اثر زمان هیدرولیز آنزیمی، درجه حرارت و نسبت آنزیم به سوبسترا روی خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از میگو

بهاره شعبانپور[1]، معظمه کردجزی[2*]، خاطره نظری[3]، مینا اسمعیلی خاریکی[4]

١- دکتری، استاد گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٢- دکتری، استادیار گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٣- کارشناسی ارشد فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
٤- دانشجوی دکتری گروه شیلات، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس

(تاریخ دریافت: ٩٣/١١/١٣ تاریخ پذیرش: ٩٣/١٢/٢٣)

چکیده

پوست، استخوان، اسکلت، سر و دم ماهی و میگو از جمله ضایعاتی هستند که طی فراوری تولید می شوند. این ضایعات می توانند هیدرولیز آنزیمی شده و به واحدهایی با خواص کاربردی سودمند تبدیل گردند. در این راستا پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) توسط آنزیم فلاورزایم تهیه گردید و از روش سطح پاسخ بر اساس ١٨ تیمار تعیین شده جهت بررسی اثر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان روی پروتئین استفاده شد. آزمایش های مربوط به ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با سه روش ارزیابی قدرت دفع رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسیل و قدرت احیای آهن انجام شدند. به طور کلی فرآورده‌های تولیدی پاسخ بهتری به دفع رادیکال DPPH در مقایسه با قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل و قدرت احیای آهن نشان دادند. از میان تیمارهای تولید شده، تیمار ٧ (دما ٥٤/٠٦ درجه سانتی‌گراد به همراه نسبت آنزیم به سوبسترا ١/٦١٪ و مدت زمان ١٠٥/٨ دقیقه) با درجه هیدرولیز (٣٣/٥٪) و محتوی پروتئین (٧٩/٥٪) به عنوان تیمار بهینه بر اساس بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی برگزیده شد. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از میگو می تواند در صنایع غذایی مفید باشد.

کلید واژگان: فلاورزایم، سطح پاسخ، آنتی‌اکسیدانی، میگوی ببری سبز

* مسئول مکاتبات: kordjazi.m@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

۱- مقدمه

ارزش بازار پسندی میگو غالباً به دلیل ظاهر و رنگ جذاب و گیرای آن است. رنگدانه اصلی میگوها آستاگزانتین است که یکی از مهمترین رنگدانه‌های کاروتنوئیدی بوده و بافت را رنگ قرمز- نارنجی می‌کند. علاوه بر رنگ، کاروتنوئیدها برای داشتن نقش بسیار مهمی که در سلامتی انسان به عنوان آنتی-اکسیدان‌های زیستی، محافظت‌کننده سلول‌ها و بافت‌ها در برابر آسیب رادیکال‌های آزاد و اکسیژن تک مولکولی بازی می‌کنند، مورد توجه هستند [۱].

میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) یک گونه اقیانوس هند و آرام است [۲، ۳] که محیط زیست آن به طور گسترده در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری جهان، به ویژه در جنوب شرقی آسیا است [٤]. این گونه کفزی بوده و در بسترهای سنگی اعماق ۲ تا ۱۳۰ متری یافت می‌شود [٥]. گونه میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) بالغ بر ۸۰ درصد صید کشتی‌های صیادی استان بوشهر در خلیج فارس را تشکیل می‌دهد. صید تجارتی این گونه از اوایل دهه ٦۰ و از سواحل ایرانی خلیج فارس آغاز شد [٦] که به دلیل داشتن مقادیر فراوان پروتئین و مواد معدنی و دربرداشتن توازن خوبی از آمینواسیدها منبع غذایی ارزشمندی به حساب می‌آید [۱].

ضایعات جامد حاصل از عمل‌آوری میگو شامل ۲۰ تا ۳۰ درصد ماده خشک است که مهمترین مواد موجود در آن پروتئین (حدود ۳۰٪ از این ماده خشک بافت پروتئینی است)، مواد معدنی و کیتین هستند [۷]. هرچند ترکیب تقریبی برای ضایعات میگو بستگی به نحوه فرآوری آن دارد؛ برای مثال در مقایسه با روش دستی پوست کنی، روش مکانیکی پوست کنی میگو، گوشت بیشتری را در ضایعات برجای میگذارد و اغلب مقدار پروتئین بیشتری در ضایعات شامل می‌شوند. به علاوه ترکیب تقریبی می‌تواند بر اساس نوع گونه و فصل به اندازه تغذیه متفاوت باشد. به هر حال مقادیر بالای پروتئین در ضایعات میگو پتانسیل زیادی برای تبدیل این ضایعات غیر قابل استفاده به مواد با ارزش افزوده ایجاد می‌کند [۸].

پروتئین هیدرولیز شده را می‌توان به عنوان افزودنی خوراکی در تهیه غذای آبزیان برای ثبات کیفیت غذاها در طی فرآوری و انبار کردن به کار برد. بر اساس پژوهش‌های صورت گرفته، گزارش شده است که پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده از مواد اولیه متفاوت و با استفاده از پروتئازهای متنوع، به عنوان اجزایی از محصولات آرایشی و بهداشتی، منبع پپتونی در محیط کشت باکتریایی [۹] و مکمل های غذایی خوبی در فعالیت های متابولیکی مختلف هستند [۱۰]. انتخاب آنزیم مناسب بسیار مهم است زیرا آنزیم‌های متفاوت اختصاصات متفاوتی داشته و محصولاتی با ویژگی‌های متفاوت ایجاد می-کنند [۱۱]. در بیشتر موارد، برای تولید پروتئین هیدرولیزشده از ماهی، پروتئازهای قلیایی (مانند آلکالاز) و خنثی (مانند فلاورزایم، نئوتراز) به دلیل ایجاد تلخی کمتر در محصول نهایی نسبت به پروتئازهای اسیدی (مانند پپسین) ارجحیت بیشتری دارند [۱۲].

روش سطح پاسخ، راه سودمندی برای تحقیق روی فرآیندهای پیچیده است که به طور موفقیت‌آمیزی برای بهینه‌سازی شرایط فرآیندها به کار گرفته شده‌است. آنالیز سطح پاسخ اثر متغیرهای مستقل را به تنهایی یا به صورت ترکیبی در فرآیند نشان می‌دهد و یک مدل ریاضی فراهم می‌کند که به شکل دقیقی همه فرآیند را توصیف می‌کند [۱۳، ١٤].

بنابراین، با توجه به افزایش جمعیت جهان که نیاز به مواد پروتئینی را افزایش داده و همچنین پتانسیل بالای تولید پروتئین هیدرولیز شده آبزیان در کشور، این پژوهش از ضایعات (سرسینه) میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) برای تولید پروتئین هیدرولیز شده انجام گرفته است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- میگوی ببری سبز

ضایعات میگوی ببری سبز در سال ۱۳۹۰ به میزان ۱۰ کیلو-گرم از کارخانه فرآوری احرار واقع در استان بوشهر تهیه شده و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. سپس به آزمایشگاه فرآوری دانشکده شیلات و محیط زیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گشتند. آنزیم مورد استفاده در این تحقیق فلاورزایم (۱۰۰۰ لیتر) بود که از باکتری *Aspergillus oryzae* بدست می آید و از شرکت نووازیم دانمارک در ایران تهیه و تا شروع آزمایش در درجه حرارت ٤ درجه سانتیگراد نگهداری شد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده میگو

نمونه‌های چرخ شده و بسته‌بندی شده، در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجماد زدایی و به میزان ۵۰ گرم توزین گردیده و در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند، سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت وزنی حجمی ۱:۲) به هر ارلن مایر حاوی نمونه اضافه شده، و به مدت ۲۰ دقیقه در بن‌ماری با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیر فعال نمودن آنزیم‌های داخلی نمونه خام حرارت دهی شدند [۱۵]. pH محلول‌های تهیه شده اندازه‌گیری شده و با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال و یا هیدروکلریک اسید ۲ مولار به pH مورد نظر (فلاورزایم ٦/۳) رسانده شدند. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور در دمای مورد نظر (جدول ۱) برای انجام آزمایش‌ها با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند؛ پس از اینکه دمای نمونه به دمای مورد نظر رسید و درجه حرارت انکوباتور ثابت شد، آنزیم به مقادیر مشخص بر اساس اطلاعات جدول ۱ با میکروسمپلر به ارلن مایرهای حاوی مخلوط ماده خام اولیه و آب مقطر تزریق شدند. پس از هر نمونه‌گیری (نمونه‌گیری‌ها به صورت تصادفی انجام شدند) و در پایان آزمایش به منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها در بن ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه حرارت‌دهی شدند [۱۵، ۱٦]. ارلن مایرهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از یخ تا رسیدن به دمای محیط سرد و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. با استفاده از سمپلر، مایع رویی[1] آن‌ها جمع‌آوری گردیده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع آزمایش‌ها نگهداری شدند. پس از آن با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی[2] بصورت پودر آماده گردیدند [۱۷]. تولید پروتئین هیدرولیز شده از هر تیمار تعیین شده برای هر آنزیم (برای هر آنزیم ۱۸ تیمار تعیین شد)، بر اساس طرح آماری سطح پاسخ با یک تکرار انجام شد.

۲-۳- درجه هیدولیز

میزان هیدرولیز تری کلرواستیک اسید[3] اندازه گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ مخلوط گردیده، سپس با دور g ٤۵۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با استفاده از روش استاندارد[4] اندازه‌گیری و درصد هیدرولیز از طریق معادله ۱ محاسبه گردید [۱۸].

معادله ۱:

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-٤- تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی

۲-٤-۱- قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH

با استفاده از روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) با اندکی تغییرات درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH برای تیمار-های فلاورزایم اندازه‌گیری شد. بر اساس این روش ۱/۵ میلی-لیتر از محلول واکنش را با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH در اتانول ۹۵٪ با غلظت ۰/۱ میلی‌مول که محلولی بنفش رنگ است به صورت چرخشی مخلوط و سپس ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوباسیون گردیدند. پس از این مدت زمان جذب نمونه‌ها در ۵۱۷ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت گردید. نمونه شاهد نیز به همین ترتیب تهیه شد، فقط به جای نمونه محلول پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده گردید. سپس با استفاده از معادله زیر درصد دفع رادیکال آزاد DPPH محاسبه شد [۱۹].

معادله ۲:

۱۰۰ × {جذب نمونه شاهد / (جذب نمونه − جذب نمونه شاهد)} = درصد بازدارندگی

۲-٤-۲- قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل

با استفاده از روش چونگ و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییرات قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل اندازه‌گیری

1. Supernatant
2. Freeze Dryer
3. TCA
4. AOAC

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

گردید. طبق این روش ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن آبدار ($FeSO_4.7H2O$) با غلظت ۱۰ میلی‌مول را با ۲۰۰ میکرو-لیتر EDTA با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۲۰۰ میکرولیتر دی‌اکسی-ریبوز با غلظت ۱۰ میلی‌مول، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پروتئین هیدرولیز شده رقیق شده و ۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH ۷/٤) به خوبی مخلوط گردیده، سپس ۲۰۰ میکرو-لیتر H_2O_2 با غلظت ۱۰ میلی‌مول به آن افزوده و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ٤ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۱ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲/۸٪ و ۱ میلی‌لیتر تیوباربیتوریک اسید ۲۰ میلی‌مول به آن اضافه نموده و به خوبی مخلوط گردید. سپس نمونه را در حمام آبی با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و پس از آن با غوطه‌وری در مخلوط آب و یخ به مدت ۵ دقیقه ظروف حاوی نمونه‌ها سرد و جذب آن‌ها در ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. و با استفاده از معادله ۲ درصد دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل محاسبه شد. در نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده گردیده است [۲۰].

۲-٤-۳- قدرت احیای آهن (Fe^{3+} به Fe^{2+})

بر اساس روش ایاایزو (۱۹۸٦) مقدار ۱ میلی‌لیتر از پروتئین هیدرولیز شده رقیق شده را با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (غلظت ۰/۲ مول و pH ٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم هگزانوفرات آبدار ۱٪ مخلوط کرده سپس محلول تهیه شده در تاریکی و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون گردید. در مرحله بعد ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به ظروف حاوی مخلوط واکنش اضافه و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون گردیدند. پس از آن ۲/۵ میلی‌لیتر از مخلوط تهیه شده با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلریدفریک آبدار ۰/۱٪ به خوبی مخلوط کرده و جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر با اسپکتروفتومتر قرائت، و با استفاده از معادله ۲ درصد احیای آهن محاسبه گردید. در تهیه نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیز شده از آب مقطر استفاده شده است [۲۱].

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایشات براساس روش کاملاً تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی CCD شامل چهار تکرار در نقطه مرکزی (r)، 2^n نقطه فاکتوریل و 2n نقطه محوری (n=۳) و جمعاً ۱۸ تیمار انجام شد. مقدار α (فاصله نقاط محوری از مرکز طرح و مقادیر کدگذاری شده) ۱/٦۸۲ محاسبه شد. سطوح آزمون و مقادیر واقعی بر اساس رابطه تبدیل مقادیر کدگذاری شده بدست آمدند و در جدول ۱ ثبت شدند. در این روش هر متغیر مستقل در ۵ سطح مورد آزمون قرار می‌گیرد.

جدول ۱ مقادیر عوامل متغیر برای آنزیم فلاورزایم

متغیرها	+α	+1	0	-1	-α
نسبت آنزیم به سوبسترا (٪) (X_1)	٤	۳/۳۹	۲/۵	۱/٦۱	۱
دما (°C) (X_2)	۷۰	٦۵/۹٤	٦۰	۵٤/۰٦	۵۰
زمان (دقیقه) (X_3)	۱۲۰	۱۰۵/۸	۸۵	٦٤/۲	۵۰

۲-٦- آنالیز داده های نتایج

برای تحلیل داده‌ها و بیان روابط بین متغیرها از تحلیل رگرسیونی استفاده شد. روش رگرسیون سطح پاسخ (RSREG)، با استفاده از نرم افزار آماری (SAS، نسخه ۹/۱) به منظور برازش معادله چند جمله‌ای زیر استفاده شد:

معادله ۳:

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

که در آن Y نشان دهنده متغیر تابع یا پاسخ (قدرت دفع رادیکال‌های آزاد DPPH)، β_0 (عرض از مبدأ) عدد ثابت، β_i، β_{ii} و β_{ij} ضرایب مدل رگرسیون و X_i و X_j، متغیرهای مستقل هستند. در روش RSREG، پارامترهای یک معادله درجه دوم

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

کامل که تشکیل سطح می‌دهند، بر داده‌ها برازش شده و مقادیر بهینه هریک از پارامترها و سطح حاصل از معادله درجه دوم بر داده‌های برازش داده شده، تعیین شد. سپس نمودارهای سطح پاسخ و کانتور، با استفاده از نرم افزار MATLAB، نسخه ٦/٥ رسم گردیدند.

٣- نتایج

٣-١- تأثیر نوع آنزیم

درجه هیدرولیز و خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم فلاورزایم مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در زیر ارائه شده است. نتایج سنجش درجه هیدرولیز مربوط به تیمارهای تولید شده با آنزیم فلاورزایم معادل ٣٣/٥٪ است.

٣-٢- بهینه‌سازی فرآیند هیدرولیز پروتئین

٣-٢-١- بررسی مدل‌های برازش شده

نتایج به دست آمده از آزمایش‌ها بر روی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم به صورت مقادیر پاسخ در طرح مرکب مرکزی در جدول ٢ نشان داده شده است. دستورالعمل RSREG در نرم افزار SAS به منظور برازش معادله چند جمله ای درجه دوم برای داده‌های آزمایشی استفاده شد.

تمام ضرایب ساده (X_1، X_2، X_3)، درجه دوم (X_{11}، X_{22}، X_{33}) و اثرات همزمان آن‌ها (X_{21}، X_{31}، X_{32}) برای بررسی معنی دار بودن با آزمون t محاسبه و ضرایب برآورد شده برای مدل‌های رگرسیونی هر یک از نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان واکنش بر ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی در جدول ٣ ارائه شده است. به منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برازش شده، تمام ضرایب فاقد معنی ($P>٠/٠٥$) حذف شدند و ضرایب معنی‌دار به صورت مدل در جدول ٤ نشان داده شده است. همچنین معنی‌داری و اعتبار مدل پیش از استفاده بررسی شد تا صحت و اثر بخشی مدل تعیین شود.

٣-٣- پلات‌های سطح پاسخ و اثر فاکتورها

بعد از تشخیص اعتبار مدل به لحاظ آماری، می‌توان آن را به منظور آنالیز و برآورد اثر سطوح مختلف متغیرها بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی به کار برد. روش‌های گرافیکی (دو و سه بعدی) به منظور تعیین اثرات متغیرها و اثرات متقابل احتمالی آنها بر خواص آنتی‌اکسیدانی محصول به کار می‌روند. رسم نمودار سطح پاسخ ارتباط بین متغیرهای مستقل و متغیر وابسته را نشان می‌دهد. با مطالعه این نمودارها و سطوح پاسخ، نواحی مطلوب نمودار بر اساس خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی شناسایی می‌شود و می‌توان بهینه سازی نهایی را انجام داد.

٣-٣-١- اثر شرایط مختلف تولید بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم فلاورزایم

آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH (جدول ٥) نشان می‌دهد که اثر دو متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای واکنش معنی‌دار شده است ($p<٠/٠٥$).

٣-٣-٢- تأثیر شرایط مختلف تولید بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم فلاورزایم

همان‌گونه که نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ٤) اثرات همزمان مقدار آنزیم و دما نمایان است در مقادیر حداقل مقدار آنزیم ودما قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل حداکثر می‌باشد. آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل (جدول ٥) نشان می‌دهد که اثر دو متغیر زمان و دمای واکنش معنی‌دار شده است ($p<٠/٠٥$). نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ٥) اثرات همزمان مقدار آنزیم و زمان بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل نشان دهنده افزایش قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل در مقابل افزایش زمان واکنش تا محدوده نقاط مرکزی می‌باشد و آنچنان‌که مشاهده می‌گردد مقدار آنزیم تأثیری بر قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده میگو ندارد. نمودارهای (شکل ٦) اثرات همزمان دما و زمان نشان می‌دهند که با افزایش همزمان هر دو متغیر دما و زمان تا محدوده نقاط مرکزی قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل افزایش می‌یابد و پس از آن با افزایش همزمان دما و زمان واکنش، قدرت آنتی-رادیکالی فرآورده کاهش می‌یابد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

جدول ۲ طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگوی ببری سبز با استفاده از آنزیم فلاورزایم و درجه هیدرولیز

مشاهدات	X_1	X_2	X_3	Y_1	Y_2	Y_3	DH
۱	۱	۱	۱	۸۹/٤	۹۰/٥	۳٥/۷	۱٤/۸
۲	۱	۱	−۱	۸۱/۳	۸۸/۸	٤۰/۹	۱۱/٤
۳	۱	−۱	۱	۹٥/۸	۹۱/۲	۱٦/۳	۲٤/۸
٤	۱	−۱	−۱	۸۹/٤	۸۹/۹	۳۱/۱	۱۸/٦
٥	−۱	۱	۱	۹۳/٤	۸۷/۱	۳۳/۳	۲۱/٥
٦	−۱	۱	−۱	۹۱/٤	۸٦/٥	۳۸/۸	۱۷
۷	−۱	−۱	۱	۸٦/۱	۹۱/۱	٤۹/۷	۳۳/٥
۸	−۱	−۱	−۱	۹۱/۲	۹۱/۷	۲٦/۸	۳۳
۹	۰	۰	۱/٦۸۲	۸٤/۲	۸۹/۲	٤۳/۲	۳۰/۱
۱۰	۰	۰	−۱/٦۸۲	۸۹/٦	۹۰/٤	۳۱/۹	۳۱
۱۱	۰	۱/٦۸۲	۰	۹۰	۸۸/٦	٤۷/٥	۲۰/۸
۱۲	۰	−۱/٦۸۲	۰	۹۳/۸	۹۲/٤	۱٦/۸	۲٤/٥
۱۳	۱/٦۸۲	۰	۰	۹۳/٥	۹۱/۷	۳۳/۷	۱۰/۸
۱٤	−۱/٦۸۲	۰	۰	۹۱/۲	۹۲/۲	۲٦/۸	۳۲/۹
۱٥	۰	۰	۰	۸٤/۹	۹۲/۹	۱٦/٦	۳۳/٥
۱٦	۰	۰	۰	۸۸/۲	۹۱/۷	۲۱/٤	۳۰/۷
۱۷	۰	۰	۰	۸٥/۲	۹۲/۱	۱۷/۸	۲۸/۹
۱۸	۰	۰	۰	۸۲/۳	۹۲/۹	۱۲/۸	۳۲/٦

X_1 (نسبت آنزیم به سوبسترا، ٪)، X_2 (دما، درجه سانتی‌گراد)، X_3 (زمان، دقیقه)، Y_1 (قدرت دفع رادیکال DPPH، ٪)، Y_2 (قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل، ٪)، Y_3 (قدرت احیای آهن، ٪)

جدول ۳ ضرایب معادله چند جمله‌ای برازش شده برای پاسخ‌های مختلف

آنزیم	پارامتر	Y_1	Y_2	Y_3
	عرض از مبدأ	۸٥/۱۹۸۱۸۳*	۹۲/٤٥۲۳٦٤*	۱۷/۱٦۲۹٦۲*
	X_1	−۰/۱۷۱۲۰۱	۰/۲۳۱٥۹۰	−۰/۹٥۳۳۳۰
	X_2	−۰/۹۸۰۸۸٦	−۱/۲۷٤۰۳۸*	٥/٥۹۷٤٤٤*
	X_3	۰/۱۷۰٦۱٤	۰/۰۷۲۱۱٥	۱/۲۰۰۷٥۰
فلاورزایم	X_{11}	۲/۳٤۱٦۹۹*	−۰/۳۸٦۹۲۳	٤/٥۸٥۱۳۱
	X_{21}	−۲/۷٥۰۰۰۰*	۰/۹۲٥۰۰۰*	٤/۲۰۰۰۰۰
	X_{22}	۲/۱۸۲۲٦۱*	−۰/۹۰۰٦۷۱*	٥/۲٥۸۳۱۷*
	X_{31}	۲/۲۰۰۰۰۰*	۰/۳۷٥۰۰۰	−٤/٦۷٥۰۰۰
	X_{32}	۱/۱۰۰۰۰۰	۰/۲۰۰۰۰۰	−۲/۳٥۰۰۰۰
	X_{33}	۰/٤۱۰۷۱۹	−۱/۱٤۸٦٨٦*	۷/۱۷۱٥۸۲*

* معنی دار $p \leq 0.05$

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

جدول ٤ مدل سطح پاسخ

آنزیم	پاسخ‌ها	معادله چند جمله‌ای	R^2	P-Value
فلاورزایم	Y_1	$Y_1\ (\%) = 85.198 + 2.341X_1^2 - 2.750X_2*X_1 + 2.182X_2^2 + 2.200X_3*X_1$	٠/٧٨٩	٠/٠٥٢
	Y_2	$Y_2(\%) = 92.452 - 1.274\ X_2 + 0.925\ X_2*X_1 - 0.900\ X_2^2 - 1.148X_3^2$	٠/٨٧٠	٠/٠٠٩
	Y_3	$Y_3\ (\%) = 17.162 + 5.597\ X_2 + 5.258\ X_2^2 + 7.171\ X_3^2$	٠/٧٨٦	٠/٠٥٤

X_1 (نسبت آنزیم به سوبسترا، ٪)، X_2 (دما، درجه سانتی‌گراد)، X_3 (زمان، دقیقه) Y_1 (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، ٪)، Y_2 (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، ٪)، Y_3 (قدرت احیای آهن، ٪)

جدول ٥ آنالیز واریانس (ANOVA) اثر ساده متغیرها بر ویژگی‌های مورد آزمایش

آنزیم	پاسخ‌ها	متغیر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	سطح F	سطح P
فلاورزایم	Y_1	X_1	٤	١٦٨/٧٧٧	٤٢/١٩٤	٥/٤٦٤	٠/٠٢٠
		X_2	٤	١٤٣/٣٦٩	٣٥/٨٤٢	٤/٦٤١	٠/٠٣١
		X_3	٤	٥٠/٩٢٤	١٢/٧٣١	١/٦٤٩	٠/٢٥٣
	Y_2	X_1	٤	١٠/٥٨٩	٢/٦٤٧	٢/٦٤٥	٠/١١٢
		X_2	٤	٣٩/٥٤٣	٣/٨٨٥	٩/٨٧٨	٠/٠٠٣
		X_3	٤	١٨/١٥٧	٤/٥٣٩	٤/٥٣٥	٠/٠٣٣
	Y_3	X_1	٤	٥٩٣/٥١٠	١٤٨/٣٧٧	٢/٥٢٠	٠/١٢٣
		X_2	٤	٩٦١/٥٢٦	٢٤٠/٣٨١	٤/٠٨٢	٠/٠٤٣
		X_3	٤	٨٨٧/٣٤٥	٢٢١/٨٣٦	٣/٧٦٧	٠/٠٥٢

X_1 (نسبت آنزیم به سوبسترا، ٪)، X_2 (دما، درجه سانتی‌گراد)، X_3 (زمان، دقیقه) Y_1 (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، ٪)، Y_2 (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، ٪)، Y_3 (قدرت احیای آهن، ٪)

جدول ٦ آنالیز واریانس (ANOVA) پاسخ متغیرهای وابسته

آنزیم	پاسخ‌ها	منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات	R^2	سطح F	سطح P
فلاورزایم	Y_1	مدل رگرسیون	٩	٢٣١/٦٨٤	٠/٧٨٩	٣/٣٣٤	٠/٠٥٢
		ساده	٣	١٣/٩٢٥	٠/٠٤٧	٠/٦٠١	٠/٦٣٢
		درجه دوم	٣	١٠٨/٨٥٩	٠/٣٧٠	٤/٦٩٩	٠/٠٣٥
		همزمان	٣	١٠٨/٩٠٠	٠/٣٧١	٤/٧٠١	٠/٠٣٥
	Y_2	مدل رگرسیون	٩	٥٣/٦٦٢	٠/٨٧٠	٥/٩٥٨	٠/٠٠٩
		ساده	٣	٢٢/٩٥٠	٠/٣٧٢	٧/٦٤٤	٠/٠٠٩
		درجه دوم	٣	٢٢/٤٢٢	٠/٣٦٣	٧/٤٦٨	٠/٠١٠
		همزمان	٣	٨/٢٩٠	٠/١٣٤	٢/٧٦١	٠/١١١
	Y_3	مدل رگرسیون	٩	١٧٣٦/١٥٨	٠/٧٨٦	٣/٢٧٦	٠/٠٥٤
		ساده	٣	٤٥٩/٥٨٤	٠/٢٠٨	٢/٦٠١	٠/١٢٤
		درجه دوم	٣	٩١٦/٤٢٩	٠/٤١٥	٥/١٨٧	٠/٠٢٧
		همزمان	٣	٣٦٠/١٤٥	٠/١٦٣	٢/٠٣٩	٠/١٨٧

X_1 (نسبت آنزیم به سوبسترا، ٪)، X_2 (دما، درجه سانتی‌گراد)، X_3 (زمان، دقیقه) Y_1 (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، ٪)، Y_2 (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، ٪)، Y_3 (قدرت احیای آهن، ٪)

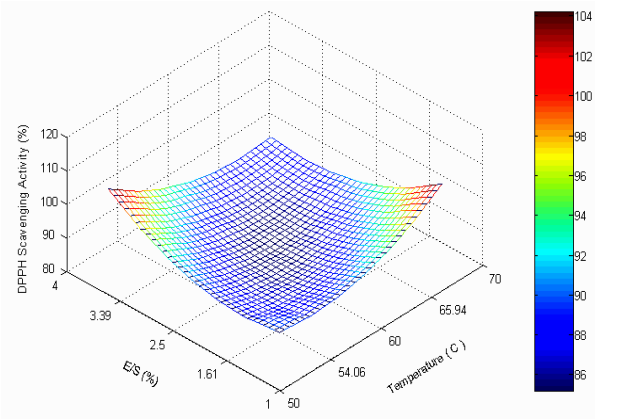
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

جدول ۷ آنالیز باقیمانده‌های مدل‌های رگرسیون

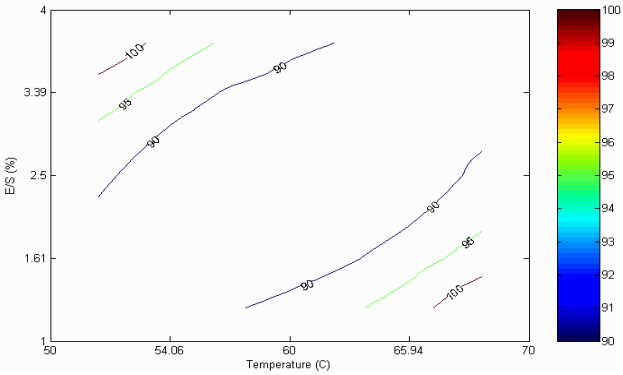
آنزیم	پاسخ	منابع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	سطح F	سطح P
فلاورزایم	Y_1	عدم برازش	۵	٤٤/۲۸۸	۸/۸۵۷	۱/۵۱۹	۰/۳۸۸
		خطای خالص	۳	۱۷/٤۹۰	۵/۸۳۰		
		خطای کل	۸	٦۱/۷۷۸	۷/۷۲۲		
	Y_2	عدم برازش	۵	٦/۹۲٦	۱/۳۸۵	۳/۸٤۸	۰/۱٤۸
		خطای خالص	۳	۱/۰۸۰	۰/۳٦۰		
		خطای کل	۸	۸/۰۰٦	۱/۰۰۰		
	Y_3	عدم برازش	۵	٤۳۳/۳۹۳	۸٦/٦۷۸	٦/۸۹٦	۰/۰۷۱
		خطای خالص	۳	۳۷/۷۱۰	۱۲/۵۷۰		
		خطای کل	۸	٤۷۱/۱۰۳	۵۸/۸۸۷		

X_1 (نسبت آنزیم به سوبسترا، ٪)، X_2 (دما، درجه سانتی‌گراد)، X_3 (زمان، دقیقه) Y_1 (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، ٪)، Y_2 (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، ٪)، Y_3 (قدرت احیای آهن، ٪)

همان‌گونه که در نمودار کانتور و نیز سطح پاسخ (شکل ۱) اثرات همزمان مقدار آنزیم و دما دیده می‌شود در مقدار ثابت و کم آنزیم با افزایش دما، افزایش قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده مشاهده می‌گردد. همچنین در دمای ثابت ٥٤/۰٦ درجه سانتی‌گراد با افزایش مقدار آنزیم قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز افزایش می‌یابد و مشاهده می گردد که افزایش همزمان دما و مقدار آنزیم بر قدرت دفع رادیکال DPPH اثر منفی دارد. آنچنان که در نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ۲) اثرات همزمان مقدار آنزیم و زمان، مشاهده می‌گردد قدرت دفع رادیکال DPPH با افزایش یا کاهش همزمان مقدار آنزیم و زمان واکنش از نقطه مرکزی، افزایش داشته است. نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ۳) اثرات همزمان دما و زمان نشان می‌دهد با افزایش و کاهش دما از نقطه مرکزی قدرت دفع رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز افزایش داشته و در این خصوص افزایش یا کاهش مدت زمان واکنش بی‌تأثیر بوده است.



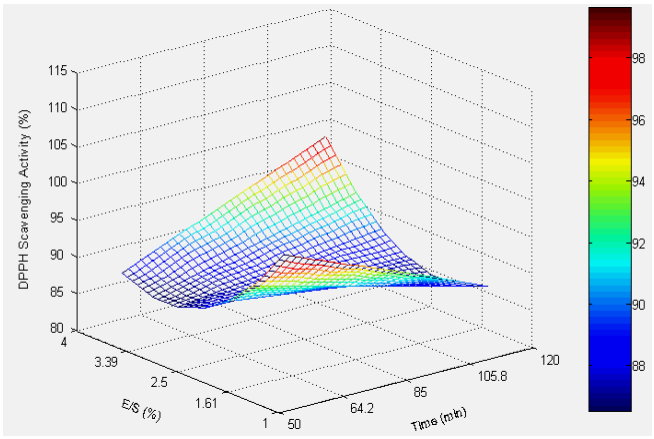
الف



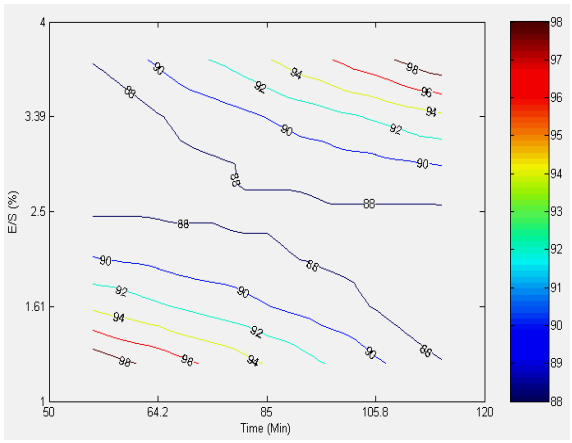
ب

شکل ۱ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دوبعدی (ب) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و دما بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

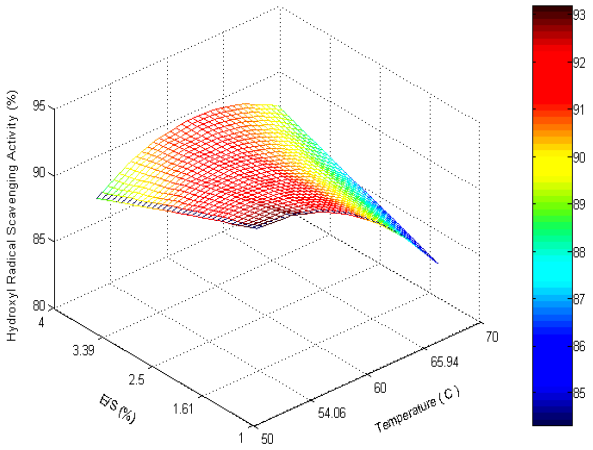


الف

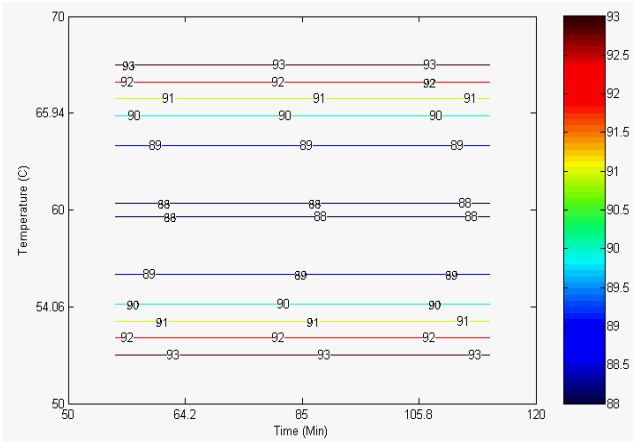


ب

شکل ۲ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و زمان بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم

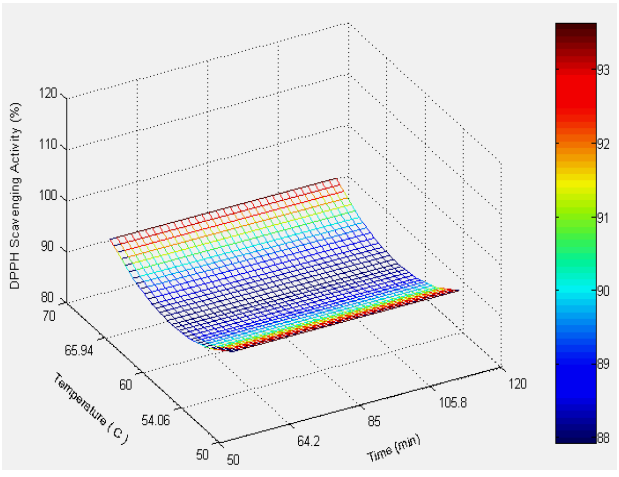


الف

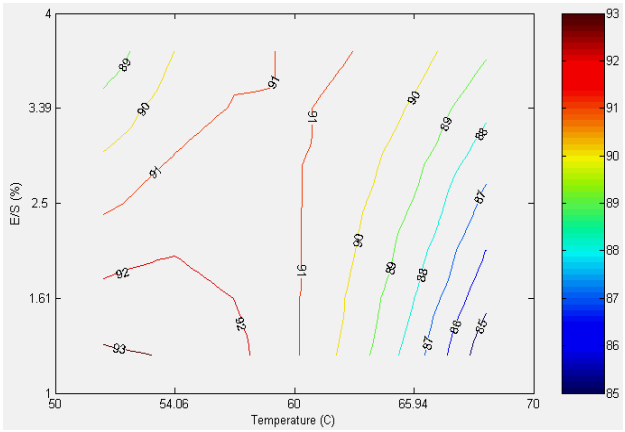


ب

شکل ۳ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان دما و زمان بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم



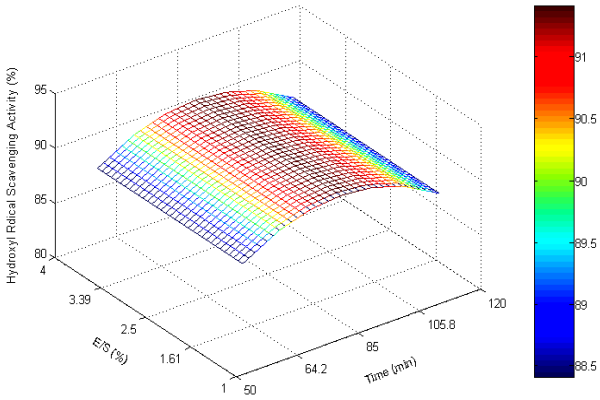
الف



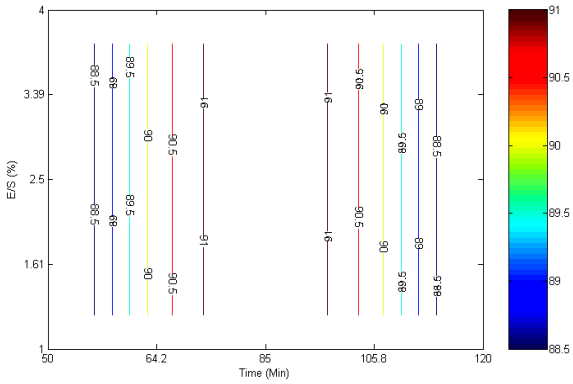
ب

شکل ٤ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و دما بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ضایعان میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]



الف

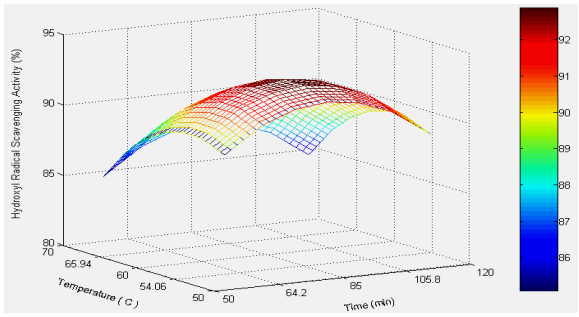


ب

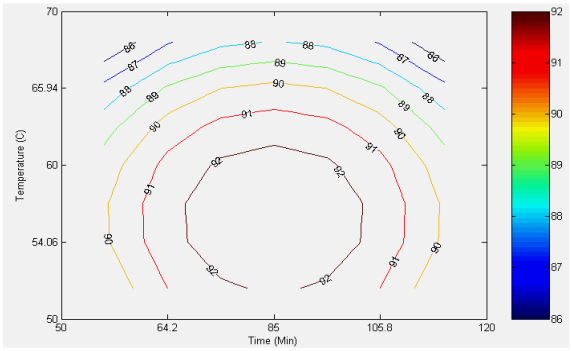
شکل ۵: سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و زمان بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم

۳-۳-۲- اثر شرایط مختلف تولید بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم فلاورزایم

آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت احیای آهن (جدول ۵) پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم نشان می‌دهد که اثر دو متغیر دما و زمان واکنش معنی‌دار شده است ($p<0/05$). نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ۷) نشان می‌دهد که با افزایش همزمان دما و زمان واکنش قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم افزایش یافته است. همچنین با افزایش دما در مدت زمان ثابت قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافته است.

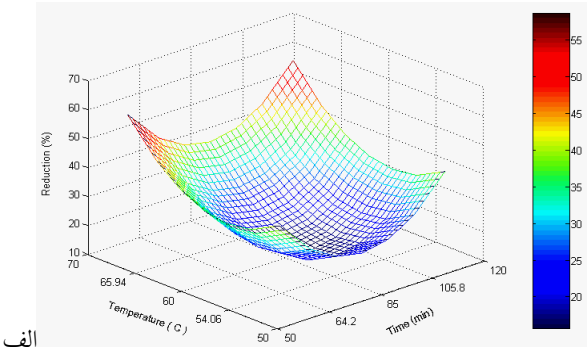


الف

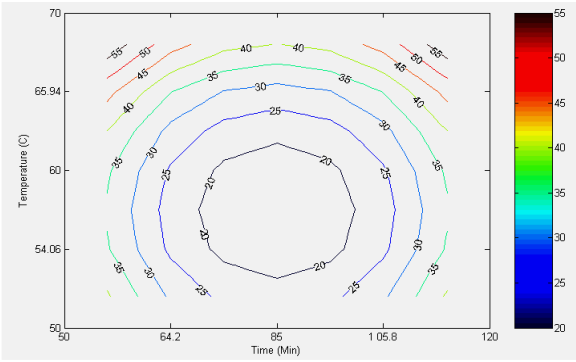


ب

شکل ٦ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان دما و زمان بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم



الف



ب

شکل ۷ سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دو بعدی (ب) تأثیر همزمان دما و زمان بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم فلاورزایم

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

جدول ٨ مقادیر عوامل متغیر در نقاط تیمار بهینه مربوط به آنزیم

مشاهدات	آنزیم	نسبت آنزیم به سوبسترا (٪)	دما (°C)	زمان (دقیقه)	مقادیر پاسخ (٪)
٧	فلاورزایم	١/٦١	٥٤/٠٦	١٠٥/٨	٧٥/٦٣

٣-٤- انتخاب تیمار بهینه

با توجه به نتایج کمی حاصل از آزمایش‌های خواص آنتی-اکسیدانی (جدول ٢) تیمار بهینه تولید شده با آنزیم فلاورزایم انتخاب شد (جدول ٨).

٤- بحث

در سال های اخیر، فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز منابع پروتئینی مختلف، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند [٢٢]. از این رو، تولیدات آبی و ضایعات آن ها می توانند موارد خوبی از این پپتیدهای زیست فعال باشند [٢٣، ٢٤].

با بررسی که روی ماکرل و ماهی *Aphanopus carbo* انجام شد، محققین گزارش نمودند که قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده با افزایش مدت زمان واکنش افزایش می‌یابد که با پژوهش حاضر مطابقت ندارد، این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در ماده اولیه مورد استفاده یا شرایط مختلف به کار گرفته در فرآیند هیدرولیز مانند دما، مقدار آنزیم و نسبت آب به ماده خام ایجاد شده باشد. در پژوهش حاضر بالاترین درصد قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH برای پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم معادل ٩٥/٨٪ بوده است [٢٥، ٢٦]. در تحقیقی دیگر تاثیر آنزیم فلاورزایم در دفع رادیکال آزاد روی ماهی *Catla catla*، ٧٠/٤٥±٠/٣٥٪ گزارش شد [٢٤].

معادله‌های جدول ٣ نشان می‌دهند که هرسه متغیر بررسی شده یعنی نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان بر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH برای پروتئین هیدرولیز شده تولید شده با فلاورزایم تأثیر گذار است. در مجموع هیدرولیز شده‌ها با آنزیم فلاورزایم فعالیت بیشتری برای دفع رادیکال DPPH در مقایسه با رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای آهن از خود نشان دادند.

به طور کلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بستگی به پروتئاز به کار برده، ماده اولیه و شرایط به کار گرفته در آزمایش دارد، از اینرو نتایج بدست آمده همیشه موافق یکدیگر نبوده و گاهی حتی در تضاد با یکدیگرند [٢٦، ٢٧]. رادیکال هیدروکسیل یک اکسیدان اختصاصی برای لیپیدهاست و قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل توسط یک آنتی‌اکسیدان به طور مستقیم با پیشگیری از گسترش فرآیند اکسیداسیون لیپیدها مرتبط است [٢٦].

حداکثر قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل در نقاط مرکزی بوده است. یکی از نقاطی (تیمار مرکزی شماره ١٥) که حداکثر قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل (٩٢/٩٪) را نشان داده بر نقطه بالاترین درجه هیدرولیز (٣٣/٥٪) منطبق است. در پژوهش حاضر آنچنان‌که در معادله‌های جدول ٤ ارائه گردیده است فعالیت دفع رادیکال هیدروکسیل هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با هر سه متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و مدت زمان واکنش در ارتباط بوده و با افزایش هر سه متغیر تا رسیدن به نقطه مرکزی فعالیت بازدارندگی رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافته است. اما در مورد اثر مقدار آنزیم بر قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل معنی-دار نشده است ($p>0/05$) (جدول ٥).

در پژوهشی روی بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitirix*) با آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم، محققین دریافتند که پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم آلکالاز درصد دفع رادیکال هیدروکسیل بیشتری نسبت به فرآورده هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم از خود نشان داده است و اظهار داشتند که دلیل این امر می‌تواند مربوط به بالاتر بودن درجه هیدرولیز آلکالاز نسبت به فلاورزایم باشد. همچنین گزارش نمودند که رابطه مستقیمی بین فعالیت بازدارندگی رادیکال هیدروکسیل و مقدار آنزیم استفاده شده برای تولید پروتئین هیدرولیز شده وجود دارد [٢٨].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

نتایج حاصل از پژوهش حاضر نشان دادند که از میان تیمار-های تولید شده با آنزیم فلاورزایم بالاترین قدرت احیای آهن (۴۹/۷٪) در یکی ازنقاط حداکثر درجه هیدرولیز (تیمار ۷، ۳۳/۵٪) مشاهده شده است. در پژوهشی روی ماهی *A. carbo* مشخص شد که قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با افزایش درجه هیدرولیز آن به تدریج افزایش می‌یابد، که این موضوع ارتباط مستقیم بین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده و توانایی آن برای دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد را ارائه می‌دهد. در تحقیق حاضر در خصوص تیمارهای تولید شده با آنزیم فلاورزایم، دو عامل دما و زمان بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده مؤثر بوده-اند (جدول ٤) و اثر هر دو متغیر بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم معنی‌دار شده است ($p<۰/۰۵$) (جدول ۵) [۲۶].

در پژوهش حاضر همان‌گونه که بیان شد (شکل ۷)، افزایش دما سبب افزایش قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز شده است. افزایش دما سبب کاهش خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده می‌شود و این موضوع می‌تواند به دلیل ویژگی‌های حرارتی پروتئین سارکوپلاسمیک مورد استفاده باشد که این موضوع با یافته حاصل از پژوهش حاضر مطابقت ندارد و دلیل این امر می‌تواند تفاوت در ماهیت ماده اولیه مورد استفاده، شرایط مختلف به کار برده در فرآیند و نوع پروتئاز مورد استفاده باشد [۲۲].

در مورد تیمارهای تولید شده با آنزیم فلاورزایم تیمار ۷ و تیمار ۱۱ با اختلاف ناچیز ، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مطلوب هستند، اما با توجه به مقدار آنزیم و نیز دمای کمتر به کار گرفته در تیمار ۷ (جدول ۱)، این تیمار به عنوان تیمار بهینه برای پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم انتخاب شد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ضایعات میگوی ببری سبز با استفاده از آنزیم فلاورزایم، دارای مقادیر بالای پروتئین بوده، خواص آنتی-اکسیدانی مناسب دارد و می‌تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور به عنوان جایگزینی برای آرد ماهی پیشنهاد شود و همچنین می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرد.

در تحقیق حاضر اثر آنزیم پروتئاز تجاری فلاورزایم بر خواص آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده ضایعات سرسینه میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به نتایج تیمار های تولید شده، در خصوص خواص آنتی اکسیدانی، پاسخ بهتری به دفع رادیکال DPPH در مقایسه با دفع رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای آهن نشان دادند. همچنین تحقیق حاضر نشان داد که کاربرد روش سطح پاسخ جهت بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگوی ببری سبز روشی سودمند و دقیق می باشد. نتایج این پژوهش نشان می دهد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از آنزیم فلاورزایم دارای مقادیر بالای پروتئین بوده و خواص مناسب آنتی اکسیدانی دارد و می تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور به عنوان جایگزینی برای آرد ماهی پیشنهاد شود و همچنین می تواند به عنوان آنتی اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپید ها مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

[1]. Yanar, Y., Celik, M. and Yanar, M. 2004. Seasonal changes in total carotenoid contents of wild marine shrimps (*Penaeus semisulcatus and Metapenaeus monoceros*) inhabiting the eastern Mediterranean. Food Chemistry. 88: 267-269.

[2] Aktas, M., Kumlu, M. and Eroldogan, O. T. 2003. Off-season maturation and spawning of *Penaeus semisulcatus* by eyestalk ablation and/or temperature-photoperiod regims. Aquacalture, 228: 361-370.

[3] Yilmaz, A. B. and Yilmaz, L. 2007. Influences of sex and seasons on levels of heavy metals in tissues of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus* de Hann, 1844). Food Chemistry. 101: 1664-1669.

[4] Niamaimandi, N., Bin Arshad, A., Daud, S. K., Cheroos Saed, R. and Kiabi, B. 2007. Population dynamic of green tiger prawn, *Penaeus semisulcatus* (De Haan) in Bushehr coastal waters, Persian Gulf. Fisheries Research. 86: 105–112.

[5] FAO. 2005. Food and Agricalture Organisation of the United Nations. Year book of fishery statistics.

[6] Boerema, L. K. 1969. The shrimp resources in the Gulf between Iran and the Arabian Peninsula. FAO Fish Circular. No 310, 29 p.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

[7] Gildberg, A. and Stenberg, E. 2001. A new process for advanced utilisation of shrimp waste. Process Biochemistry, 36: 809–812.
[8] Cheung, I. W. Y. and Li-Chan, E. C. Y. 2010. Angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and bitterness of enzymatically-produced hydrolysates of shrimp (*Pandalopsis dispar*) processing byproducts investigated by Taguchi design. Food Chemistry. 122: 1003–1012.
[9] FitzGerald, R. J. and O'Cuinn, G. 2006. Enzymatic debittering of food protein hydrolysates. Biotechnology Advances, 24: 234-237.
[10] Betty, M., Awuor, O. L., Kirwa, M. E. and Jackim, M. F. 2014. Antioxidative and Functional Properties of *Rastrineobola argentea* (Dagaa*)* Fish protein hydrolysate. Discourse Journal of Agriculture and Food Sciences. 2: 180-189.
[11] Hou, H., Bafang, L., Xue, Z., Zhaohui, Z. and Pinglin, L. 2011. Optimization of enzymatic hydrolysis of Alaska pollock frame for preparingprotein hydrolysates with low-bitterness. Food Science and Technology. 44: 421-428.
[12] Hathwar, S. C., Bijinu, B., Rai, A. K. and Narayan, B. 2011. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. Applied Biochemistry and Biotechnology. 164:115–124.
[13] Diniz, F. M. and Martin, A. M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effects 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.
[14] Guerard, F., Sumaya-Martinez, M. T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufosse, L. 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. Process Biochemistry. 42: 1486–1491.
[15] Gue´rard, F., Dufosse´, L., De La Broise, D. and Binet, A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 11: 1051–1059.
[16] Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Accipenser persicus*) viscera. Food Chemistry. 115: 238-242.
[17] Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 40: 43–81.
[18] Hoyle, N. T. and Merritt, J. H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Food Science. 59: 76–79.
[19] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Agricultural and Food Chemistry. 40: 945-948.
[20] Chung, S. K., Osawa, T. and Kawakishi, S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61: 118–123.
[21] Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidantive activity of products of browning reaction. Japanese Journal of Nutrition. 44: 307–315.
[22] Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y. and Jun Xue, S. 2008. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. Food Science and Technology. 41: 1624-1632.
[23] Li, X., Luo, Y., Shen, H. and You, J. 2012. Antioxidant activities and functional properties of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) protein hydrolysates. Science of Food and Agriculture. 92: 292-298.
[24] Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B. A. 2013. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. J. Food Process. Pres. DOI: 10.1111/jfpp.12081.
[25] 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.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

[26] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M. and Nunes, M. L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Journal of Process Biochemistry. 45: 18-24.

[27] Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., and Kim, S. K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research Technology. 219: 20-26.

[28] Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). Food Chemistry. 107: 1485–1493.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]

Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides

Shabanpour, B. [1], Kordjazi, M. [2*], Nazari, Kh. [3], Esmaeili Khariki, M. [4]

1, 2, 3. Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
4. Tarbiat Modares University, Noor
(Received: 93/11/13 Accepted: 93/12/23)

Skin, bones, frames, heads and tails are by-products produced during the processing of fish and prawn. These by-products can be enzymatically hydrolyzed and be converted products with beneficial functional properties. So, Protein hydrolysates were prepared from green tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) waste using flavourzyme and response surface methodology (RSM) based on 18 treatments was applied to study the effect of enzyme to substrate ratio, temperature and time on the protein. The antioxidant activities were measured using 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH), hydroxyl radical-scavenging activity and ferric reducing antioxidant power. Totally, products have showen better response in 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) scavenging activity in comparison to hydroxyl radical-scavenging activity and Ferric (Fe^{3+}) reducing antioxidant activity.. Among the treatments produced, 7 treatment (hydrolysis temperature of 54.6 ^{0}C together with enzyme to substrate ratio of 1.61 % and hydrolysis time of 105.8 min) with degree of hydrolysis (33.5%) and protein (79.5%) were the optimum conditions to obtain the highest antioxidant properties. These results suggested that prawn waste protein hydrolysates could be useful in the food industry.

Keywords: Flavourzyme, Response surface, Antioxidant, *Penaeus semisulcatus*

*Corresponding Author E-Mail Address: kordjazi.m@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-16]