2002) با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. بر این اساس نمونه رقیق شده ژلاتین ($3/7$ میلی‌لیتر) با 0.1 میلی لیتر 2 mM FeCl_2 و 0.2 میلی لیتر فروزین مخلوط شد، مخلوط واکنش به مدت ده دقیقه در دمای اتاق نگهداری و سپس جذب آن در 562 نانومتر اندازه‌گیری شد، بلانک نیز به همان شیوه تهیه شد، جز آنکه به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد، از EDTA نیز به عنوان شاهد استفاده شد (۸).

فعالیت کلاته کردن به شکل زیر محاسبه شد:

$$100 \times [(B-A) / B] = \text{درصد فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو}$$

که در آن A عدد جذب نمونه و B عدد جذب بلانک است.

طراحی آزمایش و بهینه‌سازی

در این مطالعه از طرح آماری روش سطح پاسخ (RSM) برای بهینه‌سازی شرایط آبکافت استفاده گردید. اثر متغیرهای مستقل شامل A (دما به درجه سانتی‌گراد)، B (زمان به دقیقه) و C (نسبت آنزیم به سوبسترا به درصد) در ۳ سطح مورد ارزیابی قرار گرفت که در جدول ۱ نشان داده شده است. در این پژوهش از طرح مرکب مرکزی با ۲۰ آزمایش که شامل ۸ نقطه فاکتوریل، ۶ نقطه محوری و ۶ تکرار نقطه مرکزی (برای تخمین خطای آزمایش) به منظور بررسی تاثیر شرایط آبکافت و بهینه‌سازی فرایند مذکور استفاده شد. متغیر مستقل (پاسخ)، درصد کلاته کردن آهن بود که نتایج آن در جدول ۲ نشان داده شده است. تصاویر سه بعدی جهت بررسی روند تغییرات رسم

با کاربرد آنالیز رگرسیون، شاخص‌های اندازه‌گیری شده در قالب یک چند جمله‌ای درجه دوم بر طبق معادله ۱ مدل‌سازی شدند.

ضرایب مدل چندجمله‌ای به صورت Y میزان کردن کلاته β_0 (عبارت ثابت)، β_1 ، β_2 ، β_3 (اثرات خطی)، β_{11} ، β_{22} ، β_{33} (اثرات درجه دوم) و β_{12} ، β_{13} ، β_{23} (اثرات متقابل) بیان شده‌اند. (معادله ۱):

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \beta_{11} X_1^2 + \beta_{22} X_2^2 + \beta_{33} X_3^2 + \beta_{12} X_1 X_2 + \beta_{13} X_1 X_3 + \beta_{23} X_2 X_3$$

نتایج

نتایج طراحی آزمایش و تجزیه و تحلیل آماری

بر اساس نتایج تجزیه واریانس که در جدول (۳) نشان داده شده است، مدل در سطح احتمال ۹۹/۹۹٪ معنی‌دار است. نتایج خطی اختلاف معنی‌داری دما ($<0/0001$) و نسبت آنزیم به سوبسترا ($0/0057$) و عدم وجود اختلاف معنی‌داری زمان ($0/3062$) را نشان داد. در مورد دما این معنی‌داری بیشتر بود. نتایج درجه دوم نیز اختلاف معنی‌داری در هر سه متغیر مستقل نشان داد که در مورد دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بیشتر از زمان مشهود معنی‌دار بود. سطح نتایج اثر متقابل نیز فقط در مورد اثر متقابل دما و زمان ($0/0029$) اختلاف معنی‌دار نشان داد و در بقیه اثرات اختلاف معنی‌داری نسبت به هم نشان نداد ($p > 0/05$). از رگرسیون برای تعیین یک مدل سطح پاسخ بر اساس برآیند پاسخ‌های خطی و درجه دو و اثر متقابل متغیرهای مستقل استفاده شد.

مدل رگرسیونی برای تخمین میزان فعالیت کلاته کردن برای مقادیر واقعی و کد شده در فرمول ۲ و ۳ آمده است.

فرمول (۲): مدل رگرسیونی برای مقادیر کد شده

$$19/82X_1^2 + 62/83X_2 + 9/50X_3 + 1/20X_1X_2 + 3/90X_1X_3 - 19/82X_1^2 + 8/68X_2^2 - 14/82X_3^2 - 4/87X_1X_2 - 0/62X_1X_3 + 0/88X_2X_3$$

شدند. از نرم افزار Design Expert 7.00 جهت تجزیه و تحلیل اطلاعات و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید.

جدول ۱: سطوح متغیرهای فرایند آبکافت آنزیمی ژلاتین پوست گربه ماهی

نوع متغیر	نماد	سطوح کد بندی شده		
		-1	0	+1
دما (درجه سانتی گراد)	A	40	52	65
زمان (دقیقه)	B	150	60	240
نسبت آنزیم به سوبسترا (درصد)	C	3	1	5

جدول ۲: درصد کلاته کردن یون Fe^{2+} در شرایط مختلف آبکافت بر

اساس نتایج RSM

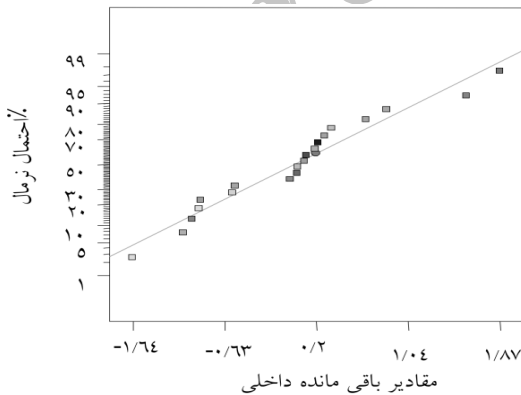
دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	نسبت آنزیم به سوبسترا (%)	Fe^{2+} % کلاته
40	240	1	28
65	150	3	50
40	60	5	25
52/5	150	3	60
52/5	240	3	73
52/5	150	3	65
65	60	1	49
40	240	5	38
52/5	150	5	52
52/5	150	3	58
65	240	5	47
52/5	150	1	42
52/5	150	3	69
40	150	3	34
40	60	1	18
52/5	150	3	68
52/5	150	3	61
65	60	5	53
52/5	60	3	68
65	240	1	39

جدول ۳: جدول آنالیز واریانس درجه آبکافت تحت تاثیر متغیرهای مستقل در طول آزمایش بهینه‌سازی

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	میانگین مربعات	F	p Prob > F
مدل	۴۶۶۴/۷۲	۹	۵۱۸/۳۰	۴۱/۸۵	<۰/۰۰۰۱
دما (A)	۹۰۲/۵۰	۱	۹۰۲/۵۰	۷۲/۸۸	<۰/۰۰۰۱
زمان (B)	۱۴/۴۰	۱	۱۴/۴۰	۱/۱۶	۰/۳۰۶۲
آنزیم به سویسترا (C)	۱۵۲/۱۰	۱	۱۵۲/۱۰	۱۲/۲۸	۰/۰۰۵۷
AB	۱۹۰/۱۲	۱	۱۹۰/۱۲	۱۵/۳۵	۰/۰۰۲۹
AC	۳/۱۳	۱	۳/۱۳	۰/۲۵	۰/۶۲۶۳
BC	۶/۱۳	۱	۶/۱۳	۰/۴۹	۰/۴۹۷۹
A ²	۱۰۸۰/۰۹	۱	۱۰۸۰/۰۹	۸۷/۲۲	<۰/۰۰۰۱
B ²	۲۰۷/۲۸	۱	۲۰۷/۲۸	۱۶/۷۴	۰/۰۰۲۲
C ²	۶۰۳/۸۴	۱	۶۰۳/۸۴	۴۸/۷۶	<۰/۰۰۰۱
باقی مانده	۱۲۳/۸۳	۱۰	۱۲/۳۸		
فقدان تناسب	۲۲/۳۳	۵	۴/۴۷	۰/۲۲	۰/۹۳۸۹
خطای خالص	۱۰۱/۵۰	۵	۲۰/۳۰		
تصحیح کلی	۴۷۸۸/۵۵	۱۹			

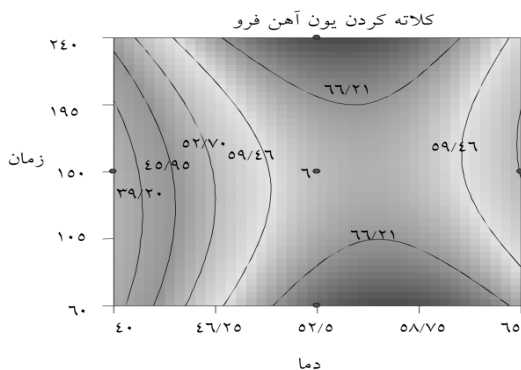
فرمول (۲): مدل رگرسیونی برای مقادیر حقیقی

$$\begin{aligned}
 \text{کلاته کردن آهن} = & -۳۷۹/۶۱۵۲۰ + ۱۴/۸۰۲۸۲X_1 - ۰/۰۹۵۲۹۹X_2 + ۲۴/۷۶۰۶۱ X_3 - ۰/۱۲۶۸۴X_1^2 \\
 & + ۱/۰۷۱۸۳X_2^2 - ۳/۷۰۴۵۵X_3^2 - ۴/۳۳۳۳۳X_1 X_2 - ۰/۰۲۵۰۰X_1 X_3 + ۴/۸۶۱۱۱X_2 X_3
 \end{aligned}$$



نگاره ۱: توزیع احتمال نرمال داده‌ها ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی

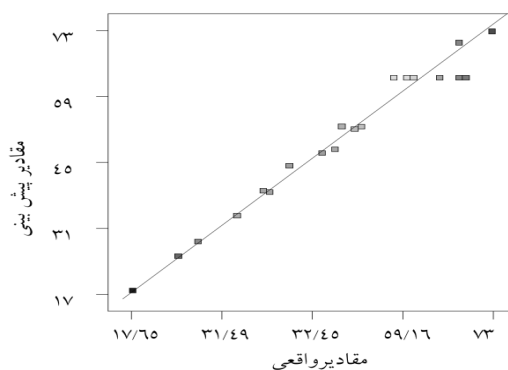
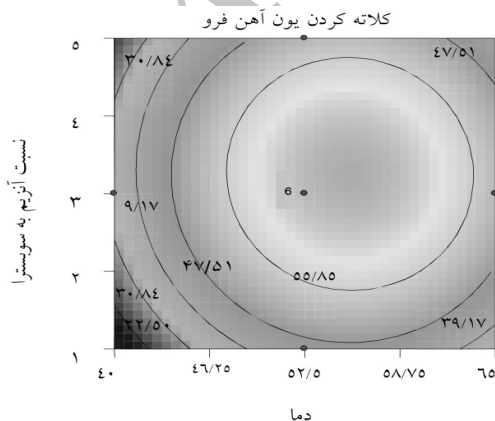
نمودارهای توزیع احتمال نرمال داده‌ها و مقایسه نتایج تخمین مدل و نتایج واقعی
 توزیع احتمال نرمال داده‌ها و مقایسه نتایج حاصل از تخمین مدل و نتایج واقعی نیز در نگاره ۱ و ۲ آورده شده است.
 پراکنش مقادیر باقی مانده که تفاوت بین میزان عددی پیش بینی و مقدار تجربی را نشان می‌دهد خط مستقیمی را تشکیل می‌دهد و مقادیر باقی مانده به شکل نرمال در دو سمت خط پراکنده‌اند. این نمودار نشان دهنده برآزش معقول نقطه مورد آزمایش با مقدار پیش بینی شده توسط مدل است.



نگاره ۳ و ۴: منحنی سطح پاسخ و تراز اثر دما و زمان بر درصد کلاته کردن ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی

رابطه دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر درصد کلاته کردن یون آهن فرو

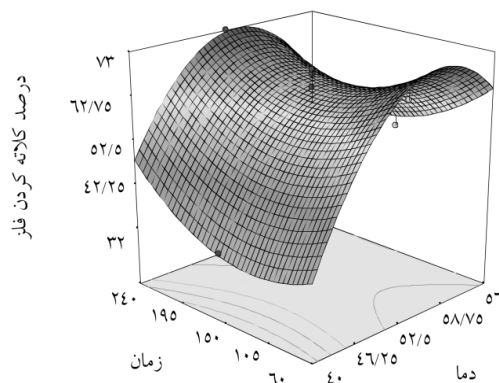
در نگاره ۵ و ۶ تاثیر میزان مصرف آنزیم و دما در مدت زمان ثابت ۱۵۰ دقیقه مشاهده می‌شود. با افزایش دما به ویژه در درصدهای پایین‌تر نسبت آنزیم به سوبسترا درصد کلاته کردن افزایش می‌یابد به ویژه تا دمای 58°C و در نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد که در ماکزیمم مقدار است؛ و بعد از این دما، این درصد کاهش می‌یابد. نسبت آنزیم به سوبسترا نیز تا میزان ۳ درصد با افزایش درصد کلاته کردن همراه است اما درصدهای بالاتر روند کاهشی در درصد کلاته کردن به همراه دارد.

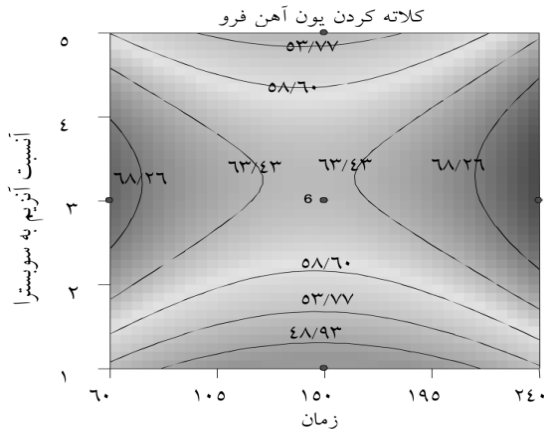


نگاره ۲: مقایسه مقدار پیش بینی مدل در برابر مقدار تجربی ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی

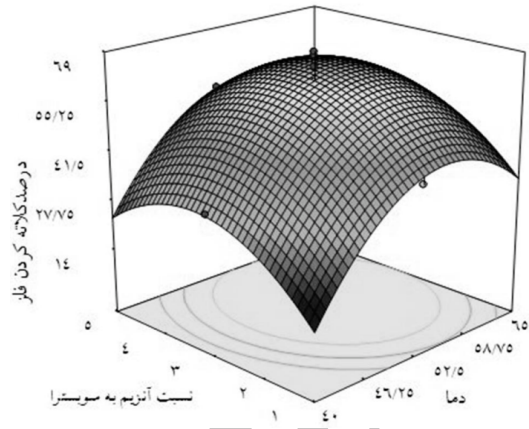
در نگاره ۲ مقایسه مقادیر تجربی برای قدرت کلاته کردن ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی دریایی (*A. thalassinus*) با مقادیر پیش بینی شده تطابق نزدیک این اعداد را نشان می‌دهد.

رابطه دما و زمان بر درصد کلاته کردن یون آهن فرو
طبق نگاره ۳ و ۴ با ثابت در نظر گرفتن نسبت آنزیم به سوبسترا در میزان ۳ درصد، با افزایش دما میزان کلاته کردن فلزات نیز افزایش می‌یابد، به ویژه تا دمای 58°C که در ماکزیمم مقدار است. افزایش زمان تا حدود ۱۵۰ دقیقه تاثیر محسوسی بر درصد کلاته کردن ندارد اما با افزایش زمان تا ۲۴۰ دقیقه این درصد دارای روند افزایشی است و در ۲۴۰ دقیقه در حداکثر مقدار است. با افزایش دما در هر مدت زمانی درصد کلاته کردن بصورت درجه دو افزایش می‌یابد و ماکزیمم آن در دمای حدود 58°C و در حداکثر میزان زمان (۲۴۰ دقیقه) اتفاق می‌افتد و بعد از این دما، با افزایش زمان درصد کلاته کردن افت می‌کند.





نگاره ۷ و ۸: منحنی سطح پاسخ و تراز اثر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر درصد کلاته کردن ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی



نگاره ۵ و ۶: منحنی سطح پاسخ و تراز اثر دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر درصد کلاته کردن ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی

بحث

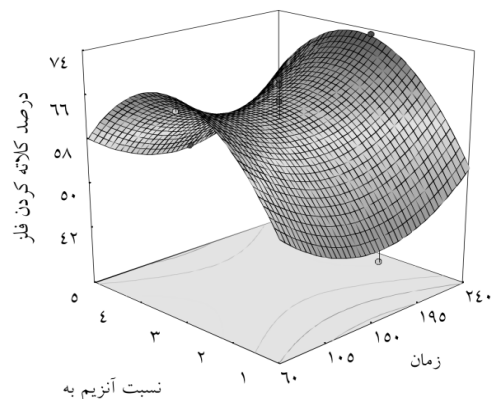
در این تحقیق ژلاتین پوست گربه ماهی (*A. thalassinus*) تحت شرایط مختلف دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا مورد آبکافت قرار گرفت، ژلاتین‌های آبکافت جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی تحت آزمون کلاته کردن یون آهن فرو قرار گرفتند. روش سطح پاسخ به شکل موفقیت آمیزی برای بهینه‌سازی پارامترهای تاثیرگذار بر روند آبکافت ژلاتین مورد استفاده قرار گرفت. ضریب تعیین کلی (R-Squared) $0/9741$ نشان دهنده توصیف بسیار خوب مدل رگرسونی از واکنش می‌باشد یعنی مدل توانایی خوبی برای برازش داده‌ها داشته است. هرچه مقدار R^2 به ۱ نزدیکتر باشد مدل بهتر پاسخ را پیش‌بینی می‌کند (۱۳).

برای قابل قبول بودن مدل از نظر آماری R^2 تعدیل شده (R^2 Adjusted) و R^2 پیش‌بینی شده (R^2 Predicted) باید داری بالاترین مقدار باشند. مدلی مناسب است که مقادیر R^2 تعدیل شده و R^2 پیش‌بینی شده آن کمتر از $0/2$ از هم اختلاف داشته باشد (۱۴ و ۵).

که در تحقیق حاضر میزان R^2 تعدیل شده برابر $0/9509$ و R^2 پیش‌بینی شده برابر $0/9431$ دارای مقدار بالا و میزان اختلاف بسیار کم بین آنها مشاهده شد. نسبت سیگنال به اختلال

رابطه زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا

در دمای ثابت $52/5^{\circ}\text{C}$ افزایش زمان تا ۱۵۰ دقیقه به ویژه در غلظت‌های پایین آنزیم باعث کاهش درصد کلاته کردن و بعد از این مدت زمان روند افزایشی مشاهده می‌شود و بیشترین میزان در زمان ۲۴۰ دقیقه مشاهده می‌شود. نسبت بالای آنزیم به سوبسترا بخصوص در زمان‌های طولانی با کاهش شدید درصد کلاته کردن همراه است، بیشینه آن در زمان ۲۴۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۳ درصد و کمینه مقدار آن در زمان ۱۵۰ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا ۵ درصد می‌باشد. افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا نیز تا میزان ۳ درصد با افزایش درصد کلاته کردن همراه است اما درصدهای بالاتر روند کاهشی در درصد کلاته کردن به همراه دارد (نگاره ۷ و ۸).



(signal to noise ratio) باید در مدل‌های سطح پاسخ بالاتر از ۴ باشد (۵) این مقدار برای درجه آبکافت مدل ۲۲/۱۲۸ بود که این نسبت نشان دهنده یک سیگنال مطلوب و کارایی مدل است. فقدان تناسب، خطای باقیمانده را نسبت به خطای محض بررسی می‌کند. فقدان تناسب (Lack of Fit) در مدل‌ها معنی‌دار نبود ($P > 0.05$) و این نشان دهنده برخورداری مدل از تناسب خوب است.

مقایسه مقادیر تجربی برای قدرت کلاته کردن ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی دریایی با مقادیر پیش بینی پلات سطح نسبتاً قابل قبولی را ارائه می‌دهد که این امر نشان دهنده همبستگی بسیار خوب بین نتایج بدست آمده با روش تجربی و مقادیر پیش بینی شده با روش آماری است. منحنی سطح پاسخ و تراز اثر دما و زمان بر درصد کلاته کردن نشان می‌دهد در ابتدای روند آبکافت تولید پپتیدهایی که قابلیت کلاته کردن عوامل حساس کننده اکسیداسیون مثل یون‌های فلزی را دارا می‌باشند شروع می‌شود اما با ادامه روند آبکافت احتمالاً با تغییر در ساختار این پروتئین‌ها و پپتیدها این خاصیت کاهش می‌یابد و در ادامه با افزایش زمان و کوچکتر شدن طول زنجیره‌های پپتیدهای با قابلیت حذف یون‌های فلزی مجدد این خاصیت افزایش می‌یابد و این روند در یک رنج بهینه دمایی بیشینه است.

بر خلاف بسیاری از مطالعات دیگر که افزایش دما و زمان آبکافت سبب افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شود، در مطالعه حاضر افزایش دما بخصوص در زمان‌های طولانی سبب کاهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد، این مسئله نشان دهنده وجود یک دامنه دمایی بهینه برای عملکرد مطلوب آنزیم فلاوریزیم است. در مطالعه Fang و همکاران که بر پروتئین آبکافت ماهیچه اسکویید انجام شد نیز افزایش دما و زمان آبکافت سبب افزایش مهار رادیکال آزاد و سپس سبب کاهش آن شد (۶).

در مطالعه‌ای که توسط طاهری و همکاران در سال ۹۱ در تولید پروتئین آبکافت ساردین پهلوپلائی با آنزیم آلکالاژ انجام

شد نیز افزایش دما و زمان سبب کاهش درصد آنتی‌اکسیدانی شد (۲). با توجه به نگراره اثر متقابل دما و نسبت آنزیم به سوستر، در دما و غلظت بالای آنزیم درصد کلاته کردن کاهش می‌یابد که این مسأله می‌تواند به دلیل ناپایداری آنزیم در دمای بالا و همچنین افزایش سرعت دناتوره شدن آنزیم در دماهای بالا باشد (۱). همچنین این نمودار نشان می‌دهد که نسبت آنزیم به سوستر و دما یک حد بهینه برای تولید پپتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی دارند. نتایج مشابه‌ای در مطالعه Fang و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر پروتئین آبکافت ماهیچه اسکویید با استفاده از آنزیم پاپائین گزارش شد که افزایش غلظت آنزیم در محدوده ۱/۷۴-۱٪ سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH شد اما افزایش بیشتر از ۲-۱/۷۴٪ سبب کاهش فعالیت مهار گردید همچنین دما در رنج ۵۱-۴۵ درجه سانتی‌گراد سبب افزایش فعالیت مهار رادیکال آزاد شد اما دماهای بالاتر از این رنج سبب کاهش فعالیت مهار شد (۷). در مطالعه طاهری و همکاران بر آبکافت ضایعات سر مرغ نیز نسبت آنزیم به سوستر و دما در یک رنج خاصی سبب افزایش درجه آبکافت می‌شود و افزایش دما سبب کاهش درجه آبکافت شد (۱).

در رابطه زمان و نسبت آنزیم به سوستر از آنجا که آنزیم با سوستر تشکیل یک کمپلکس استوکیومتری می‌دهد و تنها این ترکیب می‌تواند به محصول شکسته شود، بنابراین با افزایش غلظت آنزیم، سوستر اشباع شده و سبب پیشرفت فعالیت آنزیم می‌شود؛ اما ممکن است با گذشت زمان پایداری آنزیم کم شود و واکنش از قانون ترمودینامیک پیروی نکند و تجمع محصول به حدی برسد که خاصیت بازدارندگی داشته باشد.

این مسأله می‌تواند دلیل کاهش شدید درصد کلاته یون آهن فرو در نسبت بالای آنزیم به سوستر در زمان‌های طولانی در رابطه زمان و نسبت آنزیم به سوستر باشد. در مطالعه طاهری و همکاران (۱۳۹۱) که بر آبکافت ضایعات سر مرغ انجام شد نشان داد که افزایش میزان آنزیم مصرفی از حد ۰/۱۱ واحد

آنسون بر گرم نمی‌تواند به تولید پروتئین با حداکثر درجه آبکافت منجر شود، همچنین مطالعه انجام شده روی پروتئین آبکافت ضایعات خرچنگ دراز آب شیرین با آنزیم اپتیماز نشان داد که درصد درجه آبکافت با کاهش غلظت آنزیم به ۴۵٪ افزایش می‌یابد. در تحقیقی دیگر نیز تولید پروتئین آبکافت سر مرغ با استفاده از آنزیم نئوتراز نشان داد که با کاهش غلظت آنزیم، آبکافت افزایش می‌یابد (۱).

فاکتورهای متعددی از جمله: شرایط استخراج پروتئین، درجه آبکافت، نوع آنزیم پروتئازی می‌توانند بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال تأثیر بگذارد (۷). آنزیم مورد استفاده در این مطالعه توانسته در دامنه دمایی و زمانی محدود پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی بالا تولید کند. تمامی فاکتورهای بررسی شده تأثیر دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا را بر فرآیند آبکافت و در نتیجه بر میزان کلاته کردن یون آهن فرو نشان می‌دهد. از میان شرایط تأثیر گذار بر فرآیند آبکافت دما و نسبت آنزیم به سوبسترا تأثیر بیشتر و زمان نسبت به دو فاکتور دیگر به میزان کمتری تأثیر داشته است. تمام نتایج نشان دهنده تفسیر ریاضی قابل قبول از روند کلاته کردن است؛ و بیان کننده این هستند که مدل حاصل توانایی خوبی برای پیش‌بینی میزان کلاته کردن تحت شرایط آزمایش دارد.

شرایط بهینه بدست آمده برای آبکافت ژلاتین که بیشترین فعالیت کلاته کردن را به دنبال دارد دمای 56.73°C ، نسبت آنزیم به سوبسترا $3/25$ ٪ و زمان $60/07$ دقیقه با میزان کلاته کردن آهن $73/0117$ ٪ بود که این مدل پیش‌بینی شده بسیار نزدیک به مدل تجربی بود.

همانطور که قبلاً ذکر شد، رادیکال‌های آزاد در آغاز و یا پیشرفت بیماری تحلیل برنده درگیر هستند (۸) بنابراین، با توجه به رابطه نزدیک بین استرس اکسیداتیو و بیماری‌ها، به نظر می‌رسد کنترل استرس اکسیداتیو یکی از مراحل بسیار مهم در کند کردن پیشرفت این بیماری‌ها و یا جلوگیری از عوارض ناشی از آنها باشد. در این راستا، تعداد زیادی از پپتیدهای

آنتی‌اکسیدانی جدا شده و به عنوان منابع طبیعی برای کنترل استرس اکسیداتیو در نظر گرفته شدند، برخی از مطالعات جهت تأیید فعالیت زیستی پپتیدهای کلاژن و ژلاتین در انسان انجام شده است و برخی از داده‌های متقاعد کننده برای مدل‌های حیوانی به دست آمده است که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داد که پپتید جدا شده از ژلاتین پوست hoki قادر به افزایش بیان آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکوتاتیون پراکسیداز، کاتالاز و سوپراکسید دیسموتاز در سلولهای تومور کبدی انسان بودند (۱۴). مطالعات صورت گرفته توسط Yang و همکاران در سال ۲۰۰۹ بر ژلاتین آبکافت پوست تیلایا نیز ظرفیت آنتی‌اکسیدانی را به وسیله مهار قابل توجه رادیکال آزاد و پراکسیداسیون لیپید نشان داد و گزارش شد که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مشتق شده پتانسیل آنتی‌اکسیدان طبیعی را دارا است (۱۸). نتایج حاصل از مطالعه Ngoa و همکاران در سال ۲۰۱۰ بر روی ژلاتین فلس نیل تیلایا (*Oreochromis niloticus*) نشان داد پپتیدهای حاصل از آبکافت آلکالاز بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارد بعلاوه این پپتیدها هیچ اثر سیتوتوکسیکی در ماکروفاژهای موش (RAW 264.7) و فیروپلاست روده انسان (MRC-5) نشان نداد، بعلاوه مهار رادیکال هیدروکسیل، DPPH و رادیکال سوپراکسید میزان IC_{50} ، $7/56$ ، $8/82$ و $17/83$ IM را به ترتیب نشان داد و عنوان شد که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مشتق شده از ژلاتین فلس نیل تیلایا (*O. niloticus*) به عنوان کاندید در برابر استرس اکسیداتیو عمل می‌کند و نیز می‌تواند به عنوان یک ماده بالقوه کاربردی در صنعت غذایی و دارویی مفید باشد (۱۵). نتایج مطالعه‌ای Kittiphattanabawon و همکاران در سال ۲۰۱۲، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژلاتین آبکافت پوست کوسه blacktip با استفاده از آنزیم لاتکس پایا در درجه آبکافت ۴۰-۱۰٪ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل و رادیکال هیدروکسیل، ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن

آنتی‌اکسیدان، سیستم بیولوژیک و غذایی را از خطر اکسیداسیون و یون‌های فلزی حفظ کند و به عنوان کاندید بالقوه در صنعت دارویی و نیز برای توسعه غذاهای کاربردی (با پتانسیل آنتی‌اکسیدانی) یا محصولات غذا دارو (Nutraceutical) در برابر فلزات و بیماری‌های مربوطه باشد.

اگرچه شواهد زیادی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال را در شرایط آزمایشگاهی تأیید کرده است، اما در نظر گرفتن رابطه بین خواص آنتی‌اکسیدان آزمایشگاهی و خواص آنتی‌اکسیدان درون بدن پپتیدها زمانی که آن‌ها مورد تغییر و تجزیه در روده، سیستم عروقی و کبد قرار می‌گیرند مهم است. بنابراین تحقیقات زیادی مورد نیاز است تا اثربخشی و ایمنی ژلاتین آبکافت را در بدن انسان جهت توصیه غذایی و دارویی ثابت کند.

از مزایای بهینه‌سازی یافتن بهترین شرایط تیمار برای دستیابی به حداکثر پاسخ یا پاسخ بهینه است. از نتایج این تحقیق می‌توان بصورت تکرار پذیر جهت تولید مجدد ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی جهت مطالعات پیش‌کلینیکی و سپس مطالعات کلینیکی استفاده نمود. تحقیق روی ژلاتین آبکافت در دنیا همچنان ادامه دارد و هنوز به مرحله صنعتی نرسیده است.

تشکر و سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار جهت فراهم آوردن امکانات این تحقیق در قالب پایان نامه کارشناسی ارشد خانم وحیده مختارنژاد تشکر و قدردانی می‌نمایند.

فهرست منابع

- ۱- طاهری، ع.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع.، حبیبی رضایی، م. (۱۳۹۱): بهینه‌سازی آبکافت آنزیمی ضایعات حاصل از کشتار مرغ. فصل‌نامه‌ی علوم و صنایع غذایی. ۳۴(۹): ۷۶-۶۵

(ORAC)، فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو (Fe^{2+})، مهار اکسیژن منفرد، ظرفیت مهار اسید هیپوکلریک (HOCl) و FRAP خوبی در درجات مختلف آبکافت را نشان داد و عنوان شد ژلاتین آبکافت پوست کوسه blacktip (درجه آبکافت: ۴۰٪) می‌تواند به طور بالقوه به عنوان یک منبع جایگزین آنتی‌اکسیدان طبیعی استفاده شود (۱۱).

نتایج مطالعه Zhang و همکاران در سال ۲۰۱۲ بر روی آبکافت ژلاتین پوست تیلایپا (TSG) با استفاده از آنزیم‌های پروپراز E و multifect خشی نشان داد. آبکافت با آنزیم پروپراز E بالاترین درجه آبکافت و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل را در مقایسه با محصول آبکافت multifect خشی را دارد.

آبکافت ژلاتین پوست تیلایپا (TSGH) حاصل از آبکافت پیش رونده (مترقی) با کاربرد multifect خشی و پروپراز E بالاترین درجه آبکافت و فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل را در مقایسه با دیگر آبکافت‌های دو آنزیمی داشت. نتایج نشان داد که آبکافت TSG تهیه شده با استفاده از multifect خشی و پروپراز E می‌تواند به‌عنوان یک منبع پپتیدهای با فعالیت ضداکسیدانی بالا خدمت کند و پتانسیل توسعه به‌عنوان غذاهای سلامت را دارند (۱۹). نتایج مطالعه Samart و همکاران که در سال ۲۰۱۴ صورت گرفت فعالیت آنتی‌اکسیدانی ژلاتین آبکافت پوست unicorn leatherjacket تهیه شده با پروتئاز خارج سلولی باسیلوس (GH-H11) و آلکالاز (GH-AI) در درجه آبکافت ۴۰-۱۰٪ میزان مهار رادیکال آزاد GH-AI و GH-H11 خوبی را نشان داد و عنوان کردند آبکافت ژلاتین (GH) با استفاده از پروتئاز خارج سلولی باسیلوس می‌تواند به عنوان منبع بالقوه از آنتی‌اکسیدانی طبیعی عمل کنند که از اکسیداسیون در سیستم‌های مواد غذایی و بیولوژیکی جلوگیری کند (۱۷).

در مطالعه حاضر ژلاتین آبکافت پوست گربه ماهی (*A. thalassinus*) درصد کلاته کردن یون آهن فرو خوبی را نشان می‌دهد این نتایج پیشنهاد می‌دهند که پپتیدهای حاصل از آبکافت ژلاتین پوست گربه ماهی می‌تواند به عنوان

- ۲- طاهری، ع.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع.، حبیبی رضایی، م. (۱۳۹۱): بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت ساردین پهلوظلایی (*Sardinella gibbossa*) با استفاده از روش سطح پاسخ. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی. ۸ (۳): ۲۶۲-۲۷۰.
- 3- Arteaga, G.E., Li-Chan, E., Vazquez-Arteaga, M.C., Nakai, S. (1994): Systematic experimental designs for product formula optimization. *Food Sci. Technol.* 5(8):43-54.
- 4- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., Gómez-Guillén, M. (2011): Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *Food Sci. Technol.* 44(2):407-413.
- 5- Canettieri, E.V., Rocha, G.J., Carvalho, J.A., Silva, J.B. (2007): Optimization of acid hydrolysis from the hemicellulosic fraction of *Eucalyptus grandis* residue using response surface methodology. *Bioresource Technol.* 98(2):422-428.
- 6- Fang, X., Xie, N., Chen, X., Yu, H., Chen, J. (2012): Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and Bioprocess Technology* 90(4): 676-682.
- 7- 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(2):123-131.
- 8- Giménez, B., Gómez-Guillén, M., López-Caballero, M., Montero, M. (2011): Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative source: A review. *Food Hydrocolloid.* 25(8):1813-1827.
- 9- Gutierrez, M.E., Garcia, A.F., Madariaga, M.A.D, Sagrista, M.L., Casado, F.J., Mora, M. (2003): Interaction of tocopherols and phenolic compounds with membrane lipid components. Evaluation of their antioxidant activity in a liposomal model system. *Life Sci.* 72(21): 2337-2360.
- 10- Jamilah, B., harvinder, K.G. (2011): Properties of gelatins from skins of fish Black tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and red tilapia (*Oreochromis nilotica*). *Food Chem.* 77(1):81-84.
- 11- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Shahidi, F. (2012): Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: Antioxidant activity and its potential in model systems. *Food Chemistry.* 135(3): 1118-1126.
- 12- Koli, J.M., Basu, S., Nayak, B., Patange, S., Pagarkar, A., Gudipati, V. (2012): Functional characteristics of gelatin extracted from skin and bone of Tiger-toothed croaker (*Otolithes ruber*) and Pink perch (*Nemipterus japonicus*). *Food bioprocess. Technol.* 90(3): 555-562.
- 13- Liu, H.L., Chiou, Y.R. (2005): Optimal decolorization efficiency of Reactive Red 239 by UV/TiO₂ photocatalytic process coupled with response surface methodology. *Chem. Eng. J.* 112(1-3):173-179.
- 14- Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K. (2005): Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J. Agric. Food Chem.* 53(3):581-587.
- 15- Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Park, J.W., Kim, S.K. (2010): In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J. Functional food.* 2(2):107-117.
- 16- Phanturat, P., Soottawat, B., Visessanguan, W., Roytrakul, S. (2010): Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Food Science and Technology.* 43: 86-97.
- 17- Samart, S. U., Soottawat, B., Punanee, S., Hideki, K. (2014): Antioxidant activity of gelatin hydrolysate produced from fish skin gelatin using extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Processing and Preservation.*
- 18- Yang, J.L., Liang, W.S., Chow, C.J., Siebert, K.J. (2009): Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochem.* 44(10):1152-1157.
- 19- Zhang, Y., Duan, X., Zhuang, Y. (2012): Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. *Peptides.* 38(1): 13-21.