JRIFST

www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال 1392، جلد 2، شماره 4، صفحات 351-364
DOI: 10.22101/JRIFST.2014.03.01.245

بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassius*)

علیرضا مهرگان نیکو[1]، علیرضا صادقی ماهونک[2*]، محمد قربانی[2]، علی طاهری[3]، مهران اعلمی[4]، فایزه کمالی[1]

1– دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
2- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان
* نویسنده مسئول (sadeghiaz@yahoo.com)
3- استادیار گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار
4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

چکیده

در پژوهش حاضر پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس، با به کارگیری آنزیم آلکالاز تولید شد. اثر متغیرهای دما (40، 45، 50 و 55 درجه سانتی‌گراد) زمان (60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه) و نسبت آنزیم به سوبسترا (30، 60 و 90 واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین)، بر میزان درجه هیدرولیز و فعالیت ضداکسایشی در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی گردید. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در 45 درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز 180 دقیقه و نسبت آنزیم 60 (واحد آنسون/کیلوگرم سوبسترا) حاصل شد، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به 39/38 درصد رسید. بررسی فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده، توسط آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی پروتئین هیدرولیز شده و فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن اندازه‌گیری شد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان هیدرولیز 150 دقیقه و نسبت آنزیم 60 واحد آنسون بر کیلوگرم برابر با 57/5 درصد به‌دست آمد. بالاترین فعالیت مهارکنندگی یون آهن که در دما و فعالیت آنزیمی به ترتیب 45 درجه سانتی‌گراد و 60 واحد آنسون بر کیلوگرم و در زمان هیدرولیز 180 دقیقه به میزان 44/56 درصد حاصل شد. بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان هیدرولیز120 دقیقه، به دست آمد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک 100 قسمت در میلیون (100 درصد)، 67/32 درصد قدرت احیاکنندگی از خود نشان داد (p <0/05).

تاریخ دریافت: 92/08/05
تاریخ پذیرش: 92/11/08

واژه‌های کلیدی
پروتئین هیدرولیز شده
فعالیت ضداکسایشی
ماهی کاراس
هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

به منظور پیشگیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروری است که جلوی پراکسیداسیون چربی‌ها و تشکیل رادیکال‌های آزاد به‌وجود آمده در فرآورده‌های غذایی و سلول‌های زنده گرفته شود. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به کار برده می‌شوند که در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه پژوهشگران

می‌باشد. در سال‌های اخیر توجه به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، پروتئین ماهی و... شده است. هیدرولیز پروتئین فناوری سودمندی برای تولید فراورده‌های با ارزش افزوده‌ی بالا، می‌باشد و روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی برای این منظور به کار گرفته می‌شوند. فرایند کاربرد آنزیم‌های تجاری به جای فرایندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های داخلی دارای مزایای بسیار زیادی است، زیرا کل فرایند هیدرولیز کاملاً تحت کنترل است و در نتیجه فرآورده‌های با خواص مشخص تولید می‌شود. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال قوی می‌باشد. پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی هستند با وزن مولکولی پایین که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می‌شوند. این ترکیبات پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. از مهمترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های ضد اکسایش، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده‌ی سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. ویژگی ضداکسایشی این ترکیبات، هم در شرایط درون زیستی و هم به صورت برون تن قابل توجه می‌باشد (Vioque *et al.*, 2001). قابلیت آنتی‌اکسیدانی این هیدرولیز شده‌ها به ویژگی‌هایی شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل به عنوان شلاته‌کننده‌ی فلزات، خاموش کننده‌ی اکسیژن یا دهنده‌ی هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله‌ی تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن نسبت داده می‌شود (Li *et al.*, 2008).

ماهی کاراس (*Carassius carassius*)، گونه‌ای از ماهیان آب شیرین و از خانواده‌ی کپور ماهیان (Cyprinidae) است. این ماهی به دلیل اندازه‌ی کوچک، مزه و بوی نامناسب از ارزش تجاری اندکی برخوردار می‌باشد و فقط در برخی کشورها به عنوان منبع مهم پروتئینی مطرح است. این ماهی در استخرهای پرورش ماهیان گرم آبی به دلیل رقابت غذایی با کپور ماهیان به عنوان یک ماهی مزاحم محسوب می‌گردد. به دلیل قیمت بسیار پایین و تولید بالای این ماهی، فرآوری محصولات با ارزش افزوده از این گونه، مطرح می‌گردد (FAO, 2011; IFIS, 2009). هدف از این پژوهش تبدیل پروتئین ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به عنوان ماده‌ای با ارزش اقتصادی نسبتاً پایین، به ترکیبی با خاصیت ضداکسایشی و دارای خواص مفید و سلامتی‌بخش بود. همچنین در شرایط مناسب دمایی و آنزیمی هیدرولیز و در زمان‌های مختلف هیدرولیز، فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++}) و نیز قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده نیز تعیین گردیدند.

مواد و روش‌ها

برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آلکالاز (با فعالیت مشخص 2/4 واحد آنسون بر گرم[1] و دانسیته‌ی 1/18 گرم بر میلی‌لیتر) که یک اندوپروتئیناز[2] گرفته شده از باکتری *باسیلوس لیکنی‌فورمیس* می‌باشد، استفاده شد. این آنزیم از نمایندگی شرکت نووزایمز[3] دانمارک در ایران تهیه شد و تا زمان آزمایش در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. ماهی کاراس (*Carassius carassius*) با وزن متوسط 107 گرم در آبان 1390 به صورت زنده از بازار ماهی گرگان تهیه گردید. فروزین[4]، فری سیانید پتاسیم، تری‌کلرواستیک اسید، کلریدآهن، اتانول، تریس[5]، اسید هیدروکلریدریک، اسید آسکوربیک، BHT از شرکت مرک، معرف DPPH[6] از شرکت سیگما[7] و اسید سولفوریک، هگزان و سود پرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه گردیدند. تمامی مواد شیمیایی مورد

1- یک واحد آنسون (Anson unit) عبارت است ازمیزان آنزیم مورد نیاز برای آزادشدن یک میلی‌اکی‌والان اسیدآمینه تیروزین ازسوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای 25 درجه‌ی سانتی‌گراد و pH 7/5 (Aspmo *et al.*, 2005).

2- Endoproteinase
3- Novozymes
4- Ferrozine
5- Tris
6- 2,2-diphenyl-1- picrylhydrazyl
7- Sigma Chemical Co.

استفاده در آزمایش از درجه‌ی آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی

ماهی کاراس پس از پوست‌گیری، سر و دم‌زنی و جدا نمودن امعاء و احشاء با آب شسته شده، سه بار توسط چرخ گوشت (ساخت انگلستان، شرکت کنوود[1] مدل KM010) چرخ گردید و سپس در بسته‌های پلاستیکی زیپ‌دار تقسیم و تا زمان آزمایش در فریزر منفی 20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. گوشت چرخ شده منجمد ماهی کاراس به منظور انجمادزدایی در طول شب در یخچال (8 درجه سانتی‌گراد) گذاشته شد، سپس درون فلاسک‌ها توزین شده و به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های با منشاء داخلی درون حمام آب 85 (ساخت آلمان، شرکت ممرت[2]، مدل WNB 22) درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه قرار گرفت (Guerard *et al.*, 2002). نمونه‌های حرارت دیده با بافر تریس- اسیدکلریدریک به نسبت وزنی- حجمی 1 به 2 به حالت سوسپانسیون یکنواخت و با pH مناسب جهت فعالیت آنزیم آلکالاز در آمده (pH=8) و سپس در دمای آزمایش، آنزیم براساس فعالیت تعریف شده به سوسپانسیون اضافه شد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های 100 میلی‌لیتری در انکوباتور شیکردار (ساخت کره جنوبی، شرکت ویژن[3] مدل VS-8480) و با دور ثابت 200 دور در دقیقه و در دمای تعریف شده برای هر تیمار انجام شدند. در انتهای هر تیمار به منظور حصول اطمینان از غیرفعال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با حرارت دادن سوسپانسیون در دمای 85 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه به اتمام رسیده و ترکیب هیدرولیز شده در حمام یخ به سرعت سرد گردید و در انتها در سانتریفیوژ یخچال‌دار (ساخت کره جنوبی، شرکت هانیل[4]، مدل Combi - 514R) با دور 8000xg در دمای 10 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه جهت جمع‌آوری سوپرناتانت قرار گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009b).

به منظور یافتن دامنه‌ی مناسب شرایط هیدرولیز جهت بهینه‌سازی، ابتدا پیش‌تیمارهایی در شرایط مطابق با دماهای 40، 45، 50 و 55 درجه سانتی‌گراد و زمان‌های 60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه و فعالیت‌های آنزیمی 30، 60 و 90 واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی

به منظور تعیین رطوبت، 5 گرم از نمونه روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده، قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای 103 درجه سانتی‌گراد برای مدت 24 ساعت قرار داده شدند تا اینکه وزن ظرف، ثابت گردید (پروانه، 1385). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال ضریب نیتروژن 6/25 استفاده شد (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3)، (AOAC, 2000) و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (واحد تقطیر کلدال ساخت آلمان، شرکت نابرترم[5]، مدل FX118- 30) در دمای 600 درجه سانتی‌گراد، تعیین گردید (AOAC, 2000). برای تعیین میزان چربی نیز از دستگاه سوکسله با حلال هگزان (سوکسله ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل R 254 S) استفاده شد (AOAC, 2000).

تعیین درجه‌ی هیدرولیز

درجه هیدرولیز یکی از فاکتورهای مهم در تعیین خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد و در واقع میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را در محصول هیدرولیز شده بیان می‌کند. درجه‌ی هیدرولیز بر اساس روش Hoyle و Merritt (1994) برآورد گردید. به حجم برابری از سوپرناتانت، تری کلرواستیک‌اسید 20 درصد اضافه گردید و سپس در دور g × 6700 و دمای 10 درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه به منظور جمع‌آوری ترکیبات محلول در تری‌کلرواستیک‌اسید 10 درصد سانتریفیوژ (سانتریفوژ ساخت انگلستان، شرکت سنتریون[6]، مدل K2042)

1- Kenwood
2- Memmert
3- Vision Scientific Co., Ld.
4- Hanil science industrial

5- Nabertherm
6- Centurion Scientific LTd.

گردید. درجه‌ی هیدرولیز براساس فرمول زیر محاسبه گردید.

رابطه (1)

درجه هیدرولیز (درصد) =

$$\frac{\text{میزان نیتروژن در تری کلرواستیک اسید 10 درصد}}{\text{کل نیتروژن در نمونه}} \times 100$$

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

برای این منظور 500 میکرولیتر از هر نمونه با 500 میکرولیتر از اتانول 99/5 درصد و 25 میکرولیتر از DPPH 0/02 درصد در اتانول 99/5 درصد مخلوط گردید؛ مخلوط برای مدت 60 دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه داشته شده و جذب رادیکال DPPH در طول موج 517 نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر (ساخت انگلستان، پی جی اینسترومنت[1] مدل T80)، اندازه‌گیری گردید. فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH با توجه به رابطه‌ی زیر محاسبه شد.

رابطه (2)

فعالیت زدودن رادیکال DPPH(درصد) =

$$\frac{\text{جذب کنترل - جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

نمونه‌ی کنترل به همان طریق تهیه شد؛ با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده گردید. جذب کمتر مخلوط نشان دهنده‌ی فعالیت مهار رادیکالی و DPPH بالاتر می‌باشد (Bougatef *et al.*, 2009). به منظور مقایسه‌ی قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده از آنتی‌اکسیدان BHT در غلظت 100 ppm استفاده گردید.

آزمون قدرت احیاءکنندگی

اندازه‌گیری قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده در احیای آهن III از روش Bougatef و همکاران (2009) صورت پذیرفت. برای این منظور 1 میلی‌لیتر از نمونه‌ی محلول هر کدام از نمونه‌ها با 2/5 میلی‌لیتر از بافر فسفات 0/2 مولار (pH= 6/6) و 2/5 میلی‌لیتر از فری‌سیانیدپتاسیم 1 درصد مخلوط گردید. مخلوط در 50 درجه‌ی سانتیگراد به مدت 30 دقیقه گرمخانه‌گذاری شده و سپس 2/5 میلی‌لیتر از محلول تری‌کلرواستیک اسید 10 درصد (وزنی- حجمی) به آن اضافه گردید. مخلوط در g × 1650 برای 10 دقیقه سانتریفوژ شده و در نهایت 2/5 میلی‌لیتر از محلول سوپرناتانت با 2/5 میلی‌لیتر آب مقطر و 0/5 میلی‌لیتر از محلول 0/1 درصد (وزنی- حجمی) کلرید آهن مخلوط گشت. بعد از 10 دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در 700 نانومتر قرائت شد. افزایش جذب مخلوط واکنش، بیانگر افزایش قدرت احیاکنندگی آن می‌باشد. جهت مقایسه قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت 100 قسمت در میلیون (Jayaprakasha *et al.*, 2001). به عنوان یک عامل احیا کننده استفاده شد.

فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++})

4/7 میلی‌لیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده با 0/1 میلی‌لیتر از محلول 2 میلی‌مولار کلرید آهن II و 0/2 میلی‌لیتر فروزین 5 میلی‌مولار مخلوط گردیده و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. در انتها جذب در طول موج 562 نانومتر قرائت گردید. در نمونه‌ی شاهد به جای نمونه از آب مقطر استفاده گشت. فعالیت مهارکنندگی از طریق رابطه‌ی زیر بدست آمد (Nalinanon *et al.*, 2011).

رابطه (3)

فعالیت شلاته کنندگی (درصد) =

$$\frac{\text{جذب نمونه - جذب شاهد}}{\text{جذب شاهد}}$$

تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه با استفاده از طرح کاملاً تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل انجام شد و بررسی اثر متغیرهای دما (در سطوح 40، 45، 50 و 55 درجه سانتی‌گراد)، زمان (در سطوح 60، 90، 120، 150، 180 و 210 دقیقه) و میزان آنزیم (در سطوح 30، 60 و 90 واحد آنسون) و در سه تکرار صورت پذیرفت. مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان 95٪ صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از

1- PG instruments

نرم افزار SAS[1] و رسم نمودارها با نرم افزار اکسل[2] انجام گردید.

نتایج و بحث

ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه و پروتئین هیدرولیز شده‌ی آن

ترکیبات شیمیایی ماهی کاراس و پودر پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از آن که در شرایط بهینه‌ی هیدرولیز، حاصل و با خشک‌کن انجمادی خشک گردید در جدول 1 آورده شده است. همان‌طور که در جدول 1 مشخص است، میزان پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی کاراس به میزان قابل توجهی نسبت به ماده‌ی اولیه و سایر ترکیبات شیمیایی بالاتر بود که در تحقیقات پیشین نیز به اثبات رسیده است (Bhaskar *et al*., 2008; Ovissipour *et al*., 2009b; Diniz & Martin, 1997)، و این ناشی از جدا شدن رطوبت از نمونه است. علاوه بر این در روند هیدرولیز و طی سانتریفوژ، اغلب ترکیبات غیرپروتئینی از پروتئین هیدرولیز شده جدا می‌گردند.

میزان چربی در پروتئین هیدرولیزشده نسبت به ماده‌ی خام کاهش قابل توجهی داشت که دلیل آن می‌تواند اتصال چربی‌ها به پروتئین‌های نامحلول بعد از شکسته شدن پیوندهای پپتیدی طی هیدرولیز و رسوب آن‌ها هنگام سانتریفوژ باشد (Rasco & Kristinsson, 2000). Kristinsson و Rasco (2000) گزارش نموده‌اند که میزان چربی در پروتئین‌های هیدرولیز شده معمولا کمتر از 1 درصد می‌باشد. Slizyte و همکاران (2005) مشخص نمودند، زمانی که از حرارت برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها با منشاء داخلی استفاده شود امولسیون‌های پایداری از پروتئین و چربی شکل گرفته و میزان چربی در فرآورده‌ی نهایی بالاتر خواهد رفت.

میزان خاکستر در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماهی افزایش یافت که می‌توان دلیل آن را افزایش میزان ماده خشک پروتئین هیدرولیز شده و ورود برخی از عناصر به محلول سوپرناتانت بعد از هیدرولیز دانست (Ovissipour *et al*., 2009a). اویسی‌پور و همکاران (1389) در تهیه‌ی پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با استفاده از آنزیم آلکالاز به خاکستر 22/34 درصد در مقایسه با خاکستر ماده‌ی خام که 4/46 درصد بود دست یافتند.

ارزیابی میزان پیشرفت هیدرولیز

کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز طی فرآیند هیدرولیز مهم می‌باشد، چرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص ضداکسایشی پروتئین تولید شده وابسته به شدت و میزان درجه هیدرولیز می‌باشد.

اثر زمان و فعالیت آنزیم بر میزان درجه‌ی هیدرولیز در شکل‌های 1، 2، 3 و 4 نشان داده شده است. عامل زمان اثر معنی‌داری بر میزان درجه‌ی هیدرولیز داشت (p<0/05). به صورت کلی با افزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه‌ی هیدرولیز افزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در تمامی سطوح دما و میزان فعالیت آنزیم، در زمان 210 دقیقه حاصل شد، که در مقایسه بین تیمارها مشخص شد، درجه‌ی هیدرولیز در تیمارهای 180 و 210 دقیقه تفاوت معنی‌داری ندارد. کمترین میزان درجه هیدرولیز نیز در زمان هیدرولیز 60 دقیقه به دست آمد. افزایش میزان هیدرولیز در اکثر تیمارها از زمان 60 تا 150 دقیقه شدت بیشتری یافت. فاکتور دما نیز اثر معنی‌داری بر میزان درجه‌ی هیدرولیز نشان داد (p< 0/05). با توجه به عدم معنی‌داری بین دماهای 45 و 50 درجه سانتی‌گراد در پیش‌تیمارهای اولیه (p>0/05) و با توجه به بالاتر بودن میانگین درجات هیدرولیز در 55 درجه سانتی‌گراد نسبت به 40 درجه سانتی‌گراد و از طریق آزمایشات تجربی که در دماهای بین 45 و 50 درجه سانتی‌گراد یعنی 46، 47، 48 و 49 درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت (نتایج ذکر نگردیده‌اند) دمای 48/5 به عنوان دامنه‌ی دمایی مناسب تعیین گردید. Ovissipour و همکاران (2009b) از بین 3 دمای 35، 45 و 55، دمای 55 درجه سانتی‌گراد را برای دستیابی به بالاترین درجه‌ی هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی از امعاء و احشاء ماهی ازون برون، با استفاده از آنزیم آلکالاز، تشخیص دادند.

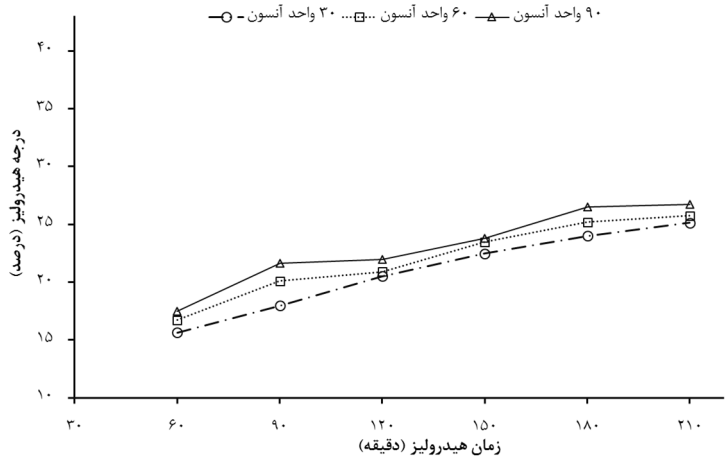
1- SAS, 9.1.3 service pack 4
2- Microsoft Excel 2010

Chabeaud و همکاران (2009) در بهینه‌سازی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی پشت‌سیاه، با استفاده از آنزیم آلکالاز، از رنج 45 تا 65 درجه سانتی‌گراد استفاده نموده و دمای بهینه را 60 درجه سانتی‌گراد تشخیص دادند. Motamedzadegan و همکاران (2010) به نقل از Kristinsson و Rasco گزارش نموده‌اند که در برخی از موارد آنزیم‌های پروتئولیتیک با شرایط بهینه‌ی ارائه شده از طرف شرکت سازنده، توسط محققین مورد استفاده قرار می‌گیرند بدون توجه به این موضوع که شرایط بهینه وابسته به سوبسترای مورد استفاده نیز می‌باشد. فعالیت آنزیم نیز اثر معنی‌داری بر میزان درجه هیدرولیز داشت ($p<0/05$). نتایج، گویای افزایش درجه هیدرولیز با بالابردن فعالیت آنزیمی از 30 به 90 واحد آنسون می‌باشند. بین فعالیت‌های آنزیمی مورد استفاده، اختلاف معنی‌دار وجود داشت ($p<0/05$). اختلاف درجات هیدرولیز بین فعالیت‌های آنزیمی 60 و 90 واحد آنسون کمتر از اختلاف 30 و 60 بود و همچنین در دمای 50 درجه سانتی‌گراد بین فعالیت‌های آنزیمی 60 و واحد آنسون 90 تفاوت معنی‌داری ملاحظه نشد. به دلیل هزینه بر بودن آنزیم، استفاده از مقادیر بالای آنزیم در تولید پروتئین هیدرولیز شده اقتصادی به نظر نمی‌رسد، لذا فعالیت آنزیمی 60 به عنوان نقطه‌ی مناسب برای این منظور لحاظ گردید. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان درجه هیدرولیز دمای 45 درجه سانتی‌گراد، زمان 180 دقیقه و نسبت آنزیم 60 (واحد آنسون/کیلوگرم سوبسترا) به دست آمد، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به 39/38 درصد رسید. Taheri و همکاران (2011) میزان درجه‌ی هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی ساردین را با استفاده از آنزیم آلکالاز، در شرایط بهینه در دمای 45/62 درجه‌ی سانتی‌گراد، 35/14 درصد گزارش کردند. Bhaskar و همکاران (2008) شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء گوسفند را با استفاده از یک نوع پروتئاز قارچی دمای 43 درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان 45 دقیقه گزارش کردند.

جدول 1- ترکیبات شیمیایی ماهی کاراس و پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از آن

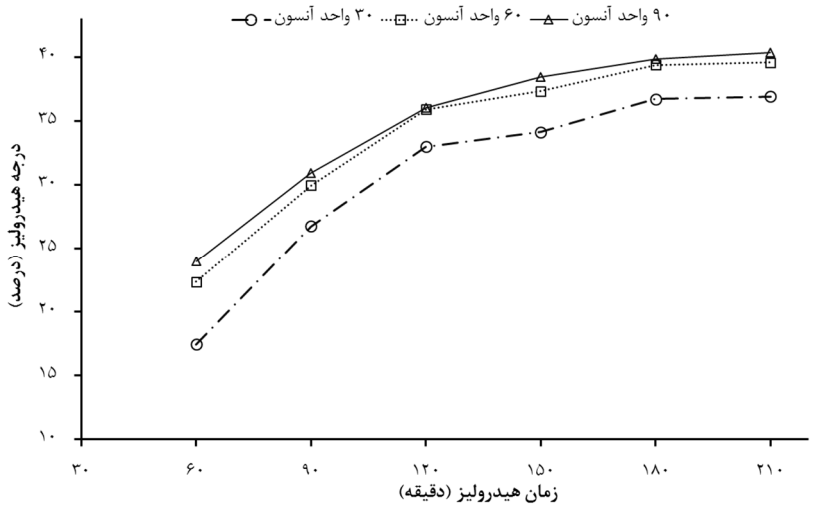
	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	رطوبت (درصد)	خاکستر (درصد)
ماهی کاراس	16/43 ±0 /39	11/52 ± 0/28	79/61 ± 0/33	1/61 ± 0/18
پروتئین هیدرولیز شده	79/13 ± 0/61	1/12 ± 0/26	7/96 ± 0/31	11/87 ± 0/28

* پروتئین، رطوبت و خاکستر، براساس وزن مرطوب[1] و چربی بر اساس وزن خشک[2] نمونه گزارش گردیده‌اند.
** تمامی آزمایشات در 4 تکرار صورت پذیرفته‌اند.

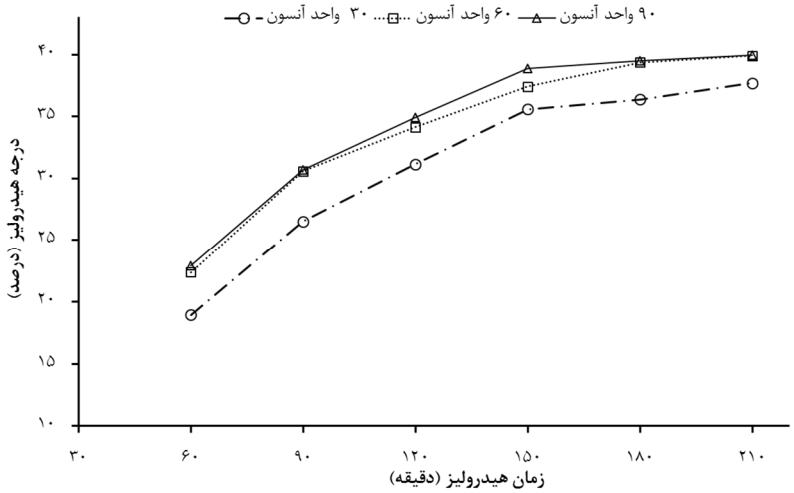


شکل 1- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف

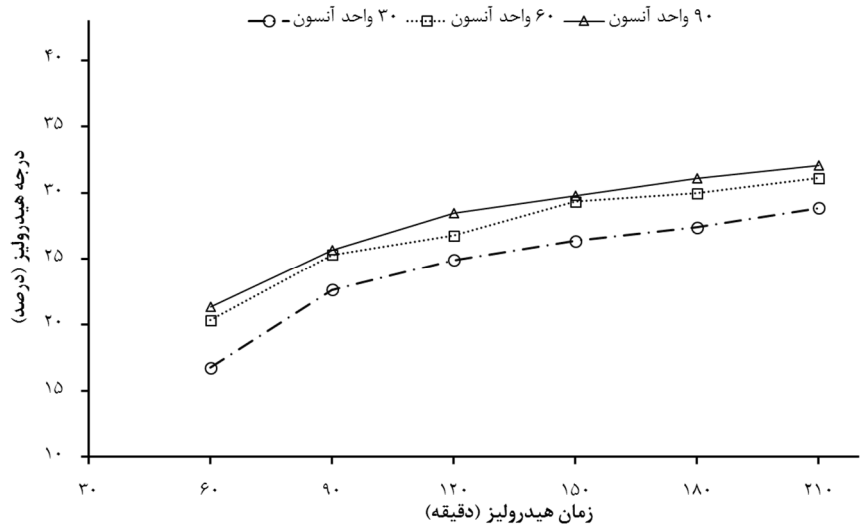
1- Wet basis
2- Dry basis



شکل 2- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 45 درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف



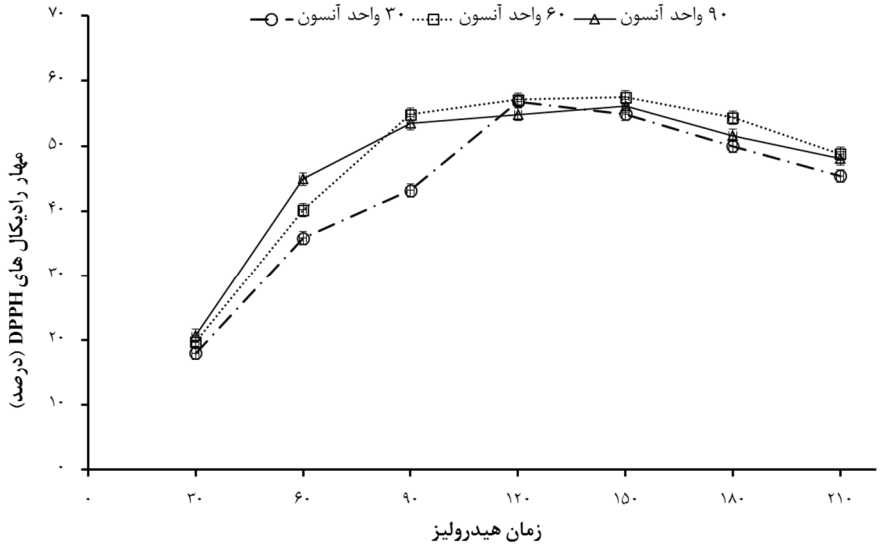
شکل 3- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 50 درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف.



شکل 4- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 55 درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی و زمان‌های مختلف

مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

تغییرات فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی کاراس در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، در دمای 45 درجه سانتی‌گراد که دمایی مناسب جهت هیدرولیز تشخیص داده شده بود و فعالیت‌های آنزیمی مختلف با گذشت زمان، در شکل 5 نشان داده شده است.

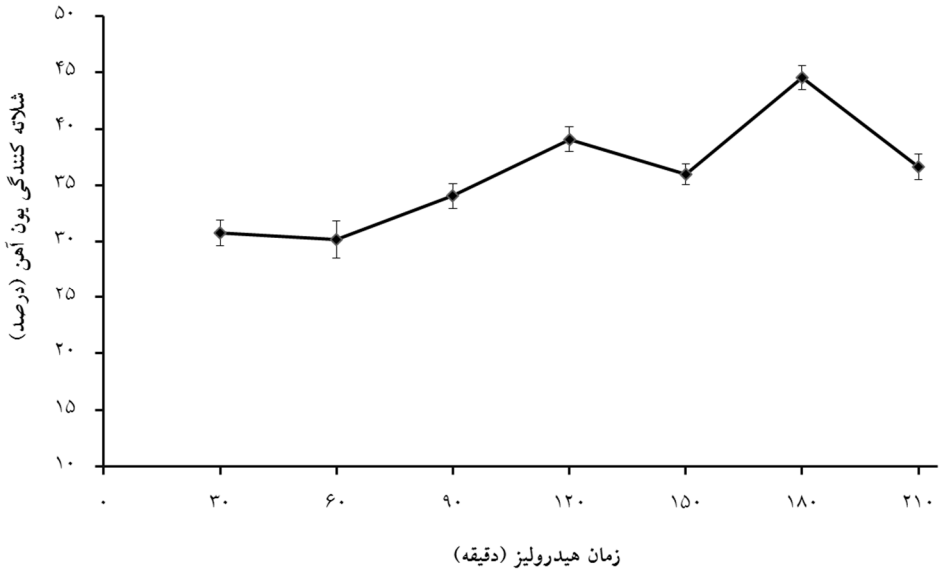


شکل 5- قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در 45 درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مختلف

همان گونه که در شکل 5 مشخص است با افزایش زمان هیدرولیز در هر سه فعالیت آنزیم 30، 60 و 90 واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین، ابتدا فعالیت آنتی‌اکسیدانی تا زمان‌های 120 و 150 دقیقه به اوج خود رسید و پس از آن روند نزولی پیدا نمود. درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH برای BHT، 83/65 محاسبه گردید که در مقایسه با بالاترین فعالیت ضداکسایشی پروتئین هیدرولیزشده که 57/5 درصد بود اختلاف معنی‌دار داشت ($p<0/05$). کمترین میزان هیدرولیز، در هر سه سطح آنزیم در تیمارهایی با زمان هیدرولیز 60 دقیقه قرار داشت ($p<0/05$). دلیل این موضوع شاید فرصت کم برای دسترسی مناسب آنزیم به سوبسترا، جهت شکستن پیوندهای پپتیدی باشد. شکل 5 نشان می‌دهد که فعالیت مهار رادیکال آزاد با پیشرفت زمان هیدرولیز، به مقدار مشخصی رسید و سپس از میزان آن کاسته شد. این فعالیت در اغلب تیمارها با رسیدن زمان هیدرولیز تا حدود 150 دقیقه، به حداکثر خود رسید و با ادامه‌ی افزایش زمان، از میزان آن کاسته شد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد در زمان هیدرولیز 150 دقیقه و نسبت آنزیم 60 واحد آنسون بر کیلوگرم برابر با 57/5 درصد بود (اختلاف با تیمارهای قبل و بعد معنی‌دار بود ($p<0/05$)). کاهش مقدار فعالیت مهارکنندگی توسط پروتئین هیدرولیز شده با زیاد شدن زمان هیدرولیز می‌تواند ناشی از، پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده‌ی پروتئینی باشد که این موضوع باعث شکستن زنجیره‌ی برخی از پپتیدهای ضداکسایش تشکیل شده در مراحل اولیه‌ی هیدرولیز و کاهش آن‌ها می‌شود. تغییر در اندازه، میزان و ساختار آمینواسیدها و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار می‌دهد (Wu *et al.*, 2003).

فعالیت مهارکنندگی یون آهن (Fe^{++})

همان‌گونه که در شکل 6 مشخص است بالاترین فعالیت مهارکنندگی یون آهن در زمان هیدرولیز 180 دقیقه و به میزان 44/56 درصد به دست آمد که در مقایسه با سایر زمان‌های هیدرولیز اختلاف معنی‌داری از خود نشان می‌دهد ($p<0/05$). بین زمان‌های 30 با 60 دقیقه و 150 با 210 دقیقه اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($p>0/05$).



شکل 6- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 45 درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی 60 واحد آنسون بر کیلوگرم

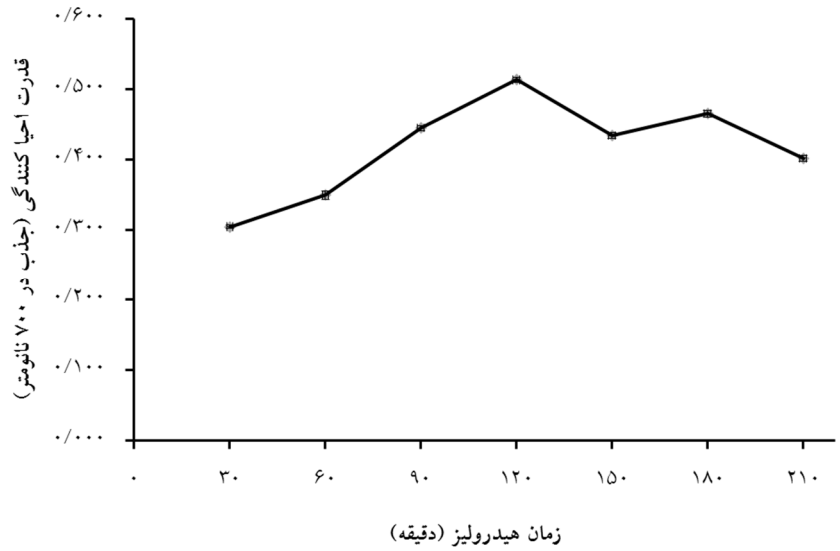
نتایج فعالیت مهارکنندگی یون آهن برخلاف فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH که ابتدا صعودی و سپس نزولی بود از روند مشخصی پیروی نکرده است و در زمان هیدرولیز 120 دقیقه ابتدا به ماکزیمم نسبی رسیده و سپس در 150 دقیقه دوباره کاهش یافت. در زمان هیدرولیز 180دقیقه بیشترین فعالیت مهارکنندگی مشاهده گردید و در زمان 210 دقیقه مجدداً کاهش یافت. به دلیل ایجاد پپتیدها با اندازه‌های مولکولی مختلف در هر تیمار زمانی، فعالیت شلاته کنندگی متفاوت خواهد بود (Je *et al*., 2009). Samaranayaka و Li-Chan (2008) در بررسی قدرت مهارکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک اقیانوس آرام[1] (*Merluccius productus*)، فعالیت مهارکنندگی 7 تا 46 درصد را ثبت نمودند و Thiansilakul و همکاران (2007) فعالیت مهارکنندگی 60 درصد را از پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی اسکاد حلقوی (*Decapterus maruadsi*) حاصل نمودند.

Gimenez و همکاران (2009) در مطالعه‌ی پروتئین هیدرولیز شده‌ی پوست سول و اسکوئید، به مقادیر بالای 80 درصد جهت این منظور دست یافتند. آن‌ها گزارش نموده‌اند که گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه‌ی اسیدی (اسید آسپارتیک و اسید گلوتامیک) و اسیدهای آمینه‌ی بازی (آرژینین، هیستیدین و لایزین) در مهار یون‌های فلزی نقش اصلی را ایفا می‌نمایند. می‌توان این‌گونه استنباط نمود که در زمان هیدرولیز 180 دقیقه بیشترین میزان این اسیدهای آمینه در دسترس می‌باشند و به همین دلیل بالاترین میزان مهارکنندگی یون‌های آهن به دست آمده است.

قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده

روند تغییرات مربوط به قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی کاراس آن در شکل 7 نشان داده شده است. همان‌گونه که مشخص است روند افزایشی قدرت احیاکنندگی تا زمان 120 دقیقه‌ی هیدرولیز ادامه یافته و در زمان 150 دقیقه دستخوش کاهش شده و دوباره در زمان 180 دقیقه افزایش یافته و در زمان 210 دقیقه نیز کاهش از خود نشان داد. این روند تقریبا مشابه روند مشاهده شده در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH بود، با این تفاوت آشکار که در زمان هیدرولیز 150 دقیقه، از قدرت احیاکنندگی نسبت به زمان‌های قبل و بعد کاسته شد.

1- Pacific hake



شکل 7- قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای 45 درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی 60 واحد آنسون بر کیلوگرم

جهت مقایسه قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از محلول اسیدآسکوربیک با غلظت 100 قسمت در میلیون (Jayaprakasha *et al*., 2001) به عنوان یک عامل احیاکننده استفاده شد که جذب نمونه مربوط به آن در طول موج 700 نانومتر، 0/762 به‌دست آمد، بین میانگین جذب تمامی نمونه‌ها و جذب نمونه‌ها با تیمار اسیدآسکوربیک تفاوت معنی‌دار وجود داشت ($p<0/05$) و بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشده در زمان هیدرولیز 120 دقیقه، با میزان جذب 0/513 به دست آمد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک 100 قسمت در میلیون، 67/32 درصد از قدرت احیاکنندگی از خود نشان داد. Samaranayaka و Li-Chan (2008) در بررسی قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک اقیانوس آرام به مقادیر 0/227 تا 0/603 دست یافتند.

نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق در رابطه با فرایند تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از ماهی کاراس نشان داد که تولید این محصول به صورت موثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از فاکتورهای دما، زمان و مقدار آنزیم تاثیر کاملاً معنی‌داری بر کیفیت محصول دارند. همچنین نتایج مطالعات دیگر تحقیقات در رابطه با تولید محصول هیدرولیز شده‌ی پروتئینی نشان می‌دهد که انتخاب آنزیم مورد استفاده نیز یکی از فاکتورهای تاثیرگذار در کیفیت محصول می‌باشد. آنزیم ممکن است بر اساس چندین معیار از جمله گسترش طعم محصول، خصوصیات فیزیکی و شیمیایی و یا کاهش تلخی پروتئین هیدرولیز شده، انتخاب شود. آنزیم Alcalase 2.4 L قابلیت خوبی در هضم منابع پروتئینی از خود نشان داده است که دارای هزینه‌ای نسبتاً پائین نیز می‌باشد.

امروزه استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی به دلیل خطراتی که برای سلامتی انسان دارند، با محدودیت‌هایی مواجه است. بر این اساس استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی نسبت به محصولات سنتزی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. به همین دلیل در پژوهش حاضر، علاوه بر تولید محصول هیدرولیز شده‌ی پروتئینی، به بررسی و شناسایی رفتار ضداکسایشی محصول و بررسی اثر شرایط مختلف تولید بر ویژگی آن‌ها پرداخته شد. نتایج حاکی از پایین تر بودن قدرت پروتئین هیدرولیزشده نسبت به مقادیر تیمارهای مقایسه شامل BHT و اسید آسکوربیک بود. با توجه به این که آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به طور معمول به دلیل قدرت پایین‌تر خود نسبت به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در مقادیر بیشتری به عنوان جایگزین با آنها استفاده می‌شوند،

در این مورد نیز می‌توان مصرف درصدهای بالاتر را جهت اثر هرچه بیشتر توصیه نمود. در نهایت با بررسی و مقایسه‌ی عملکرد ضداکسایشی پروتئین هیدرولیز شده می‌توان گفت که این محصول به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی به همراه ارزش تغذیه‌ای بالا و دیگر خواص زیستی، در غلظت‌های مناسب قابل رقابت با آنتی اکسیدان‌های سنتزی می‌باشد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله نویسندگان مراتب قدردانی و تشکر خود را از جناب آقای دکترمحمودرضا اویسی پور به دلیل مساعدت های فکری در انجام پژوهش اعلام می‌دارند.

منابع

1- اویسی‌پور، م.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع.، و نظری، ر. 1389. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با استفاده از آنزیم‌های تجاری. نشریه‌ی پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. 6 (1): 68-76.

2- پروانه، و. 1385. کنترل کیفی و آزمایش های شیمیایی مواد غذایی. چاپ سوم. موسسه‌ی چاپ و انتشارات دانشگاه تهران. 332 ص.

3- AOAC. Official methods of analysis (18th ed.). 2000. Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

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

5- Bhaskar, N., Benila, T., Radha ,C., & Lalitha, R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, 99 (2): 335-343.

6- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. 2009. Antioxidant & free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. Food Chemistry, 114:1198-1205.

7- Chabeaud, A., Dutournie, P., Guerard, F., Vandanjon, L., & Bourseau, P. 2009. Application of Response Surface Methodology to Optimise the Antioxidant Activity of a Saithe (*Pollachius virens*) Hydrolysate. Marine Biotechnology. 11: 445–455

8- Diniz, A.M., & Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. International Journal of Food Science and Nutrition, 48: 191-200.

9- FAO (Food and Agriculture Organization), Fisheries and Aquaculture Department, Cultured Aquatic Species Information Programme. Available online at: http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Carassius _carassius/en, (September 2013).

10- Gimenez, B., Aleman, A., Montero, P., & Gomez-Guillén, M.C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chemistry. 114: 976-983.

11- Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 20: 489-498.

12- Hoyle, N. T., & Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59: 76-79.

13- IFIS (International Food Information Service). 2009. Dictionary of food science and technology. John Wiley & Sons, United Kingdom, pp: 114-115.

14- Jayaprakasha, G. K., Singh, R. P., & Sakariah, K. K. 2001. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. Food Chemistry, 73:285-290.

15- Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., & Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42: 1266-1272.

16- Kristinsson, H.G., & Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. Food Science and Nutrition, 40: 43-81.

17- Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., & Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry, 106: 444-450.

18- Motamedzadegan, A., Davarniam, B., Asadi, G., Abedian, A.M., & Ovissipour, M.R. 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) viscera using Neutrase. International Aquatic Research. 2: 173-181.

19- Nalinanon, S.T., Benjakul, S., Kishimura, H., & Shahidi, F. 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chemistry, 124: 1354-1362.

20- Ovissipour, M. R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry, 115: 238-242.

21- Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., & Esmaeili Mulla, A. 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *(Huso huso)* using Alcalase. International Aquatic Research, 1: 31-38.

22- Samaranayaka, A.G.P., & Li-Chan, E.C.Y. 2008. Autolysis-assisted production of protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Food Chemistry, 107: 768-776.

23- Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storro, I., & Rustad, T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Process Biochemistry, 40: 2021-2033

24- Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., & Habibi-Rezaei, M. 2011. Poultry by-products and enzymatic hydrolysis: optimization by response surface methodology using Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering, 7: 1556-3758.

25- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & F. Shahidi. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using alcalase and flavourzyme. Journal of Food Biochemistry, 31: 266-287.

26- Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M., & Millgn, F. 2001. Obtencion yaplicaciones de hidrolizados proteicos. Journal of Grasas Aceites, 52: 132-136.

27- 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.

Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius)*

Alireza Mehregan Nikoo[1], Alireza Sadeghi Mahoonak[2*], Mohammad Ghorbani[2], Ali Taheri[3], Mehran Alami[4], Faeze Kamali[1]

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2- Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
* Corresponding author (sadeghiaz@yahoo.com)
3- Assistant Professor, Department of Fisheries, University of Chabahar Maritime and Marine Science
4- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

Abstract

In this study protein hydrolysate was produced from the crucian carp using Alcalase 2.4L. The effect of temperature (40, 45, 50 and 55°C), time (60, 90, 120, 150, 180 & 210min) and enzyme/substrate (Protein) at ratio of (30, 60 and 90 Anson unit), on degree of hydrolysis and antioxidant activity of product were investigated in a in a completely randomized design. The highest degree of hydrolysis was observed at 45°C, after 180min and enzyme/substrate ratio of 60 Anson unit/ Kg substrate. Under these conditions, degree of hydrolysis was 39.38 %. The antioxidant activity of protein hydrolysate was studied using DPPH radical scavenging activity, reducing power and Fe^{++} chelating activity. The most DPPH radical scavenging activity was 57.5%, that was obtained at 45ºC, enzyme activity of 60 Au/kg and 150min of time of hydrolysis. Highest Fe^{++} chelating activity (44.56%) observed at 45ºC, enzyme activity of 60 Au/kg, and hydrolysis time of 180min. The highest reducing ability of protein hydrolysate observed at 120min. Hydrolysis time which showed 67.32% reducing power compared to 100 ppm ascorbic acid (100 %).

Keywords: Antioxidant activity, *Carassius carassius*, Enzymatic Hydrolysis, Protein hydrolysate