بهینه‌سازی عوامل مؤثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا به روش سطح پاسخ

مائده اعتمادی[1]، علیرضا صادقی ماهونک[2*]، محمد قربانی[2]، یحیی مقصودلو[2]

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۳/۰۷/۱٦ تاریخ پذیرش: ۹۳/۰۱۱/۰۵)

چکیده

هدف از انجام این پژوهش تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق هیدرولیز آنزیمی ایزوله پروتئین سویا بود. پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا از طریق هیدرولیز آنزیمی، توسط آنزیم آلکالاز L ۲,٤ تهیه گردید و عوامل موثر در هیدرولیز، جهت دست‌یابی به بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها توسط روش سطح پاسخ (RSM) با طرح مرکب مرکزی (CCD) با استفاده از نرم افزار Design Expertبهینه‌سازی شدند. اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم به عنوان سه متغیر مستقل در هیدرولیز، بر قابلیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید توسط معادله درجه دوم برازش گردیدند. مدل رگرسیونی مشخص کننده‌ی ناحیه ای با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بیش از ٦٢/٨ درصد) در شرایط بحرانی منطبق با دمای ٤٩/٧١ درجه سانتی گراد، زمان ١١٧/٤٥ دقیقه و فعالیت آنزیمی ٦٦/٢٧ واحد آنسون بر کیلوگرم بود. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا می تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و نیز استفاده های دارویی داشته باشد.

کلید واژگان: آنزیم آلکالاز، پروتئین هیدرولیز شده سویا، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز آنزیمی

* مسئول مکاتبات: sadeghiaz@gau.ac.ir

۱- مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها نقش حیاتی را در سیستم‌های غذایی، همچنین در بدن انسان جهت کاهش فرآیندهای اکسیداتیو ایفا می‌نمایند. آنتی‌اکسیدان‌ها سبب کاهش اکسیداسیون پروتئین همچنین واکنش میان کربونیل‌های مشتق شده از لیپیدها با پروتئین‌ها شده که نتیجه آن تغییر در ویژگی‌های عملکردی پروتئین-هاست[۱]. در سال‌های اخیر توجه به استفاده از آنتی‌اکسیدان-های طبیعی، منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیت آنتی-اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، پروتئین ماهی و... شده است. پروتئین سویا به دلیل ارزش تغذیه‌ای بالا و ویژگی‌های عملکردی عالی به عنوان یک ماده عملگر در شماری از فرآورده‌های غذایی مختلف مورد استفاده قرار می-گیرد [۲]. پپتیدهای متعددی از مواد غذایی پروتئینی به‌دست آمده است که دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بوده و فعالیت بیولوژیکی آن‌ها به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته است، این پپتیدها برای اولین بار توسط مارکوس مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۳]. پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاوی ۱۶-۵ اسیدآمینه هستند و ترکیبات سلامتی بخش و ایمنی بخش با وزن مولکولی پایین، هزینه تولید کم، فعالیت بالا و جذب آسان می-باشند. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء پروتئینی خاص که در درون توالی پروتئین مادر (اصلی) غیر فعال‌اند، در نظر گرفته می‌شوند و پس از اینکه این پپتیدها توسط هیدرولیز آنزیمی جدا شدند، ممکن است وظایف فیزیولوژیکی گوناگونی را ایفا نمایند. چندین مکانیسم جهت تشخیص ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدها وجود دارد که شامل خاصیت شلاته کنندگی یون‌های فلزی، به دام انداختن رادیکال آزاد و ایجاد آلدئید می‌باشد [۵،٤].

هیدرولیز پروتئین‌ها یکی از جدیدترین فن‌آوری‌ها برای تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده‌ی بالا می‌باشد و روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی جهت این منظور به کار گرفته می‌شوند. فرآیند کاربرد آنزیم‌های تجاری به جای فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است، زیرا کل فرآیند هیدرولیز کاملا تحت کنترل است و در نتیجه فرآورده-های با خواص مشخص تولید می‌شود. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست-فعال قوی می‌باشد. درمقایسه با آنزیم‌های با منشاء گیاهی و جانوری، آنزیم‌های میکروبی دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به تنوع خواص پروتئولیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف اشاره نمود [٦]. به طور کلی آنزیم Alcalase® 2.4 L به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه‌ی هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره‌ی پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است [۷].

سویا یکی از بیشترین گیاهان زراعی در جهان است که از نظر پروتئین (٤۰-۵۰٪)، چربی (۲۰-۳۰٪) و کربوهیدرات (۲٦-۳۰٪) غنی می‌باشد و در نتیجه مورد بحث تحقیقات علمی زیادی قرار گرفته است. مشابه با اغلب دانه‌های حبوبات، این دانه حاوی چندین پروتئین می‌باشد که اکثر آنها در سلامتی-بخشی و افزایش ارزش تغذیه‌ای غذاها موثر می‌باشند [۸]. در اجزاء هیدرولیز شده سویا و غذاهای تخمیری سویا، پروتئین‌ها تنها بخشی هستند که هیدرولیز می‌شوند زیرا اغلب پروتئازها قابلیت شکافتن گلیکوپروتئین‌ها، فسفوپروتئین‌ها و دیگر گونه-های تغییریافته را دارند. برخی از پپتیدهای کوچک دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی بوده که می توانند در جلوگیری از شماری از فرآیندهای اکسایشی مرتبط با بیماری‌ها در بدن انسان نقش داشته باشند [۹]. از این‌رو به منظور یافتن روش‌های جدید جهت استفاده‌ی بهینه از منابع و تبدیل آن به ماده‌ای با ارزش بالاتر نظیر پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی و دارای اثرات سلامتی بخش بالا این پژوهش صورت پذیرفته است.

بهینه‌سازی فرآیندهای شیمیایی از طریق به‌کارگیری روش‌های آماری چند متغیری، صورت می‌پذیرد که رایج ترین روش چندمتغیری برای این منظور روش سطح پاسخ[1] می‌باشد [۱۰]. روش سطح پاسخ، روشی مفید است که جهت بهینه‌سازی فرآیندهای غذایی به‌کار گرفته می‌شود. تجزیه و تحلیل سطح پاسخ اثرات مابین متغیرهای مستقل را به تنهایی یا در ترکیب با سایرین تعریف می‌نماید. به علاوه این روش می‌تواند مدلی رگرسیونی که دقیقا کل فرآیند را توصیف می‌کند را ایجاد نماید [۱۱]. هدف این پژوهش تجزیه و تحلیل پاسخ سطحی اثرات ترکیبی دما، زمان و فعالیت آنزیم بر فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ایزوله پروتئین سویا با استفاده از آنزیم آلکالاز می باشد.

1. Response Surface Methodology

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد خام اولیه

برای فرآیند هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آلکالاز ۳,٤,۲۱,٦۲ (با فعالیت مشخص ۲/٤ واحد آنسون بر گرم[1] و دانسیته‌ی ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر) که یک اندوپروتئیناز[2] گرفته شده از باکتری *Bacillus licheniformis* می‌باشد، استفاده شد. آنزیم از شرکت سیگما در اسپانیا تهیه شد و تا زمان آزمایش در ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ایزوله پروتئین سویا با میزان پروتئین ۸۳/۱۲ درصد از شرکت بکا (ایران) تهیه گردید. پیروگالول، EDTA از شرکت مرک و تریس[3]، اسید هیدروکلریدریک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه‌ی آزمایشگاهی برخوردار بودند.

۲-۲- روش ها

۲-۲-۱- تهیه پروتئین هیدرولیز شده سویا

ابتدا نمونه ایزوله‌ی پروتئین سویا به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شده و نمونه رقیق شده با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲ مخلوط گشته و به حالت سوسپانسیون یکنواخت و pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز در آمد (pH = ۸) و سپس در دمای آزمایش، آنزیم براساس فعالیت تعریف شده به سوسپانسیون اضافه گردید. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلی لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[4] مدل VS-8480) و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای تعریف شده برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور حصول اطمینان از غیر فعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با قرار دادن سوسپانسیون در حمام آب گرم (ساخت آلمان، شرکت ممرت[5]، مدل WNB 22) در دمای ۸۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به‌سرعت سرد گردیده و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل[6]، مدل Combi - 514R) با دور ٦۷۰۰×g در دمای ۱۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت [۱۳].

۲-۲-۲- فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید

ابتدا محلول پروتئینی در شرایط تعریف شده (آنزیم، زمان، دما) تهیه گردید، سپس ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول پروتئینی به ۲/۸ میلی‌لیتر بافر Tris-Hcl- EDTA اضافه گردید، مخلوط حاصل همزده شد و در دمای ۲۵ °C به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از ۱۰ دقیقه حرارت دهی، واکنش با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پیروگالول (۳ mM) آغاز گردید، سپس دانسیته نوری در طول موج ۳۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت [١٤]. فعالیت مهار رادیکال آزاد از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

۱۰۰× (جذب کنترل/ (جذب نمونه-جذب کنترل)) = درصد مهار رادیکال آزاد سوپراکسید

۲-۲-۳- آزمایشات بهینه سازی

به منظور بهینه‌سازی فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید توسط پروتئین هیدرولیز شده از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی[7] با ۵ سطح و ٦ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت (α+ ، ۱+، ۰، ۱- و α-) (جدول ۱). محدوده متغیرهای مستقل زمان (X_1)، دما (X_2) و فعالیت آنزیم (X_3) از آزمون های اولیه استنتاج گردید (داده ها عنوان نگردیده‌اند). طرح مرکب مرکزی در طرح آزمایش شامل ۸ نقطه فاکتوریل، شش نقطه محوری و شش تکرار در نقطه مرکزی بود (جدول۱). تیمارهای آزمایشی به منظور به حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می‌نماید[۱۰]. مدل رگرسیونی چندجمله‌ای درجه دوم به منظور پیش‌بینی پاسخ، درنظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به صورت معادله زیر است.

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3$$

که Y پاسخ پیش‌بینی شده (فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقدار واقعی)، β_0 عدد ثابت، β_1 ، β_2 و β_3 ضرایب رگرسیونی برای معادله خطی و β_{11}، β_{22} و β_{33} اثرات درجه دوم بوده در حالیکه β_{12}، β_{13} و β_{23} اثرات متقابل می‌باشند. X_1 ، X_2 و X_3 نیز متغیرهای مستقل را نشان می‌دهند. تجزیه و تحلیل رگرسیونی و واریانس (ANOVA) داده های آزمایشی به منظور انطباق مدل رگرسیونی، تعیین ضرایب رگرسیونی و تعیین معنی‌داری آزمون‌های آماری شرایط مدل و نیز ترسیم نمودارها و بهینه‌سازی، توسط توسط نرم افزار Design Expert[8] صورت پذیرفتند.

---

۱. یک واحدآنسون(Anson unit) عبارت است ازمیزان آنزیم مورد نیاز برای آزادشدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین ازسوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و pH۷/۵ [۱۲].

2. Endoproteinase
3. Tris
4. Vision Scientific Co., LTd.
5. Memmert
6. Hanil science industrial

7. Central Composite Design
8. Design Expert, 7.0.0 trial, Stat-Ease Inc.

Table1 Independent variables and levels used to optimize the degree of hydrolysis of soy protein hydrolysate

Independent variables	Levels of variables				
	-α	-1	0	+1	*+α
Time(minute)	27.5	65	120	175	212.49
Temperature (°C)	39.93	43	47.5	52	55.06
Enzyme activity(AU/kg)	29.66	45	67.5	90	105.34

۳- نتایج و بحث

۳-۱- آنالیز سطح پاسخ

نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به هـر تیمـار در جـدول ۲ نشان داده شده است.

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

Table 2 Experiments set up for antioxidant activity (superoxide free radical scavenging) in the Central composite design

superoxide free radical scavenging (%) activity	Enzyme activity (X_3)	time (X_2)	temperature (x_1)	treatment
44.17	-1	-1	-1	1
46.22	-1	1	−1	2
39.13	-1	−1	1	3
44.76	-1	1	1	4
42.02	1	-1	-1	5
38.25	1	1	−1	6
41.95	1	-1	1	7
50.14	1	1	1	8
55.06	0	-1.6818	0	9
49.96	0	1.6818	0	10
37.84	0	0	-1.6818	11
44.63	0	0	1.6818	12
31.80	-1.6818	0	0	13
34.12	1.6818	0	0	14
54.03	0	0	0	15
60.90	0	0	0	16
65.23	0	0	0	17
66.08	0	0	0	18
65.35	0	0	0	19
62.30	0	0	0	20

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) of quadratic model resulted by response surface method for superoxide free radical scavenging**.**

source	Degree of freedoom	Sum of squares	Mean square	F value	P
model	9	2056.98	228.55	13.63	0.000
temperature	1	20.52	20.52	1.22	0.295
time	1	0.91	0.91	0.05	0.821
Enzyme activity	1	0.29	0.29	0.02	0.898
temp * temp	1	699.07	699.07	41.68	0.000
time * time	1	127.85	127.85	7.62	0.020
enzyme *enzyme	1	1409.73	1409.73	84.05	0.000
temp * time	1	30.19	30.19	1.80	0.209
enzyme * temp	1	41.95	41.95	2.50	0.145
time * enzyme	1	1.33	1.33	0.08	0.784
Residual Error	10	167.73	167.73		
Lack-of-Fit	5	65.20	65.20	0.64	0.684
Pure Error	5	102.53	20.51		
total	19	2224.71			

Table 4 Regression coefficients of estimated model by analysis of multiple regressions in order to predict the equation model of independent variables in superoxide free radical scavenging evaluation.

Variable model	Coefficient
constant	62.240
(time) x_1	0.258
(temp) x_2	1.225
x_3 (Enzyme activity)	0.145
x_1^2	-2.978
x_2^2	- 6.964
x_3^2	- 9.890
x_1x_2	1.942
x_1x_3	- 0.407
x_2x_3	2.290

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات به منظور پیش‌بینی مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ٤)، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

= فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید

$$٦٢/٢٤٠ - ٢/٩٧٨\, x_1^2 - ٦/٩٦٤\, x_2^2 - ٩/٨٩٠\, x_3^2$$

آزمون ANOVA مشخص نمود که مدل چند جمله‌ای درجه دوم به اندازه کافی بیانگر پاسخ، با ضرایب مشخص می‌باشد. R^2 =٠/٩٢٤٦ موید این است که مدل رگرسیون واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ٩٢/٤٦ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2معیاری است برای اینکه مشخص گردد چه میزان از تغییرات توسط مدل شرح داده شده است [١٥] و در موارد R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده[1] که به ترتیب ٠/٩٢٤٦ و ٠/٨٥٦٨ به دست آمدند، بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده است.

مناسب بودن مدل با استفاده از آزمون فقدان برازش مورد بررسی قرار گرفت که برای $P > ٠/٠٥$ معنی‌دار نبود. از آنجا که فرض آزمون عدم برازش در معادله مدل معنی‌دار نبود ($P > ٠/٠٥$) مدل بر اساس مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید

1. Adjusted R-Squared

برازش گردید. برازش خوب به این معنی است که مدل ایجاد شده تغییرات در داده‌ها را به اندازه کافی توضیح دهد [۱۳]، لذا این مدل جهت پیش‌بینی در دامنه متغیرهای مورد استفاده مناسب بود.

به منظور تعیین شرایط بهینه‌ی هر متغیر در هیدرولیز آنزیمی جهت حصول بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد سوپراکسید، نمودارهای سه بعدی و کانتور برای متغیرها در شکل‌های ۱ تا ۳ ترسیم شده است.

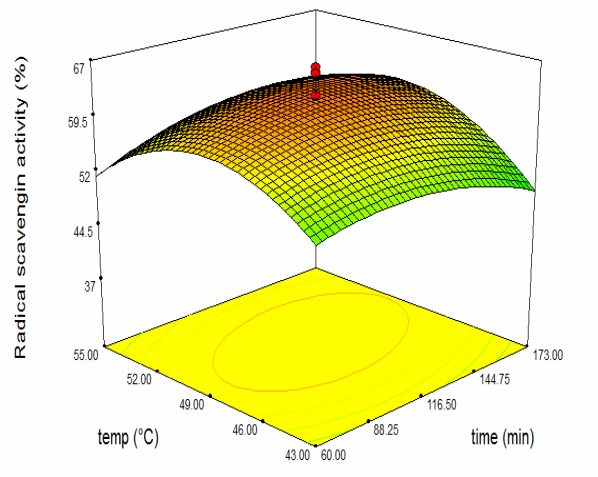

Fig 1 Response surface graph for superoxide free radical scavenging activity as a function of time (min) and temperature (°C) of enzymatic hydrolysis of soy protein

شکل ۱ نشان می دهد که متغیر دما در نواحی میانی خود، بیشترین اثر را در مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید داشته در حالی که زمان از محدوده‌ی بیشتر از ۸۸ دقیقه بیشترین اثر را داشته است. این نتایج کاملا مشابه نتایج طاهری و همکاران (۲۰۱۱) در اندازه گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH ماهی ساردین رنگین کمان می‌باشد [۱۵]. تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی با گذشت زمان در اثر تغییر طول زنجیره‌های پپتیدی حاصل با افزایش هیدرولیز می‌باشد. بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند [۱۶].

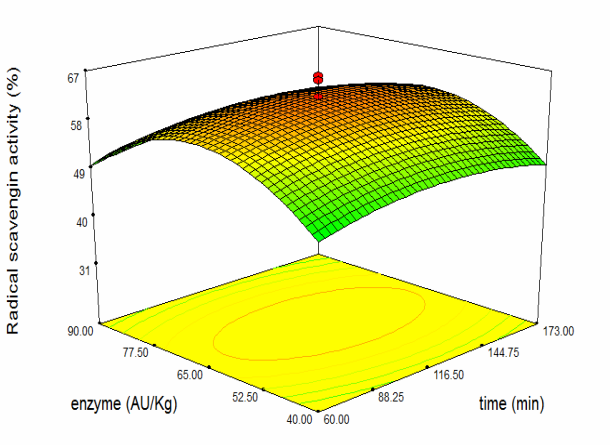

Fig 2 Response surface graph of changes in superoxide free radical scavenging activity as a function of time (min) and enzyme concentration (AU/Kg) in enzymatic hydrolysis of soy protein

همانطور که در شکل ۲ مشخص است با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید در یک فعالیت آنزیمی ثابت، افزایش یافته و در زمان‌های نهایی هیدرولیز کاهش یافته است. این نتایج مشابه نتایج مهرگان (۱۳۹۱) در بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کاراس می‌باشد [۱۷]. مطابق این شکل‌ها، بالارفتن فعالیت آنزیم در یک زمان ثابت اثر بیشتری در تغییرات فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته است. طاهری و همکاران (۲۰۱۱) با بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی ساردین رنگین کمان نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا زمانی که زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا به نقطه اپتیمم خود می‌رسد افزایش یافته، سپس با افزایش بیشتر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا، کاهش می‌یابد که این امر به دلیل اثر زمان و دما بر روی فعالیت آنزیمی می‌باشد [۱۵].

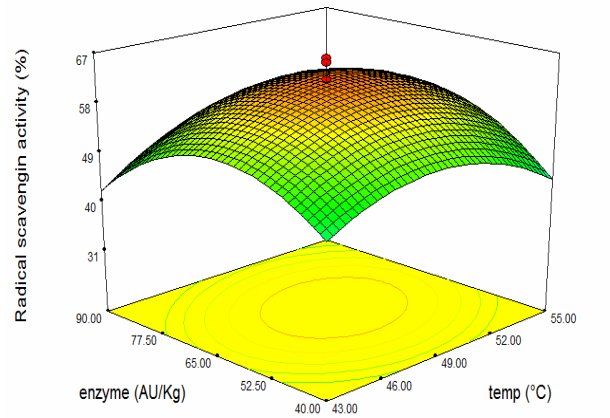

Fig 3 Response surface graph of changes in superoxide free radical scavenging activity as a function of temperature (°C) and enzyme concentration (AU/Kg) for enzymatic hydrolysis of soy protein with Alcalase

با توجه به نمودار آنزیم- دما (شکل ۳) همچنین با توجه به ضرایب رگرسیونی موجود در جدول ٤ می توان دریافت که اثر دما بر فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید در مقایسه با نسبت آنزیم به سوبسترا بیشتر بوده و این فاکتور تأثیر مهمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. این شکل بیان می‌دارد که دماهای میانی آزمایش بالاترین تاثیر را در مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید داشته و این‌که با بالا رفتن فعالیت آنزیم در یک دمای ثابت تغییرات مهارکنندگی کند بوده درحالی که در یک فعالیت آنزیم ثابت با افزایش دمای هیدرولیز ابتدا قدرت مهارکنندگی بالا رفته و سپس از میزان آن کاسته شده است. این نمودارها نشان می دهد که بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید در دمای ٤٦ تا ٥٢ درجه سانتیگراد و فعالیت آنزیمی حدود ٥٥ تا ٧٥ AU/kg protein به دست آمد. این نتایج تقریبا مشابه نتایج مشکین فر (١٣٩١) می‌باشد که در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی فرآورده‌های جانبی صنایع گوشت صورت پذیرفت [١٨].

۳-۲- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل فعالیت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید

شرایط بهینه توسط نرم افزار Design Expert با اعمال طرح RSM به‌دست آمد. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده‌ی سویا با فعالیت بهینه‌ی مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید مطابق با شرایط زمان ١١٧/٤٥ دقیقه، دمای ٤٩/٧١ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ٦٦/٢٧ واحد آنسون بر کیلوگرم به‌دست آمد که منطبق با ٦٢/٣٨ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید بود. به منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله رگرسیونی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش‌بینی شده توسط مدل اجرا گردید که قدرت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید در این شرایط ٦٠/٨٧ درصد بود. مقادیر آزمایشی تقریبا مطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل بود که مؤید شرایط بهینه‌ی پیش‌بینی شده جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی از ایزوله‌ی پروتئین سویا می‌باشد.

٤- نتیجه گیری

در این مطالعه تولید پروتئین هیدرولیز شده با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بهینه از پروتئین سویا با استفاده از آنزیم آلکالاز توسط روش سطح پاسخ صورت پذیرفت. روش سطح پاسخ، به عنوان روش آماری کارآمد جهت این منظور مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد که تولید پروتئین هیدرولیز شده به صورت مؤثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از فاکتورهای دما، زمان و مقدار آنزیم بر کیفیت محصول تأثیرگذار است. همچنین نتایج حاکی از اثر گذاری بیشتر دمای واکنش برروی فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول نسبت به دو متغییر دیگر بود. رفتار آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، به مقدار زیادی تحت تاثیر ساختار و خصوصیات شیمیایی پپتیدهای تولید کننده‌ی این خاصیت می‌باشد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاصل می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در فرمولاسیون غذایی و نیز به عنوان ترکیب دارویی به کار گرفته شوند. اگرچه لازم است آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی درون زیستی[1] در این زمینه صورت پذیرد.

٥- منابع

[1] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. (2009). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry, 114:1198–1205.
[2] Tang, C.H. and Ma, C.Y. (2009). Effect of high pressure treatment on aggregation and structural properties of soy protein isolate. LWT Food Science Technology, 42:606-611.
[3] Marcuse, R. (1960). Antioxidative effect of amino-acids. 186:886–887.
[4] Chen, H.M., Muramoto, K., Yamauchi, F. and Nokihara, K. (1996). Antioxidant activity of design peptides based on the antioxidative peptide isolated from digests of a soybean protein. Journal of agricultural and food chemistry 44(9): 2619-2623.
[5] Decker, E.A. and Xu, Z. (1998). Minimizing rancidity in muscle foods. food technology, 52(10): 54-59.
[6] Clement, A., Vioque, J. and Millan,F. (1999). Vegetable Protein Hydrolysate in Nutricion y Obesidad. Food Science Journal, 2:289-296.

1. In vivo

[7] Ovissipour, M.R., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M. (2010). Optimization of Enzymatic Hydrolysis of Visceral Waste Proteins of Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioprocess Technology, 5(2): 696-705.

[8] Messina, M.J., Persky, V., Setchell, D. R. and Barnes, S. (1994). Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data Nutrition and Cancer. 21: 113–131.

[9] Zheng, L., Su, G., Ren, J., Gu, L., You, L., and Zhao, M. (2012). Isolation and characterization of an oxygen radical absorbance activity peptide from defatted peanut meal hydrolysate and its antioxidant properties. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60: 5431-5437.

[10] Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., Escaleira, L.A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta, 76: 965–977.

[11] Sumaya-Martinezl, T., Castillo-Morales, A., Favela-Torres, E., Huerta-Ochoa1, S. and Prado-Barragan, L.A. (2005). Fish protein hydrolysates from gold carp (*Carassius auratus*). A study of hysolysis parameters using response surface methodology. Journal of the Science of Food and Agriculture, 85: 98-104.

[12] Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry, 40(5): 1957-1966.

[13] Taheri, A. (2011). Antioxidative properties of rainbow sardine (Dussumieria acuta) protein hydrolysate: optimization using response surface methodology. International Food Congress Novel Approaches in Food Industry, MAY 26-29. Pp: 39-43.

[14] Marklund, S. and Marklund, G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallal and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47(3): 469-474.

[15] Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Habibi-Rezaei, M. (2011). Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering, 7(5): 1556-3758.

[16] Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G. and Kim, S.K. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. Journal of Nutritional Biochemistry, 16: 562-569.

[17] Mehregan Nikoo, A.R. (2012). Optimization of different factors affecting hydrolysis and antioxidant activity of crucian carp (*Carassius carassius*) protein hydrolysate by Response Surface Methodology. A thesis of M.Sc. in Food Science, 97 page.

[18] Meshginfar, N. (2012). Production of hydrolysate protein from meat industry by -products and evaluate of its antioxidant activity. A thesis of M.Sc. in Food Science, 71 page.

Optimization of factors affecting the antioxidant activity of soy protein hydrolysate by response surface methodology

Etemadi, M. [1], A.R. Sadeghi Mahonak [2*], M. Ghorbani [2], Y. Maghsoudlou [2]

1. Department of Food Sciences and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
2. Associate Prof., Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(Received: 2014/10/08 Accepted: 2015/01/25)

The objective of this study was to produce soy protein hydrolysate (SPH) with the highest antioxidant activity, from soy protein isolate using enzymatic hydrolysis. The soy protein hydrolysate was produced through enzymatic hydrolysis by Alcalase 2.4L enzyme and the optimal hydrolysis parameters to achieve the highest antioxidant capacity of peptides were obtained by response surface methodology (RSM) with the central composite design (CCD) using the Design Expert software. The combined effects of temperature, time and enzyme activity on superoxide free radical scavenging capacity of SPH were well fitted to a quadratic equation by using Design expert software. The regression model presented a plateau region with maximum antioxidant activity (>62.38%) at the following critical values: temperature 49.71^{0}C, time 117.45 min and enzyme activity 66.27 Anson unit per kilogram protein. Results indicated the potential of soy protein hydrolysate to be applied as a natural antioxidant in food ingredient and pharmaceutical applications in the future.

Key words: Alcalase enzyme, Antioxidant activity, Enzymatic hydrolysis, Response Surface Methodology, Soy protein hydrolysate

* Corresponding Author E-Mail Address: sadeghiaz@gau.ac.ir