



دانشگاه گیلان

بهره‌برداری و پرورش آبزیان

جلد چهارم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۴

<http://japu.gau.ac.ir>

## بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین ضایعات سر سینه میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) با استفاده از روش سطح پاسخ

### بهاره شعبانپور<sup>۱</sup>، \* معزله کردجزی<sup>۲</sup> و خاطره نظری<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup>استاد گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، استادیار گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، آکارشناسی ارشد فراوری محصولات شیلاتی،

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۸؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۷/۲۶

### چکیده

جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده شامل نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و زمان به‌منظور دستیابی به بالاترین خواص آنتی‌اکسیدانی، مینس تهیه شده از ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) با استفاده از پروتئاز تجاری آلکالاز بر اساس ۱۸ تیمار تعیین شده با طرح آزمایشات سطح پاسخ، هیدرولیز شده و با خشک کن انجمادی به‌صورت پودر آماده گردید. آزمایش‌های مربوط به خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با سه روش قدرت دفع رادیکال‌های آزاد DPPH، هیدروکسیل و قدرت احیای آهن انجام شدند. به‌طور کلی فرآورده‌های تولید شده پاسخ بهتری به دفع رادیکال آزاد DPPH در مقایسه با قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل و قدرت احیای آهن نشان دادند. درجه هیدرولیز آنزیم آلکالاز ۴۹/۷ درصد و میزان پروتئین حاصل از آن ۸۶/۹ درصد وزن خشک بود. از میان تیمارها، تیمار ۱۱ (نسبت آنزیم به سوبسترا ۲/۵ درصد، دما ۷۵ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۸۵ دقیقه) به‌عنوان تیمار بهینه بر اساس خواص آنتی‌اکسیدانی برگزیده شد.

واژه‌های کلیدی: آلکالاز، سطح پاسخ، آنتی‌اکسیدانی، میگوی ببری سبز

\*مسئول مکاتبه: [kordjazi.m@gmail.com](mailto:kordjazi.m@gmail.com)

## مقدمه

یکی از عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل‌آوری آبزیان شامل امعا و احشا، پوست، فلس، ستون مهره، استخوان‌های تنه ماهیان و ضایعات سرسینه و پوست میگو و دیگر سخت‌پوستان است (بنجاکول و موریسی، ۱۹۹۷). این ضایعات حاوی مواد غذایی ارزشمندی مانند پروتئین، چربی، کیتین، فیبر، مواد معدنی و رنگدانه‌ها هستند که وجود این مواد مغذی باعث تسریع فساد در آن‌ها می‌شود (بهاسکار و همکاران، ۲۰۰۸). از این رو یافتن راهی برای استفاده از این ضایعات و بازیافت مواد زیستی ارزشمند آن‌ها ضروری به‌نظر می‌رسد تا علاوه بر رفع مشکل انهدام این ضایعات، تولید محصولاتی با ارزش افزوده گردد.

تبدیل محصولات جانبی و ضایعات فرآوری صنایع شیلاتی به مواد دیگری که دارای ارزش دارویی یا تغذیه‌ای باشند هر روزه علاقمندی بیشتری را به خود جلب می‌کند. فرآیندهای شیمیایی و فیزیکی برای انجام این تغییرات هر یک محدودیت‌های خاص خود را در رابطه با کیفیت و کاربرد محصول نهایی ایجاد می‌کنند؛ در حالی که به‌نظر می‌رسد روش آنزیمی دارای اولویت بیشتری بوده و محصول نهایی مناسب‌تری تولید می‌کند. با توجه به پژوهش‌های صورت گرفته در این راستا، به‌نظر می‌رسد یکی از بهترین راه‌ها جهت بازیافت پروتئین‌ها از ضایعات، استفاده از پروتئازها است. به‌نظر می‌رسد کاربرد این روش رو به افزایش است زیرا پروتئین به‌دست آمده از هیدرولیز آنزیمی ارزش غذایی، دارویی و خواص کاربردی بسیار خوبی دارد. از این رو نیاز به انجام تحقیقات گسترده در این زمینه و افزایش اطلاعات برای توسعه بیشتر این روش احساس می‌شود (کریستینسون و راسکو، ۲۰۰۰؛ جرارد و همکاران، ۲۰۰۱).

ضایعات میگو شامل ۷۱/۴ درصد سر و ۲۸/۶ درصد پوسته است که برای این ضایعات دو مشکل بزرگ انهدام و فساد مطرح است. از طرفی نیز این ضایعات حاوی مواد ارزشمندی مانند پروتئین، چربی و رنگدانه آستاگزانتین هستند. بنابراین ضایعات صنایع فرآوری میگو، منبع مهمی برای استخراج این مواد ارزشمند در تولیدات آبزیان است (روتاناپورنواری و همکاران، ۲۰۰۵). مطالعات گذشته نشان داده‌اند که آلکالاز یکی از کارآمدترین آنزیم‌ها در بین آنزیم‌های پروتئولیتیک جهت هیدرولیز پروتئین می‌باشد که قادر به تولید بالاترین درجه هیدرولیز است (انجی و مهدخان، ۲۰۱۲).

پروتئین هیدرولیز شده آبزیان معمولاً به‌عنوان غذای سالم و کاربردی مطرح شده، همچنین خواص دارویی مختلفی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضدباکتریایی، ضد حساسیت و ضد سرطانی را نیز دارا

می‌باشند (آسیمو و همکاران، ۲۰۰۵؛ چالامایه و همکاران، ۲۰۱۲). از این رو جداسازی و خالص‌سازی آنتی‌اکسیدان طبیعی (جه و همکاران، ۲۰۰۷) از ضایعات میگو می‌تواند چاره خوبی برای افزایش کیفیت ضایعات در صنعت عمل‌آوری میگو باشد. به آن سبب که گزارش‌هایی مبنی بر وجود خطرات ناشی از برخی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بر سلامتی انسان مطرح شده است و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در برخی از کشورها محدود شده است (باتیستا و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به صنعت رو به رشد آبی پروری و صنایع وابسته به آن در ایران، به‌نظر می‌رسد که پتانسیل بالایی جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده وجود داشته باشد. در این پژوهش از ضایعات (سرسینه) میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus* De Haan, 1844) برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده شده است.

### مواد و روش‌ها

**میگوی ببری سبز:** ضایعات سر سینه میگوی ببری سبز در مرداد ماه سال ۱۳۹۰ به‌میزان ۱۰ کیلوگرم از کارخانه فرآوری احرار واقع در استان بوشهر تهیه و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شدند. سپس با استفاده از یونولیت به شکل یخ‌گذاری شده به آزمایشگاه فرآوری دانشکده شیلات و محیطزیست دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل گشتند. آلکالاز (2.4 L) آنزیم پروتئاز میکروبی که از باکتری *Bacillus licheniformis* به‌دست می‌آید، از شرکت نووازیم دانمارک در ایران تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

**تولید پروتئین هیدرولیز شده:** برای تهیه پروتئین هیدرولیز شده از روش جرارد و همکاران (۲۰۰۱) استفاده شد. نمونه انجماد زدایی شده به نسبت وزنی: حجمی ۱:۲ (نمونه چرخ شده: آب) در بن‌ماری (Memert, WMB14, Germany)، با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه جهت غیرفعال نمودن آنزیم‌های داخلی نمونه چرخ‌شده حرارت‌دهی شدند. pH محلول‌ها با استفاده از هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال و یا هیدروکلریک اسید ۲ مولار به pH موردنظر رسانده شد. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (IKA KS 4000 ic Control, Germany) در دمای موردنظر (جدول ۱) برای انجام آزمایش‌ها با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. آنزیم‌ها به مقادیر مشخص بر اساس اطلاعات جدول ۱، به ارلن‌مایرهای حاوی مخلوط ماده خام اولیه و آب مقطر تزریق شدند. پس از هر نمونه‌گیری (نمونه‌گیری‌ها به‌صورت تصادفی انجام گرفت) و در پایان آزمایش به‌منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها در بن‌ماری با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه حرارت‌دهی شدند (جرارد

### بهره‌برداری و پرورش آبزیان (۴)، شماره (۳) پاییز ۱۳۹۴

و همکاران، ۲۰۰۱؛ اویسی‌پور و همکاران، ۲۰۰۹). سپس نمونه‌ها در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸۰۰۰ g به مدت ۲۰ دقیقه در سانتریفیوژ یخچال‌دار (Eppendorf, 5810R, Germany) قرار گرفتند. مایع روئی آن‌ها جمع‌آوری و لیوفیلیزه گردید (کریستینسون و راسکو، ۲۰۰۰).

**درجه هیدولیز:** میزان هیدرولیز براساس روش هوپل و مریت (۱۹۹۴) به کمک تری کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد.

(معادله ۱) (میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد/میزان پروتئین در نمونه) = درجه هیدرولیز

**تعیین ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین هیدرولیز شده تولیدی:** اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌ها (ماده خام و پروتئین هیدرولیز شده تولیدی) به روش کلدال (N×6.25)، اندازه‌گیری چربی نمونه‌ها (ماده خام و پروتئین هیدرولیز شده تولیدی) با روش سوکسله و با استفاده از حلال پترولیوم اتر و اندازه‌گیری مقدار خاکستر در نمونه‌ها با سوزاندن کامل در کوره ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد صورت گرفتند (AOAC, ۲۰۰۵).

#### تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی

**قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH:** با استفاده از روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) با اندکی تغییرات، درصد بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH برای تیمار آلکالاز اندازه‌گیری شد. بر این اساس ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول واکنش را با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH در اتانول ۹۵ درصد 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 اسپکتروفوتومتر (Biochrom, Libra S12, UK) 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.

(معادله ۲)  $100 \times \{ \text{جذب نمونه شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}) \} = \text{درصد بازدارندگی}$

**قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل:** با استفاده از روش چونگ و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییرات اندازه‌گیری گردید. طبق این روش ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن آبدار ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) با غلظت ۱۰ میلی‌مول را با ۲۰۰ میکرولیتر 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 ۷/۴) به خوبی مخلوط گردیده، سپس ۲۰۰ میکرولیتر  $H_2O_2$  با غلظت ۱۰ میلی مول به آن افزوده و در ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴ ساعت در انکوباتور قرار گرفت. سپس ۱ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۲/۸ درصد و ۱ میلی لیتر تیوباربیتوریک اسید ۲۰ میلی مول به آن اضافه نموده و به خوبی مخلوط گردید. سپس نمونه را در حمام آبی با دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده و پس از آن با غوطه وری در مخلوط آب و یخ به مدت ۵ دقیقه ظروف حاوی نمونه ها سرد و جذب آن ها 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.

**قدرت احیای آهن ( $Fe^{2+}$  به  $Fe^{3+}$ ):** بر اساس روش ایایزو (۱۹۸۶)، مقدار ۱ میلی لیتر از پروتئین هیدرولیز شده رقیق شده را با ۲/۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات (غلظت ۰/۲ مول و pH ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر محلول پتاسیم هگزانوفرات آبدار ۱ درصد مخلوط کرده سپس محلول تهیه شده در تاریکی و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه انکوباسیون گردید. در مرحله بعد ۲/۵ میلی لیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به ظروف حاوی مخلوط واکنش اضافه و در دمای اتاق به مدت ۱۰ دقیقه انکوباسیون گردیدند. پس از آن ۲/۵ میلی لیتر از مخلوط تهیه شده با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلریدفریک آبدار ۰/۱ درصد به خوبی مخلوط کرده و جذب نمونه ها 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.

**تجزیه و تحلیل آماری:** آزمایشات براساس روش کاملاً تصادفی در قالب طرح مرکب مرکزی CCD شامل چهار تکرار در نقطه مرکزی (r)، ۲n نقطه فاکتوریل و ۲n نقطه محوری (n=۳) و جمعاً ۱۸ تیمار انجام شد. مقدار  $\alpha$  (فاصله نقاط محوری از مرکز طرح و مقادیر کدگذاری شده) ۱/۶۸۲ محاسبه شد. سطوح آزمون و مقادیر واقعی بر اساس رابطه تبدیل مقادیر کدگذاری شده به دست آمدند و در جدول ۱ ثبت شدند. در این روش هر متغیر مستقل در ۵ سطح مورد آزمون قرار می گیرد.

جدول ۱- مقادیر عوامل متغیر برای آنزیم آلکالاز.

متغیرها	+ $\alpha$	+1	0	-1	- $\alpha$
نسبت آنزیم به سویسترا (درصد) ( $X_1$ )	۴	۳/۳۹	۲/۵	۱/۶۱	۱
دما (سانتی گراد) ( $X_2$ )	۷۵	۷۰/۹۴	۶۵	۵۹/۰۶	۵۵
زمان (دقیقه) ( $X_3$ )	۱۲۰	۱۰۵/۸	۸۵	۶۴/۲	۵۰

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

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i X_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j=i+1}^3 \beta_{ij} X_i X_j \quad (\text{معادله ۳})$$

که در آن Y نشان‌دهنده متغیر تابع یا پاسخ (قدرت دفع رادیکال‌های آزاد DPPH)،  $\beta_0$  (عرض از مبدأ) عدد ثابت،  $\beta_i$ ،  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  ضرایب مدل رگرسیون و  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای مستقل هستند. در روش RSREG، پارامترهای یک معادله درجه دوم کامل که تشکیل سطح می‌دهند، بر داده‌ها برآزش شده و مقادیر بهینه هریک از پارامترها و سطح حاصل از معادله درجه دوم بر داده‌های برآزش داده شده، تعیین شد. سپس نمودارهای سطح پاسخ و کانتور، با استفاده از نرم‌افزار MATLAB، نسخه ۶/۵ رسم گردیدند.

## نتایج

تأثیر نوع آنزیم: اثر آنزیم تجاری آلکالاز روی ترکیب شیمیایی، درجه هیدرولیز و خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مورد مطالعه قرار گرفت که نتایج آن در زیر ارائه شده است.

جدول ۲- ترکیب شیمیایی ماده خام اولیه و میانگین ۱۸ تیمار پروتئین هیدرولیز شده میگوی بیری سبز بر اساس وزن خشک.

پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر (درصد)	ماده خام
۴۳/۴±۱/۳	۹/۸±۰/۶	۲۹/۴±۲/۴	
۸۶/۹±۲/۲۵	۱/۳±۰/۴	۵/۳±۰/۸	پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز

همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

## بهینه‌سازی فرآیند هیدرولیز پروتئین

بررسی مدل‌های برآزش شده: نتایج به‌دست آمده از آزمایش‌ها بر روی پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز به‌صورت مقادیر پاسخ در طرح مرکب مرکزی به همراه درجه هیدرولیز پروتئین در جدول ۳ نشان داده شده است. دستورالعمل RSREG در نرم‌افزار SAS به‌منظور برآزش معادله چند جمله‌ای درجه دوم برای داده‌های آزمایشی استفاده شد. تمام ضرایب ساده ( $X_1$ ،  $X_2$ ،  $X_3$ )، درجه دوم ( $X_{11}$ ،

## بهاره شعبانپور و همکاران

$X_{22}$ ،  $X_{33}$  و اثرات همزمان آنها ( $X_{21}$ ،  $X_{31}$ ،  $X_{32}$ ) برای بررسی معنی‌دار 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 ۴ ارائه شده است. به‌منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برآزش شده، تمام ضرایب فاقد معنی ( $P > 0.05$ ) حذف شدند و ضرایب معنی‌دار به‌صورت مدل در جدول ۵ نشان داده شده است. همچنین معنی‌داری و اعتبار مدل پیش از استفاده بررسی شد تا صحت و اثر بخشی مدل تعیین شود (جدول ۶). نتایج سنجش درجه هیدرولیز نشان داد که بالاترین مقدار آن مربوط به تیمارهای تولید شده با آنزیم آلکالاز معادل ۴۹/۵ درصد بوده است.

جدول ۳- طرح مرکب مرکزی و پاسخ‌های متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگوی ببری سبز با استفاده از آنزیم آلکالاز و درجه هیدرولیز.

DH	$Y_3$	$Y_2$	$Y_1$	$X_3$	$X_2$	$X_1$	مشاهدات
۴۵/۸	۳۷/۴	۸۸/۵	۸۱/۴	۱	۱	۱	۱
۴۱/۵	۵۶/۷	۹۳/۹	۸۹/۱	-۱	۱	۱	۲
۳۱/۲	۱۴/۱	۹۰/۲	۸۱/۲	۱	-۱	۱	۳
۱۸/۵	۳۷/۸	۸۹/۱	۸۲	-۱	-۱	۱	۴
۲۳/۶	۴۵/۴	۸۶/۶	۶۹/۵	۱	۱	-۱	۵
۱۱/۵	۴۸/۱	۸۵/۳	۶۹/۶	-۱	۱	-۱	۶
۳۰/۲	۵۰/۳	۹۰/۴	۶۹/۶	۱	-۱	-۱	۷
۱۰/۲	۲۷/۱	۸۹/۸	۷۰	-۱	-۱	-۱	۸
۴۹/۵	۴۹/۶	۸۴/۸	۸۶/۷	۱/۶۸۲	۰	۰	۹
۲۱/۳	۲۶/۱	۸۶	۸۳/۱	-۱/۶۸۲	۰	۰	۱۰
۲۶/۴	۵۸/۷	۹۶	۷۸/۷	۰	۱/۶۸۲	۰	۱۱
۲۹/۱	۲۶/۹	۹۴/۸	۸۲/۸	۰	-۱/۶۸۲	۰	۱۲
۴۶/۶	۴۵/۱	۹۱/۷	۹۷/۹	۰	۰	۱/۶۸۲	۱۳
۲۱/۸	۳۸/۱	۸۹/۸	۵۷/۳	۰	۰	-۱/۶۸۲	۱۴
۲۶/۴	۱۹/۴	۹۶	۹۴/۶	۰	۰	۰	۱۵
۳۰/۶	۳۲/۲	۹۵/۴	۹۱/۸	۰	۰	۰	۱۶
۳۲	۲۳/۶	۹۴	۸۷/۵	۰	۰	۰	۱۷
۲۷/۲	۲۳/۷	۹۵/۴	۸۵	۰	۰	۰	۱۸

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

بهره‌برداری و پرورش آبزیان (۴)، شماره (۳) پاییز ۱۳۹۴

جدول ۴- ضرایب معادله چند جمله‌ای برازش شده برای پاسخ‌های مختلف.

آنزیم	پارامتر	Y <sub>1</sub>	Y <sub>2</sub>	Y <sub>3</sub>
آلکالاز	عرض از مبدأ	۸۹/۹۲۴۶۹۰*	۹۵/۲۴۹۹۰۱*	۲۴/۸۳۲۴۰۸*
	X <sub>1</sub>	۹/۰۲۹۶۶۷*	۰/۹۳۷۵۰۰*	-۰/۹۶۳۰۰۴
	X <sub>2</sub>	-۰/۰۰۶۴۴۹	-۰/۲۳۳۳۴۹	۸/۱۸۸۰۲۸*
	X <sub>3</sub>	-۰/۲۱۶۳۴۶	-۰/۳۲۳۶۴۰	۱/۲۴۴۴۳۰
	X <sub>11</sub>	-۵/۱۶۳۴۹۶*	-۱/۷۹۳۴۵۷*	۵/۵۱۲۳۴۵*
	X <sub>21</sub>	۰/۹۷۵۰۰۰	۱/۴۲۵۰۰۰*	۳/۲۶۲۵۰۰
	X <sub>22</sub>	-۴/۰۴۷۴۲۴*	-۰/۱۴۵۹۲۳	۵/۹۳۷۵۱۵*
	X <sub>31</sub>	-۱/۰۰۰۰۰۰	-۰/۷۷۵۰۰۰	-۷/۹۳۷۵۰۰*
	X <sub>32</sub>	-۰/۸۲۵۰۰۰	-۰/۷۲۵۰۰۰	-۲/۶۸۷۵۰۰
	X <sub>33</sub>	-۲/۵۷۷۰۴۴	-۳/۶۸۹۰۰۷*	۲/۵۱۷۱۳۲

X<sub>1</sub> (نسبت آنزیم به سویسترا، درصد)، X<sub>2</sub> (دما، درجه سانتی‌گراد)، X<sub>3</sub> (زمان، دقیقه)، Y<sub>1</sub> (قدرت دفع رادیکال DPPH، درصد)، Y<sub>2</sub> (قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل، درصد)، Y<sub>3</sub> (قدرت احیای آهن، درصد) \* معنی‌دار ۰/۰۵ ≤ p

جدول ۵- مدل سطح پاسخ.

آنزیم	پاسخ‌ها	معادله چند جمله‌ای	R <sup>2</sup>	P-Value
آلکالاز	Y <sub>1</sub>	$Y_1 (\%) = 89.924 + 9.029 X_1 - 5.163 X_1^2 - 4.047 X_2^2$	۰/۸۷۳	۰/۰۰۹
	Y <sub>2</sub>	$Y_2 (\%) = 95.249 + 0.937 X_1 - 1.793 X_1^2 + 1.425 X_2 * X_1 - 3.689 X_3^2$	۰/۹۳۴	۰/۰۰۰
	Y <sub>3</sub>	$Y_3 (\%) = 24.832 + 8.188 X_2 + 5.512 X_1^2 + 5.937 X_2^2 - 7.937 X_3 * X_1$	۰/۷۸۶	۰/۰۵۵

X<sub>1</sub> (نسبت آنزیم به سویسترا، درصد)، X<sub>2</sub> (دما، درجه سانتی‌گراد)، X<sub>3</sub> (زمان، دقیقه)، Y<sub>1</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، درصد)، Y<sub>2</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، درصد)، Y<sub>3</sub> (قدرت احیای آهن، درصد).

جدول ۶- آنالیز واریانس (ANOVA) اثر ساده متغیرها بر ویژگی‌های مورد آزمایش.

آنزیم	پاسخ‌ها	متغیر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	سطح F	سطح P
Y <sub>1</sub>		X <sub>1</sub>	۴	۱۴۶۴/۳۸۵	۳۶۶/۰۹۶	۱۲/۶۰۲	۰/۰۰۱
		X <sub>2</sub>	۴	۲۱۹/۶۵۳	۵۴/۹۱۳	۱/۸۹۰	۰/۲۰۵
		X <sub>3</sub>	۴	۹۷/۸۴۰	۲۴/۴۶۰	۰/۸۴۲	۰/۵۳۵
آلکالاز	Y <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	۴	۷۳/۶۰۸	۱۸/۴۰۲	۸/۹۲۱	۰/۰۰۴
		X <sub>2</sub>	۴	۲۱/۴۶۱	۵/۳۶۵	۲/۶۰۱	۰/۱۱۶
		X <sub>3</sub>	۴	۱۸۲/۰۷۱	۴۵/۵۱۷	۲۲/۰۶۵	۰/۰۰۰
Y <sub>3</sub>		X <sub>1</sub>	۴	۶۸۶/۶۸۵	۱۷۱/۶۷۱	۵/۵۳۵	۰/۰۱۹
		X <sub>2</sub>	۴	۱۶۰/۲۴۰	۴۰/۰۶۰	۱/۲۹۲	۰/۳۵۰
		X <sub>3</sub>	۴	۴۵۶/۸۱۷	۱۱۴/۲۰۴	۳/۶۸۲	۰/۰۵۵

X<sub>1</sub> (نسبت آنزیم به سویسترا، درصد)، X<sub>2</sub> (دما، درجه سانتی‌گراد)، X<sub>3</sub> (زمان، دقیقه)، Y<sub>1</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، درصد)، Y<sub>2</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، درصد)، Y<sub>3</sub> (قدرت احیای آهن، درصد)



جدول ۷- آنالیز واریانس (ANOVA) پاسخ متغیرهای وابسته.

سطح P	سطح F	R <sup>2</sup>	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع تغییر	پاسخ‌ها	آنزیم
۰/۰۰۹	۶/۱۲۰	۰/۸۷۳	۱۶۰۰/۱۵۹	۹	مدل رگرسیون	Y <sub>1</sub>	
۰/۰۰۲	۱۲/۷۷۳	۰/۶۰۷	۱۱۱۳/۱۶۶	۳	ساده		
۰/۰۲۵	۵/۳۴۶	۰/۲۵۴	۴۶۵/۹۴۲	۳	درجه دوم		
۰/۸۶۵	۰/۲۴۲	۰/۰۱۱	۲۱/۰۵۰	۳	همزمان	Y <sub>2</sub>	آلکالاز
۰/۰۰۰	۱۲/۵۸۱	۰/۹۳۴	۲۳۳/۵۸۲	۹	مدل رگرسیون		
۰/۱۵۵	۲/۲۸۹	۰/۰۵۶	۱۴/۱۶۴	۳	ساده		
۰/۰۰۰	۳۱/۳۷۴	۰/۷۷۶	۱۹۴/۱۶۲	۳	درجه دوم	Y <sub>3</sub>	
۰/۰۴۹	۴/۰۸۱	۰/۱۰۱	۲۵/۲۵۵	۳	همزمان		
۰/۰۵۵	۳/۲۶۴	۰/۷۸۶	۲۳۴۷/۴۳۹	۹	مدل رگرسیون		
۰/۰۵۳	۳/۹۵۷	۰/۳۱۷	۹۴۸/۵۸۳	۳	ساده	Y <sub>3</sub>	
۰/۰۸۷	۳/۱۳۶	۰/۲۵۱	۷۵۱/۸۹۲	۳	درجه دوم		
۰/۱۱۶	۲/۶۹۹	۰/۲۱۶	۶۴۶/۹۶۳	۳	همزمان		

X<sub>1</sub> (نسبت آنزیم به سویسترا، درصد)، X<sub>2</sub> (دما، درجه سانتی‌گراد)، X<sub>3</sub> (زمان، دقیقه) Y<sub>1</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، درصد)، Y<sub>2</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، درصد)، Y<sub>3</sub> (قدرت احیای آهن، درصد).

جدول ۸- آنالیز باقیمانده‌های مدل‌های رگرسیون.

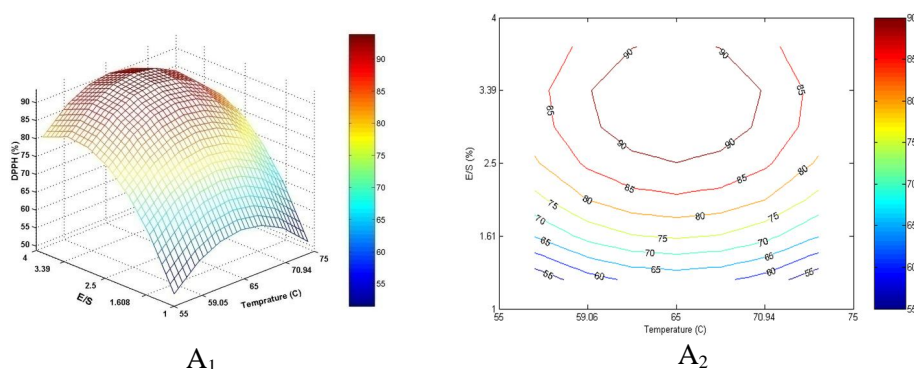
سطح P	سطح F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منابع	پاسخ	آنزیم
۰/۳۱۳	۱/۹۱۹	۳۵/۴۱۰	۱۷۷/۰۵۱	۵	عدم برازش	Y <sub>1</sub>	
		۱۸/۴۴۹	۵۵/۳۴۷	۳	خطای خالص		
		۲۹/۰۴۹	۲۳۲/۳۹۸	۸	خطای کل		
۰/۱۴۲	۳/۹۸۴	۲/۸۶۸	۱۴/۳۴۲	۵	عدم برازش	Y <sub>2</sub>	آلکالاز
		۰/۷۲۰	۲/۱۶۰	۳	خطای خالص		
		۲/۰۶۲	۱۶/۵۰۲	۸	خطای کل		
۰/۱۴۹	۳/۸۳۲	۱۱۰/۵۴۳	۵۵۲/۷۱۷	۵	عدم برازش	Y <sub>3</sub>	
		۲۸/۸۴۹	۸۶/۵۴۷	۳	خطای خالص		
		۷۹/۹۰۸	۶۳۹/۲۶۵	۸	خطای کل		

X<sub>1</sub> (نسبت آنزیم به سویسترا، درصد)، X<sub>2</sub> (دما، درجه سانتی‌گراد)، X<sub>3</sub> (زمان، دقیقه) Y<sub>1</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH، درصد)، Y<sub>2</sub> (قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل، درصد)، Y<sub>3</sub> (قدرت احیای آهن، درصد).

پلات‌های سطح پاسخ و اثر فاکتورها: بعد از تشخیص اعتبار مدل به لحاظ آماری، می‌توان آن را به‌منظور آنالیز و برآورد اثر سطوح مختلف متغیرها بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی به کار برد. روش‌های گرافیکی (دو و سه بعدی) به‌منظور 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 بهینه‌سازی نهایی را انجام داد.

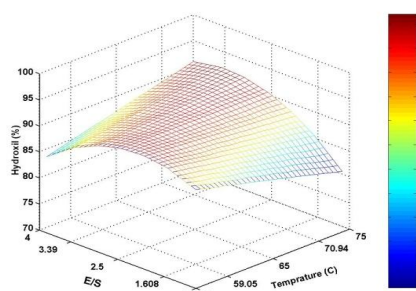
تأثیر شرایط مختلف تولید بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم‌های آلکالاز

تأثیر شرایط مختلف تولید بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم آلکالاز: آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH (جدول ۶) برای آنزیم آلکالاز نشان می‌دهد که اثر متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا معنی‌دار شده است ( $p < 0.05$ ). نمودار سطح پاسخ و کانتور (شکل ۱) اثرات همزمان نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای واکنش، نشان می‌دهند که با افزایش دما از ۵۵ درجه سانتی‌گراد تا نقطه مرکزی و همچنین افزایش مقدار آنزیم از ۱ درصد تا نقطه مرکزی (۲/۵ درصد) قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH توسط پروتئین هیدرولیز شده تولیدی افزایش یافته است و افزایش دما به آرامی سبب افزایش قدرت آنتی‌رادیکالی پروتئین هیدرولیز شده گردیده است.

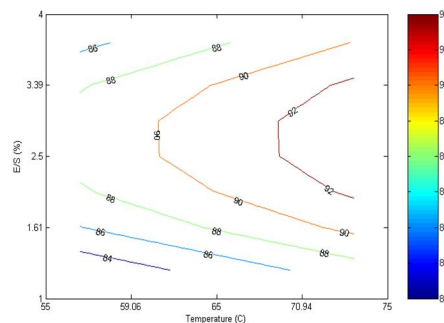


شکل ۱- سطح پاسخ سه بعدی ( $A_1$ ) و کانتور دو بعدی ( $A_2$ ) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و دما بر دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم آلکالاز.

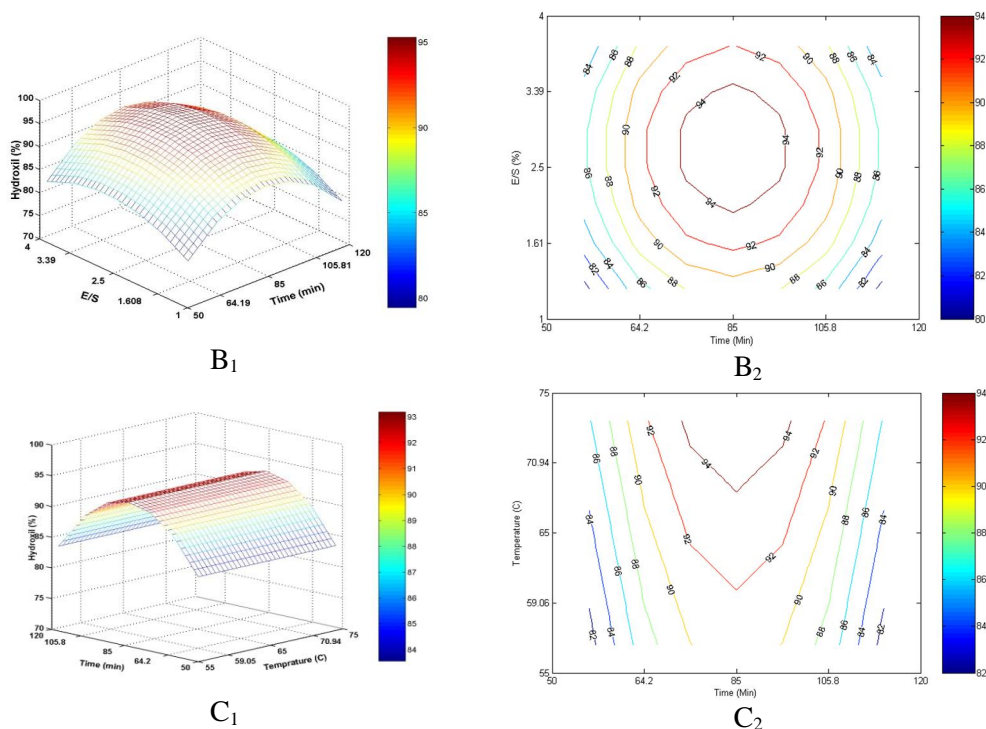
تأثیر شرایط مختلف تولید بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم آلکالاز: آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل (جدول ۶) برای آنزیم آلکالاز نشان می‌دهد که اثر دو متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان معنی‌دار شده است ( $p < 0.05$ ). نمودارهای سطح پاسخ و کانتور شکل ۲ ( $A_1$  و  $A_2$ )، اثرات همزمان مقدار آنزیم و دما نشان می‌دهند که افزایش مقدار آنزیم تا محدوده نقاط مرکزی همزمان با افزایش دما سبب افزایش قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل شده و پس از آن در مقدار ثابت آنزیم در نقطه مرکزی، با افزایش دما قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل افزایش داشته است. در نمودارهای شکل ۲ ( $B_1$  و  $B_2$ ) که تأثیر همزمان مقدار آنزیم و زمان را نشان می‌دهد، بر اساس آنچه مشاهده می‌شود، با افزایش همزمان هر دو متغیر تا محدوده نقاط مرکزی قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل افزایش یافته است و پس از آن با افزایش هر کدام از متغیرهای مقدار آنزیم و زمان قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل توسط پروتئین هیدرولیز شده کاهش یافته است. همچنین در نمودارهای سطح پاسخ و کانتور شکل ۲ ( $C_1$  و  $C_2$ ) اثرات همزمان دما و زمان، مشاهده می‌گردد که با افزایش مدت زمان واکنش از ۵۰ دقیقه تا محدوده نقاط مرکزی (۸۵ دقیقه) قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل افزایش یافته است و تغییرات افزایشی دما به آهستگی بر قدرت آنتی‌رادیکالی پروتئین هیدرولیز شده اثر گذار است و آنچنان‌که آنالیز واریانس اثر ساده متغیرهای فرآیند بر قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل (جدول ۶) برای آنزیم آلکالاز نشان می‌دهد اثر متغیر دما معنی‌دار نشده است ( $p > 0.05$ ).



$A_1$



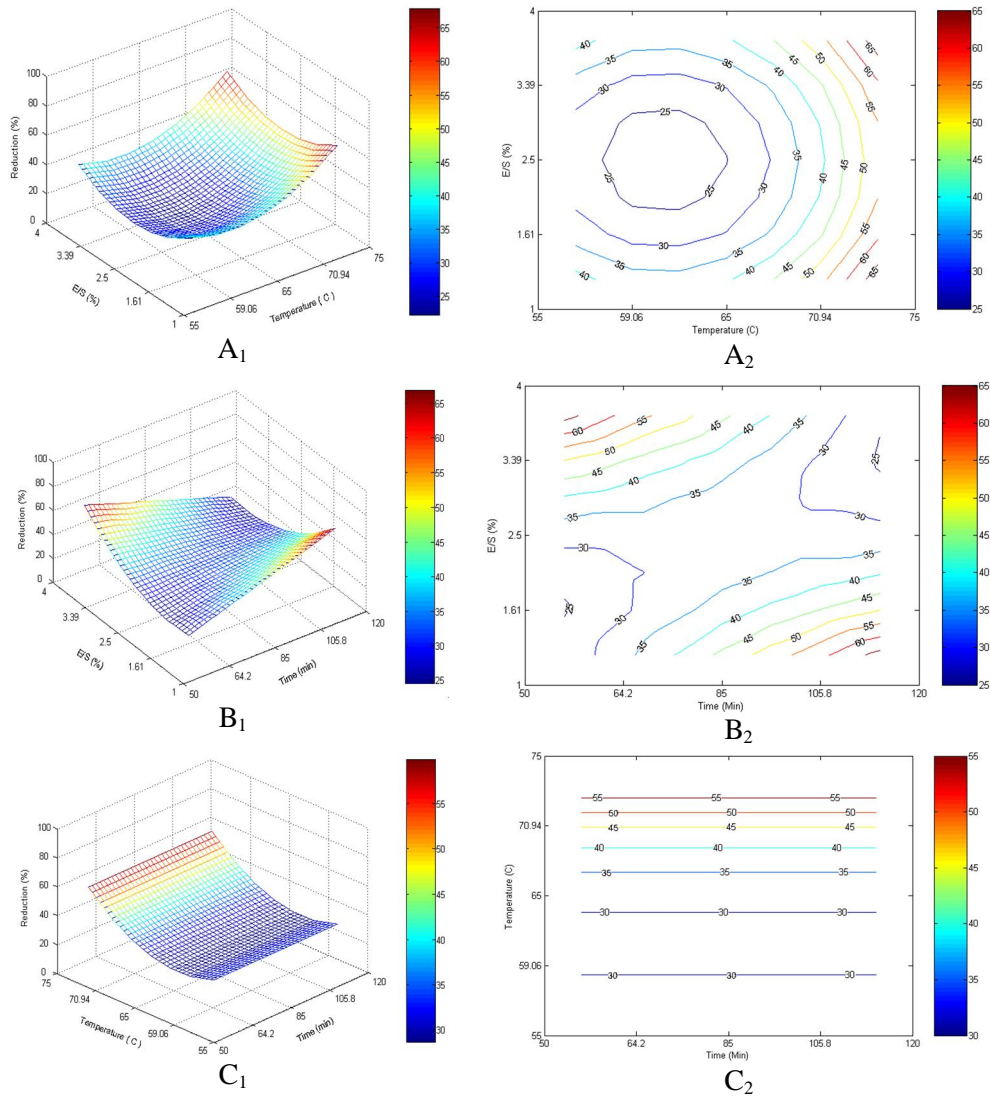
$A_2$



شکل ۲- سطح پاسخ سه بعدی (A<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (A<sub>2</sub>) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و دما، سطح پاسخ سه بعدی (B<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (B<sub>2</sub>) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و زمان، سطح پاسخ سه بعدی (C<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (C<sub>2</sub>) تأثیر همزمان دما و زمان بر دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم آلکالاز.

تأثیر شرایط مختلف تولید بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم آلکالاز: نمودارها در شکل ۳ (A<sub>1</sub> و A<sub>2</sub>) اثرات همزمان نسبت آنزیم به سوبسترا و دما را نشان می‌دهند، همان‌طور که از نمودار کانتور برمی‌آید با افزایش دما در مقادیر ثابت آنزیم قدرت احیای آهن برای پروتئین هیدرولیز شده تولیدی افزایش یافته است و مقدار آنزیم تأثیر زیادی نداشته است. نمودارهای شکل ۳ (B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub>) اثرات همزمان زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا نشان می‌دهد که با افزایش یک متغیر و کاهش دیگری و بالعکس قدرت احیای آهن افزایش می‌یابد. و افزایش همزمان مقدار آنزیم و زمان اثر منفی بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده دارد. همان‌طور که در نمودار کانتور کاملاً مشخص است با افزایش دما در مقدار کم و ثابت آنزیم و افزایش مقدار آنزیم در محدوده ثابت و کم دمایی قدرت احیای آهن فرآورده افزایش می‌یابد. همچنین نمودار سطح پاسخ و کانتور شکل ۳ (C<sub>1</sub> و C<sub>2</sub>) اثرات

همزمان نسبت دما و زمان واکنش، نشان می‌دهند که با افزایش دما، قدرت احیای آهن افزایش می‌یابد و زمان واکنش تأثیری بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز نداشته است.



شکل ۳- سطح پاسخ سه بعدی (A<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (A<sub>2</sub>) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و دما، سطح پاسخ سه بعدی (B<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (B<sub>2</sub>) تأثیر همزمان مقدار آنزیم و زمان و سطح پاسخ سه بعدی (C<sub>1</sub>) و کانتور دو بعدی (C<sub>2</sub>) تأثیر همزمان دما و زمان بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگوی ببری سبز با آنزیم آلکالاز.

## بهره‌برداری و پرورش آبزیان (۴)، شماره (۳) پاییز ۱۳۹۴

انتخاب تیمار بهینه: با توجه به نتایج کمی حاصل از آزمایش‌های خواص آنتی‌اکسیدانی جدول ۴، تیمار بهینه تولید شده با آنزیم آلکالاز انتخاب شد (جدول ۹).

جدول ۹- مقادیر عوامل متغیر در نقاط تیمار بهینه مربوط به آنزیم.

مشاهدات	آنزیم	نسبت آنزیم به سویسترا (درصد)	دما (سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	مقادیر پاسخ (درصد)
۱۱	آلکالاز	۲/۵	۷۵	۸۵	۷۷/۸

### بحث

آنچنان که در جدول ۲ ارائه شده محتوی پروتئینی بر اساس وزن خشک در تیمارهای تولید شده با آنزیم آلکالاز  $86/9 \pm 2/25$  درصد می‌باشد که نتایج پژوهش‌های سایر محققین نتایج حاصل از این پژوهش را تأیید می‌کنند. اویسی‌پور و همکاران (۲۰۰۹) بهینه‌سازی پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشا فیل ماهی (*Huso huso*) توسط آنزیم آلکالاز را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها گزارش نمودند که بیشترین میزان محتوی پروتئینی مربوط به فرآورده تولید شده با آنزیم آلکالاز  $66/43 \pm 3/62$  درصد بود. روتاناپورنوارای ساکول و همکاران (۲۰۰۵) مقدار پروتئین را در پروتئین هیدرولیز شده سه گونه میگو (*Pandalus eous*)، (*Metapenaeus endeavouri*) و (*Penaeus monodon*) به ترتیب  $89/79$  درصد،  $91/47$  درصد و  $91/00$  درصد گزارش کردند. چالامایه و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی روی پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی (*Cirrhinus mrigala*) میزان پروتئین  $85/0 \pm 2/32$  درصد را بیان نمودند. مقدار پروتئین در پژوهش رسلان و همکاران (۲۰۱۴) روی محصول جنبی ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*)  $62/71 \pm 0/29$  درصد بود.

در این پژوهش میزان چربی در ماده خام اولیه بر اساس وزن خشک  $9/8 \pm 0/6$  درصد بوده که بعد از انجام فرآیند هیدرولیز، میزان چربی به شدت کاهش پیدا نموده است، در تیمارهای تولیدی با آنزیم آلکالاز این میزان معادل  $1/3 \pm 0/4$  درصد بود. این کاهش می‌تواند به دلیل شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتریفیوژ نمونه‌ها باشد که باعث شده طی سانتریفیوژ با دور بالا، چربی به پروتئین نامحلول متصل شده و به همراه آن‌ها رسوب کند. همچنین بخش اعظمی از چربی به صورت یک لایه مجزا، بعد از سانتریفیوژ روی سوپرناتانت دیده می‌شود که به راحتی قابل برداشت است (کریستینسون و راسکو،

۲۰۰۰؛ چالامایه و همکاران، ۲۰۱۰). کاهش میزان لیپید پروتئین‌های هیدرولیز شده در اکسیداسیون لیپیدها نقش چشمگیری داشته و سبب پایداری محصول می‌گردد. روتوناپورنوارای ساکول و همکاران (۲۰۰۵) در تولید پروتئین هیدرولیز شده از سه گونه میگو، (*Pandalus eous*)، (*Metapenaeus endeavouri*) و (*Penaeus monodon*) محتوی چربی را به ترتیب ۰/۰۲ درصد، ۰/۰۱ درصد و ۰/۰۱ درصد ذکر کردند. با بررسی که روی پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی (*Cirrhinus mrigala*) توسط چالامایه و همکاران (۲۰۱۰) انجام گرفت، میزان چربی  $6/1 \pm 0/20$  درصد گزارش شد. اویسی‌پور و همکاران (۲۰۰۹) با به‌کار بردن آنزیم آلکالاز، میزان چربی پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشا فیل ماهی را  $1/34 \pm 0/23$  درصد گزارش نمودند. در پژوهش رسلان و همکاران (۲۰۱۴) روی محصول جنبی ماهی تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) مقدار چربی  $0/08 \pm 0/05$  درصد بود. نتایج بیانگر آن است که میزان چربی در پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۰/۵ درصد می‌باشد.

همچنین در این پژوهش محتوی خاکستر در پروتئین هیدرولیز شده تولید شده به شدت کاهش یافته و میانگین آن  $5/3 \pm 0/8$  درصد بوده است، که نتایج پژوهش روتاناپورنوارای ساکول و همکاران (۲۰۰۵) روی سه گونه میگو (*Pandalus eous*)، (*Metapenaeus endeavouri*) و (*Penaeus monodon*) به ترتیب  $4/72$  درصد،  $5/20$  درصد و  $5/09$  درصد نتایج این پژوهش را تأیید می‌کند. همچنین رسلان و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی محصول جنبی ماهی تیلایپا (*Oreochromis niloticus*) مقدار خاکستر را  $25/34 \pm 0/94$  درصد گزارش کردند. اما پژوهش اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) با نتایج این پژوهش مغایرت داشته به طوری که محتوی خاکستر در پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشای ماهی تن زردباله (*Thunnus albacores*)  $22/34 \pm 1/38$  درصد) نسبت به امعا و احشا  $4/46 \pm 1/21$  درصد) افزایش چشمگیری داشته است که این امر می‌تواند به دلیل استفاده از بافر فسفات در تهیه پروتئین هیدرولیز شده باشد که در این پژوهش به جای استفاده از بافر فسفات به تنهایی، از ترکیب آب مقطر و بافر فسفات استفاده شده است.

جرارد و همکاران (۲۰۰۷) بیان داشتند که در هنگام واکنش آنزیمی به دلیل استفاده از pH و دمای بالا و مناسب، طبق طرح مشخص شده آزمایشات، امکان رویداد واکنش هیدرولیز شیمیایی نیز وجود دارد، آنچنان که در دماهای بالا رنگ تیره‌تری در فرآورده ایجاد می‌گردد و در این خصوص می‌توان

اذعان داشت که این رنگ در اثر شکسته شدن پیوند رنگدانه آستاگزانتین<sup>۱</sup> و پروتئین که در پوسته میگو وجود دارد، ایجاد شده و سبب تولید مشتقات کاروتنوئیدی می‌شود. همچنین در پیوند کیتین- پروتئین موجود در پوسته میگو حدود ۹۰ درصد پروتئین با باندهای استال<sup>۲</sup> پیوند داشته که به راحتی قابل شکسته شدن می‌باشد. با توجه به نظر آن‌ها، هیدرولیز آنزیمی ضایعات میگو در شرایط پژوهش حاضر نیز می‌تواند مخلوطی از ترکیبات بازدارنده DPPH مانند مشتقات کاروتنوئیدی که از شکسته شدن پیوند پروتئین- آستاگزانتین در پوسته میگو به وجود می‌آیند، هیستیدین- دی‌پپتید (مانند انس‌ترین و کارنوزین) و دیگر پپتیدهای با وزن مولکولی کم مانند آمینواسیدهای آزاد (آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، آلانین، لوسین، لایزین و ترئونین) فراهم کرده باشد.

در این پژوهش فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH برای فرآورده‌های تولید شده با آنزیم آلکالاز در نقطه حداکثر زمان یعنی ۱۲۰ دقیقه، مقدار آنزیم ۲/۵ درصد و دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد (تیمار ۱۳) و معادل ۹۷/۹ درصد بوده و آنچنان‌که در جدول ۴ برای ضرایب معادله چند جمله‌ای برآزش شده برای پاسخ‌های مختلف دیده می‌شود، اثر زمان بر قدرت دفع رادیکال DPPH برای فرآورده‌های تولید شده با آلکالاز معنی‌دار نشده است ( $p > 0/05$ ) و اثر ساده دو متغیر دما و نسبت آنزیم به سویسترا و درجه دوم آن‌ها معنی‌دار شده است ( $p < 0/05$ ). همان‌طور که در نمودارهای سطح پاسخ و کانتور (شکل ۱) نمایان است افزایش مقدار آنزیم و دما تا محدوده نقاط مرکزی سبب افزایش قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز با آلکالاز شده است و افزایش دما با روند ملایمی سبب افزایش فعالیت آنتی‌رادیکالی گردیده است و در این مورد اثر مقدار آنزیم بر فعالیت آنتی‌رادیکالی پروتئین هیدرولیز شده میگو بیشتر از دما بوده است. در جدول ۶ مشاهده می‌گردد که اثر دو متغیر مقدار آنزیم و دما معنی‌دار شده است ( $p < 0/05$ ) و اثر متغیر زمان معنی‌دار نشده است ( $p > 0/05$ ). وو و همکاران (۲۰۰۳) با تحقیق روی ماهی ماکرل (*Scomber austriasicus*) و باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) با پژوهش روی ماهی (*Aphanopus carbo*) گزارش نمودند که قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده با افزایش مدت زمان واکنش افزایش می‌یابد که با این پژوهش مطابقت ندارد؛ این امر می‌تواند به دلیل تفاوت در ماده اولیه مورد استفاده یا شرایط مختلف به‌کار گرفته در فرآیند هیدرولیز مانند دما، مقدار آنزیم و نسبت آب به ماده خام ایجاد شده باشد.

1- Astaxanthine  
2- O-Glycosid bonds



در این پژوهش بالاترین درصد قدرت دفع رادیکال آزاد DPPH (۹۷/۹ درصد) شد. الاواراسان و همکاران (۲۰۱۲) قدرت دفع رادیکال را برای ماهی *Catla catla* (۶۴/۶۵±۱/۴۸ درصد) و بتی و همکاران (۲۰۱۴) با پژوهش روی ماهی (*Rastrineobola argentea*) این مقدار را ۹۰ درصد گزارش کردند. دلیل این عدم تطابق می‌تواند در ماهیت پروتئین ماده خام جستجو گردد.

معادله‌های جدول ۴ نشان می‌دهند که دو متغیر بررسی شده یعنی نسبت آنزیم به سوبسترا و دما بر فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد DPPH برای فرآورده تولید شده با آنزیم آلکالاز تأثیرگذار بوده‌اند. هیدرولیز شده‌ها فعالیت بیشتری برای دفع رادیکال DPPH در مقایسه با رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای آهن از خود نشان دادند. به‌طور کلی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده بستگی به پروتئاز به‌کار برده، ماده اولیه و شرایط به‌کار گرفته در آزمایش دارد، از این رو نتایج به‌دست آمده همیشه موافق یکدیگر نبوده و گاهی حتی در تضاد با یکدیگرند (جون و همکاران، ۲۰۰۴، باتیستا و همکاران، ۲۰۱۰؛ چالامایه و همکاران، ۲۰۱۲).

رادیکال هیدروکسیل یک اکسیدان اختصاصی برای لیپیدهاست و قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل توسط یک آنتی‌اکسیدان به‌طور مستقیم با پیشگیری از گسترش فرآیند اکسیداسیون لیپیدها مرتبط است (باتیستا و همکاران، ۲۰۱۰). در این پژوهش فرآورده تولید شده با آنزیم آلکالاز قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل (۹۶ درصد) از خود نشان داده است؛ دلیل این موضوع می‌تواند مربوط به فعالیت بیشتر آنزیم آلکالاز باشد. حداکثر قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل در نقاط مرکزی بوده است. در پژوهش حاضر آنچنان‌که در معادله‌های جدول ۵ ارائه گردیده است فعالیت دفع رادیکال هیدروکسیل هیدرولیز شده‌ها 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 (جدول ۶).

در پژوهش باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) پروتئین هیدرولیز شده تولیدی قدرت دفع رادیکال هیدروکسیل اندکی از خود نشان داد و این محققین گزارش نمودند که پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و درصد آنزیم بالاتر، به‌طور معنی‌داری توانایی دفع هیدروکسیل کمتری نسبت به تیمارهایی که درصد آنزیم کمتری داشتند، از خود نشان دادند. دانگ و همکاران (۲۰۰۸) در پژوهش خود بر روی بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم 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.

نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد که از میان تیمارهای تولید شده با آنزیم آلکالاز در نقطه حداکثر قدرت احیای آهن (تیمار ۱۱، ۵۸/۷ درصد)، درجه هیدرولیز معادل ۲۶/۴ درصد بوده است. باتیستا و همکاران (۲۰۱۰) با بررسی روی (*Aphanopus carbo*) و خانانفانت و بنجاکول (۲۰۰۸) در پژوهش خود روی (*Lutjanus vitta*) دریافتند که قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با افزایش درجه هیدرولیز آن به تدریج افزایش می‌یابد، که این موضوع نظریه ارتباط مستقیم بین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده و توانایی آن برای دادن الکترون به رادیکال‌های آزاد را ارائه می‌دهد. اما در پژوهش کلومپونگ و همکاران (۲۰۰۷) در مقابل افزایش درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز قدرت احیای آهن آن کاهش داشته است. در این پژوهش برای پروتئین هیدرولیز شده تولیدی با آنزیم آلکالاز اگرچه هر سه متغیر (مقدار آنزیم، دما و زمان) بر قدرت احیای آهن آن تأثیرگذار بوده‌اند اما اثر دو متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز معنی‌دار شده است ( $p < 0/05$ ) (جدول ۶).

جرارد و همکاران (۲۰۰۷) در تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو و بررسی سه متغیر نسبت آنزیم به سوبسترا، دما و pH بر خواص آنتی‌اکسیدانی آن، گزارش نمودند که هر چند هر سه فاکتور مورد آزمایش بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مؤثر بوده‌اند اما pH نقش مؤثرتری داشته است. رن و همکاران (۲۰۰۸) نیز در پژوهش خود درباره بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور علف‌خوار گزارش نمودند که نسبت آنزیم به سوبسترا و پس از آن مدت‌زمان واکنش عوامل مهم تأثیرگذار بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولیدی بوده‌اند و دما تأثیر کمتری داشته است مشابه آنچه که در مورد تیمارهای تولیدی با آنزیم آلکالاز در این پژوهش گزارش شد.

در این پژوهش در مورد تیمارهای تولید شده با آنزیم آلکالاز همان‌گونه که بیان شد (شکل ۳) افزایش دما سبب افزایش قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده میگوی ببری سبز شده است. رن و همکاران (۲۰۰۸) گزارش نمودند که 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 به‌کار برده در فرآیند و نوع پروتئاز مورد استفاده باشد.

**انتخاب تیمار بهینه:** زمانی که هدف از پروتئین هیدرولیز شده تولیدی، نقش تغذیه‌ای و دارویی آن باشد، خواص آنتی‌اکسیدانی بالا به تنهایی یک فاکتور مطلوب است ولی چنانچه هدف تولید تجاری پروتئین هیدرولیز شده باشد، باید اقتصادی بودن هر یک از فاکتورها برای انتخاب تیمار بهینه در نظر گرفته شود.

با توجه به این موضوع که به‌منظور تولید تجاری و قابلیت سوددهی اقتصادی، خواص آنتی‌اکسیدانی قابل قبولی از پروتئین هیدرولیز شده ضروری است، با وجود این که تیمار ۲ از پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی مطلوب‌تری نسبت به سایر تیمارها بود اما به دلیل این که مقدار آنزیم استفاده شده برای تولید آن، مقدار زیادی بوده است (جدول ۱)، همچنین در مورد تیمار ۱۳ اگرچه خواص آنتی‌اکسیدانی بالاست چون مدت زمان به‌کار رفته زیاد است، تیمار ۱۱ به‌عنوان تیمار بهینه برای پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز انتخاب شد (جدول ۹).

### نتیجه‌گیری کلی

در این پژوهش اثر آنزیم پروتئاز تجاری آلکالاز بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ضایعات سرسینه میگوی ببری سبز (*P. semisulcatus*) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان دادند که آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز، محتوای پروتئینی و خواص آنتی‌اکسیدانی بالاتری تولید کند. همان‌طور که مشخص شد تیمارهای تولید شده در خصوص خواص آنتی‌اکسیدانی، پاسخ بهتری به دفع رادیکال DPPH در مقایسه با دفع رادیکال هیدروکسیل و قدرت احیای آهن نشان دادند. همچنین این پژوهش نشان داد که کاربرد روش سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگوی ببری سبز روشی سودمند و دقیق می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ضایعات میگوی ببری سبز با استفاده از آنزیم آلکالاز دارای مقادیر بالای پروتئین بوده و خواص مناسب آنتی‌اکسیدانی دارد و می‌تواند در فرمولاسیون غذای آبزیان، دام و طیور به‌عنوان جایگزینی برای پودر ماهی پیشنهاد شود و

همچنین در صورت تخلیص این پروتئین، پپتیدهای تولید شده می‌توانند به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی برای جلوگیری از فساد لیپیدها مورد استفاده قرار گیرند.

#### منابع

1. AOAC. 2005. Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
2. Aspino, S.I., Horn, S.J., and Eijsink, V.G.H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua*) viscera. Journal of Process Biochemistry. 40: 1957–1966.
3. 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.
4. Benjakul, S., and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solidwastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 45: 3423–3230.
5. 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 Science. 2: 180-189.
6. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., and Lalitha, R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysates using a commercial protease. Journal of Bioresource Technology. 99: 335–343.
7. Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D.G., and Jyothirmayi, T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. Journal of Food Chemistry. 120: 652–657
8. Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Journal of Food Chemistry. 135: 3020–3038.
9. Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry. 61: 118–123.
10. 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*). Journal of Food Chemistry. 107: 1485–1493.
11. Elavarasan, K., Kumar, V., and Shamasundar, B.A. 2012. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla*

- catla) as influenced by the nature of enzyme. Journal of Food Processing and Preservation. 38: 1207-1214.
12. 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. 11: 1051–1059.
  13. 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. Journal of Process Biochemistry. 42: 1486–1491.
  14. Hoyle, N.T., and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science. 59: 76–79.
  15. Je, J.Y., Quian, Z.J., Byun, H.G., and Kim, S.K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Journal of Process Biochemistry. 42: 840-846.
  16. 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. Journal of European Food Research Technology. 219: 20-26.
  17. Ng, K.L., and MohdKhan, A. 2012. Enzymatic preparation of palm kernel expeller protein hydrolysate (PKEPH). Journal of International Food Research. 19: 721–725.
  18. Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., and Esmaeili Molla, A. 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. Journal of International Aquatic Research. 1: 31-38.
  19. Oyaizu, M. 1986. Studies on products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction. Japanese Journal of Nutrition. 44: 307–315.
  20. Khantaphant, S., and Benjakul, S. 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Journal of Comparative Biochemistry and Physiology. 151: 410–419.
  21. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Journal of Food Chemistry. 102: 1317–1327.
  22. Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 401: 43-81.
  23. Roslana, J., Yunosa, K.F., Abdullah, N., Mazlina S., and Kamala, Mustapa. 2014. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis*

- niloticus*) by-Product. Journal of Agriculture and Agricultural Science Procedia. 2: 312–319.
24. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., and Xue, S. J. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Journal of Food Chemistry. 108: 727–736.
25. Ruttanapornvareesakul, Y., Ikeda, M., Hara, K., Osako, K., Kongpun, O., and Nozaki, Y. 2005. Effect of shrimp head protein hydrolysates on the state of water and denaturation of fish myofibrils during dehydration. Journal of Fisheries Science. 71: 220–228.
26. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 40: 945-948.
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*). Journal of Food Research International. 36: 949–957.