نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی
جلد یازدهم، شماره اول، ۹۸
۱۱۷-۱۳۰
http://ejfpp.gau.ac.ir
DOI: 10.22069/EJFPP.2019.7330.1150

بهینه‌سازی عوامل مؤثردرفعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده آب پنیر به روش سطح پاسخ

شیما پیری قشلاقی[۱*]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، مهران اعلمی[۲]، محمد قربانی[۲]

[۱]دانش‌آموخته کارشناسی‌ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
[۲]دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۲/۲۱ ؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۲۶

چکیده

سابقه و هدف: به‌دلیل نگرانی‌هایی که در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی وجود دارد آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مورد توجه محققین می‌باشند. در سال‌های اخیر، توجه گسترده به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی منجر به تحقیقاتی در زمینه بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های منابع جانوری یا گیاهی شده است. پپتیدهای زیست فعال به‌عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و پس از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی از خود بروز می‌دهند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پپتیدهای زیست‌فعال به توانایی آن‌ها در مهار رادیکال‌های آزاد، عمل به‌عنوان شلاته کننده‌ی فلزات و جلوگیری از اکسیداسیون چربی نسبت داده شده‌اند.

مواد و روش‌ها: دراین پژوهش از روش آماری سطح پاسخ جهت بهینه‌سازی شرایط فرآیند هیدرولیز پروتئین آب پنیر با استفاده از آنزیم آلکالاز استفاده شد. فاکتورهای مورد بررسی در این تحقیق دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بودند که برای رسیدن به بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی این متغییرها درمحدوده‌ی دمای ۵۵-۴۳ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۷۳-۶۰ دقیقه و مقدار آنزیم ۹۰ -۴۰ (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) انتخاب شدند. آزمایشات بر اساس طرح مرکب مرکزی انجام شد.

یافته‌ها: شرایط بهینه برای رسیدن به بیشترین میزان ظرفیت مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید شامل دمای ۴۷/۲ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۰۴/۰۲ دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترای ۹۶/۸۵ (واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) به‌دست آمد. تحت این شرایط میزان مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید ۶۳/۴۴ ٪ حاصل شد. ضریب رگرسیون (R^2) حاصل برای مدل ارائه شده (از نوع درجه دوم) ۰/۹۸۹ بود. این مقادیر بیانگر قدرت تبیین مدل برای پیش بینی شرایط واکنش با متغییرهای مختلف می‌باشد.

نتیجه‌گیری: پیشرفت در تکنولوژی تولید پروتئین هیدرولیز شده امکان استفاده‌ی مناسب از منابع پروتئینی مختلف و غیر قابل دسترس را فراهم کرده است. بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند باعث صرفه جویی در زمان، هزینه و میزان آنزیم مورد استفاده گردد. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر می‌تواند قابلیت کاربرد در فرمولاسیون مواد غذایی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و نیز استفاده‌های دارویی داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: آب پنیر، روش سطح پاسخ، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز آنزیمی.

*نویسنده مسئول: shima_piri1366@yahoo.com

مقدمه

یکی از جدیدترین فن‌آوری‌ها برای تولید فراورده‌های با ارزش افزوده‌ی بالا هیدرولیز پروتئین می‌باشد، روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی جهت این منظور به‌کار گرفته می‌شوند. هیدرولیز آنزیمی بهتر از هیدرولیز اسیدی یا قلیایی است زیرا هیدرولیز آنزیمی خیلی ملایم‌تر و بدون نابودی اسیدهای آمینه آزاد اتفاق می‌افتد. آنزیم آلکالاز به‌دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر، بیشترین توجه را به خود اختصاص داده است (۱). پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی هستند با وزن مولکولی پایین که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می‌شوند. از مهم‌ترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی ، ضدمیکروبی، ضدسرطان و افزایش دهنده سیستم ایمنی بدن اشاره کرد (۲). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش حیاتی را در سیستم‌های غذایی و همچنین در بدن انسان جهت کاهش فرآیندهای اکسیداتیو ایفا می‌نمایند. در سیستم‌های غذایی آنتی‌اکسیدان‌ها در تعویق اکسیداسیون لیپید و عدم تشکیل محصولات ثانویه‌ی پراکسیداسیون لیپیدی مفید بوده و بنابراین به نگهداری طعم، بافت و در برخی از موارد رنگ فرآورده غذایی در طی فرآوری کمک می‌کنند (۳). آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند ولی در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آن‌ها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به‌منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه محققین می‌باشد (۴). در حال حاضر آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از قبیل ویتامین c، توکوفرول‌ها، عصاره‌های گیاهانی مانند رزماری و مریم‌گلی و همچنین عصاره‌های چای به‌عنوان جایگزین‌هایی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در سیستم‌های غذایی شناخته شده‌اند (۴ و ۵). پپتیدهای متعددی از مواد غذایی پروتئینی نیز 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 (۶). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی حاوی ۱۶-۵ اسیدآمینه هستند و حاوی ترکیبات سلامتی بخش و ایمنی‌بخش با وزن مولکولی پایین، هزینه تولید کم، فعالیت بالا و جذب آسان می‌باشند (۷). مطالعات گوناگونی در رابطه با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست‌فعال به‌دست آمده از منابع غذایی و گیاهی از قبیل دانه‌های بادام زمینی (۸)، سبوس برنج (۹)، پروتئین گل مغربی (۱۰)، گلوتن ذرت (۱۱)، سیب زمینی شیرین (۱۲)، پروتئین زرده تخم مرغ (۱۳)، شیر کفیر و کفیر به‌دست آمده از شیر سویا (۱۱)، قارچ‌های دارویی (۱۴)، ضایعات پروتئین جلبک (۱۵) و پروتئین گندم سیاه (۱۶) مورد بررسی قرار گرفته است. 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. ترکیب آمینواسیدی و توالی آن برروی فعالیت زیست فعالی این پپتیدها موثر است. براساس ساختار پپتیدی، ترکیب و توالی آمینواسیدها، این پپتیدها ممکن است وظایف گوناگونی از قبیل باند کردن موادمعدنی (۱۷)، اثرات ایمنی بخش (۱۸)، آنتی‌اکسیدانی (۱۹)، کاهش دهنده کلسترول خون (۲۰) و همچنین اثرات ضد فشارخون (۲۱) را ایفا نمایند. با این وجود، پپتیدهای متعددی با ویژگی‌های

عملکـردی چندگانـه یافـت شـده اسـت. قابلیـت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده بـه تـاثیرات چندگانـه‌ای نسـبت داده شـده اسـت. برخـی از ایـن ویژگی‌ها شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکـال‌هـای آزاد، عمل به‌عنوان شلاته کننده فلزات، خاموش کننده اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفـوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربـی بـه‌وسـیله تشـکیل لایـه‌ای در اطـراف قطـرات روغـن مـی‌باشـد (۲۲). پروتئین آب پنیر دارای غلظـت بـالایی از اسـیدهـای آمینه زنجیره‌ای منشعب لوسـین، ایزولوسـین و والـین است که فاکتورهای مهمـی در رشـد و تـرمیم بافـت می‌باشـند. فعالیـت آنتـی‌اکسـیدانی آن از اسـید آمینـه سیستئین که در سنتز گلوتاتیون شرکت می‌کنند ناشی می‌شود (۲۳). ترکیب α-لاکتوآلبومین از آب پنیر نیـز فلزات سنگین را شلاته می‌کند و استرس اکسیداتیو را کاهش می‌دهد زیرا خاصیت شلاته کنندگی یون آهـن را داراسـت (۲۷)، همچنـین بـه‌دلیـل میـزان بـالای اسیدهای آمینه ضروری یک منبع بسـیارمهم تغذیـه‌ای می‌باشند (۲۸).

روش سطح پاسخ، روشـی مفیـد اسـت کـه جهـت بهینه‌سازی فرایندهای غذایی به‌کار گرفته مـی‌شـود (۲۶). تجزیه و تحلیل سـطح پاسـخ، اثـرات مـابین متغیرهـای مستقل را به‌تنهـایی یـا در ترکیـب بـا یکـدیگر تعریـف می‌نماید. به‌علاوه این روش می‌تواند مـدلی ریاضـی کـه دقیقا کل فرایند را توصـیف کنـد را ایجـاد نمایـد (۲۷). هـدف از ایـن پـژوهش تعیـین میـزان خاصـیت آنتـی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر است.

مواد و روش‌ها

مواد: برای فرایند هیدرولیز آنزیمی از آنزیم آلکالاز با فعالیت مشخص ۲/۴ واحد آنسون[1] بر گرم و دانسـیته ۱/۱۸ گرم بر میلی‌لیتر که یـک انـدوپروتئیناز[2] گرفتـه شده از باکتری *باسـیلوس لیکنـی‌فـورمیس* مـی‌باشـد استفاده گردید. این آنزیم از شرکت سـیگما (اسـپانیا) تهیه شد. ایزولـه پـروتئین آب پنیـر از کارخانـه پگـاه مشهد تهیـه گردیـد. فـروزین[3]، فـری‌سـیانید پتاسـیم، تری‌کلرواستیک اسید، کلریدآهن دو و سه، پیروگالول، EDTA از شـرکت مـرک و تـریس[4]، اسـید هیـدرو کلریدریک، اسید آسکوربیک، مونو سدیم فسـفات و دی سدیم فسفات و اسید سولفوریک، اسید بوریک و سودپرک از شرکت‌های معتبر داخلی تهیـه گردیدنـد، تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از درجه آزمایشگاهی برخوردار بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده آب پنیـر: ابتـدا نمونـه ایزوله‌ی پروتئین آب پنیر بـه نسـبت ۱ بـه ۲۰ بـا آب مقطر رقیق شده و نمونه رقیق شـده بـا بـافر تـریس- اسـیدکلریدریک بـه نسـبت وزنـی- حجمـی ۱ بـه ۵ مخلوط گشته و به حالت سوسپانسـیون یکنواخـت و pH مناسـب جهـت فعالیـت آنـزیم آلکـالاز در آمـده (pH=۸) و سپس در دمـای آزمـایش آنـزیم براسـاس فعالیت تعریف شده به سوسپانسـیون اضـافه گردیـد. تمامی واکنش‌ها در فلاسک‌های ۱۰۰ میلـی‌لیتـری در انکوباتور شیکردار و با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای تعریف شده برای هر تیمار انجام شـدند. در نهایت هر تیمار به‌منظور حصول اطمینان از غیـرفعـال شدن آنزیم، واکنش آنزیمی با قرار دادن سوسپانسیون در حمام آب گـرم در دمـای ۸۵ درجـه سـانتی‌گـراد به‌مدت ۲۰ دقیقه به اتمام رسیده و ترکیـب هیـدرولیز شده در حمام یخ به‌سرعت سرد گردیـد، در انتهـا بـا استفاده از سانتریفیوژ یخچـال‌دار بـا دور ۶۷۰۰×g در هموگلـوبین در دقیقـه در دمـای ۲۵ درجـه‌ی سـانتی‌گـراد و pH=۷/۵ (۲۸).

۱. یک واحد آنسون عبارت است ازمیزان آنزیم مورد نیاز بـرای آزاد شدن یک میلی‌اکی‌والان اسـیدآمینه تیـروزین از سوبسـترای

2. Endoproteinase
3. Ferrozine
4. Tris

دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۲۰ دقیقه جمع‌آوری سوپرناتانت صورت گرفت (۲۹). هیدرولیز آنزیمی برای هر تیمار در دو تکرار صورت پذیرفت.

اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی: به‌منظور تعیین رطوبت، ۵ گرم از نمونه روی ظرف آلومینیومی از قبل وزن شده قرار داده شد. سپس نمونه‌ها در آون در دمای ۱۰۳ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۲۴ ساعت قرار داده شدند تا این‌که وزن ظرف ثابت گردید (۳۰). برای تعیین میزان پروتئین کل در مواد خام اولیه، از روش کلدال ضریب نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد (ساخت آلمان، شرکت بهر، مدل S3) و میزان خاکستر نیز با قرار دادن نمونه خام در کوره الکتریکی (ساخت آلمان، شرکت نابرترم[1]، مدل FX118-30) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید (۳۱).

تعیین فعالیت زدودن رادیکال‌های آزاد سوپراکسید: ابتدا محلول پروتئینی با غلظت‌های مختلف تهیه شده، 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 درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۰ دقیقه حرارت داده شد. پس از ۱۰ دقیقه حرارت دهی، واکنش با افزودن ۰/۱ میلی‌لیتر محلول پیروگالول (۳ میلی‌مولار) آغاز گردید سپس دانسیته نوری در طول موج ۳۲۵ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر مورد اندازه‌گیری قرار گرفت (32). فعالیت مهار رادیکال آزاد از طریق فرمول زیر محاسبه گردید:

معادله (۳-۶): درصد مهار رادیکال آزاد سوپراکسید = (جذب نمونه-جذب کنترل/ جذب کنترل) ×۱۰۰

آزمایشات بهینه‌سازی: به‌منظور بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده‌ی آب پنیر از روش سطح پاسخ استفاده گردید. به این منظور طرح مرکب مرکزی با ۵ سطح ($+\alpha$، ۱+، ۰، ۱- و $-\alpha$) و ۶ تکرار در نقطه مرکزی مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱). محدوده‌ی متغیرهای مستقل زمان (X_1)، دما (X_2) و فعالیت آنزیم (X_3) از آزمون‌های اولیه استنتاج گردید (داده‌ها ذکر نشده‌اند). تیمارهای آزمایشی به‌منظور به‌حداقل رساندن اثرات تغییرات پیش‌بینی نشده در پاسخ‌های مشاهده شده به صورت تصادفی درآمدند. مدل رگرسیونی چندجمله‌ای درجه دوم به‌منظور پیش‌بینی پاسخ درنظر گرفته شد. مدل پیشنهادی برای پاسخ به‌صورت معادله زیر است.

معادله (۳-۸)

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

در این معادله Y متغیر وابسته (فعالیت آنتی‌اکسیدانی) می‌باشد، β_0 ثابت بوده و β_i، β_{ii}، β_{ij} ثابت‌های برآورد شده توسط مدل هستند. x_i و x_j سطح متغیرهای مستقل هستند و آن‌ها به‌ترتیب نمایانگر اثرات خطی، درجه‌ی دوم و متقاطع[2] متغیرهای X_1، X_2 و X_3 روی پاسخ می‌باشند. مدل، اثر هر متغیر را روی پاسخ ارزیابی می‌نماید (۳۳).

ترکیبات شیمیایی مواد خام اولیه: در ابتدای آزمایش درصد رطوبت، خاکستر و پروتئین اندازه‌گیری شد.

آنالیز سطح پاسخ: طرح آزمایشی با سطوح کدبندی شده‌ی متغیرهای مستقل و نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به هر تیمار در جدول ۳ آورده شده است.

1. Nabertherm

2. Cross

جدول ۱: متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر

Table 1. Independent variables and levels used to optimize the antioxidant activity of whey protein hydrolysates

متغیرهای مستقل independent variables	سطوح Levels				
	−1.68	-1	۰	+1	+1.68
زمان (دقیقه) time (min)	21/48	60	116/5	173	211/52
دما (°C) Temperature (°C)	38/91	43	49	55	59/09
فعالیت آنزیمی (واحد آنسون/ کیلوگرم پروتئین) Enzyme activity (Anson unit/kg protein)	22/96	40	65	90	107/04

جدول ۲: ترکیبات شیمیایی ایزوله پروتئین آب پنیر

Table 2. Chemical composition of whey protein isolate (wet weight basis)

پروتئین (٪) Protein (%)	رطوبت (٪) Moisture (%)	خاکستر (٪) Ash (%)	
82 ± 39.0	13± 0.33	2.6 ± 0.18	ایزوله پروتئین آب پنیر whey protein isolate

* پروتئین، رطوبت و خاکستر، براساس وزن مرطوب[1] گزارش گردیده‌اند.

** تمامی آزمایشات در ۳ تکرار صورت پذیرفته‌اند.

جدول ۳: سطوح کد بندی و واقعی متغییرهای مستقل طرح مرکب مرکزی و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Table 3. Coded and real levels of independent variables for central composite design and antioxidant activity

شماره تیمار Run	فعالیت آنزیم Enzyme activity	دما Temperature (°C)	زمان min) etim)	فعالیت آنتی‌اکسیدانی (٪) antioxidant activity(%)
1	0	0	0	59.07
2	0	0	0	56.87
3	0	-1/6818	0	53.45
4	-1	-1	-1	22.02
5	0	0	0	55.39
6	-1	+1	+1	42.61
7	+1/6818	0	0	60. 15
8	+1	-1	+1	56.27
9	0	0	0	58.47
10	-1/6818	0	0	25.22
11	-1	+1	-1	22.13
12	0	0	+1/6818	43.28
13	0	0	-1/6818	26.23
14	-1	-1	+1	52.21
15	+1	+1	+1	49
16	0	0	0	58.47
17	+1	-1	-1	56.79
18	0	+1/6818	0	49.5
19	+1	+1	-1	56.55
20	0	0	0	57.33

1. Wet basis

جدول ٤: تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Table 4. Analysis of variance (ANOVA) of response surface quadratic model for antioxidant activity

منبع Source	درجه آزادی df	مجموع مربعات Sums of squares	میانگین مربعات Mean square	مقدار F	P
مدل Model	9	33385.85	370.21	103.71	<0.0001**
زمان Time	1	371.98	371.98	104.21	<0.0001**
دما Temperature	1	40.93	40.93	11.47	0.0069**
فعالیت آنزیم Enzyme	1	1402.26	1402.26	39.84	<0.0001**
زمان × زمان Time* Time	1	816.15	816.15	228.64	<0.0001**
دما × دما Temperature*Temperature	1	37.54	37.54	10.52	0. 0088**
فعالیت آنزیم × فعالیت آنزیم Enzyme*enzyme	1	321.31	321.31	90.01	<0.0001**
دما × زمان Time *Temperature	1	35.03	35.03	9.81	0.0106**
فعالیت آنزیم × دما Temperature*Enzyme	1	0.49	0.49	0.49	71.78ns
زمان × فعالیت آنزیم Enzyme* Time	1	431.3	431.3	120.83	<0.0001**
باقیمانده Residual	10	35.7	3.57		
فقدان برازش[1] Lack of fit	5	26.53	5.31	2.89	13.41ns
خطای خالص Pure error	5	9.16	1.83		
کل Total	19	3367.54			

* و ** به‌ترتیب: معناداری در سطح ۵ و ۱ درصد- ns: غیرمعناداری

* and ** show significant probability level of 5% and 1% - ns: not significant

ضرایب رگرسیون چندگانه از طریق روش حداقل مربعات به‌منظورپیش‌بینی مدل چندجمله‌ای درجه دوم برای متغیر پاسخ ایجاد شد و با توجه به معنی‌داری ضرایب (جدول ۵)، مدل پیشنهادی زیر ارائه گردید:

$$Y=-۲۰۶/۳۶۱۸۳ + ۱/۲۸۱۹۹\ x_1 + ۴/۷۱۷۱۷\ x_2 +۱/۹۱۲۲\ x_3 -۰/۰۰۲۳۵۷۴\ x_1^2 -۰/۰۴۴۸۳۵x_2^2 -۰/۰۰۶۱۷۲\ x_1x_2 -۰/۰۰۵۱۹۸\ x_1x_3+ ۰/۰۰۱۶۵x_2x_3 - ۰/۰۰۷۵۵۴۸x_3^2$$

R^2= ۰/۹۸۹۴ موید این است که مدل رگرسیون، واکنش را به خوبی توضیح داده و مدل برازش شده توانسته ۹۸/۹۴ درصد از کل تغییرات در دامنه مقادیر مورد مطالعه را توضیح دهد. R^2 واقعی و R^2 تعدیل شده[1] که به ترتیب ۰/۹۸۹۴ و ۰/۹۷۹۹ به‌دست آمدند، بیانگر توصیف مناسبی از پراکندگی داده‌ها بوده‌اند. از آن‌جا که فرض آزمون عدم برازش در معادله‌ی مدل

1. Adjusted R-Squared

معنـی‌دار نبـود (P> ۰/۰۵) مـدل بـر اسـاس مهـار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید برازش گردید.

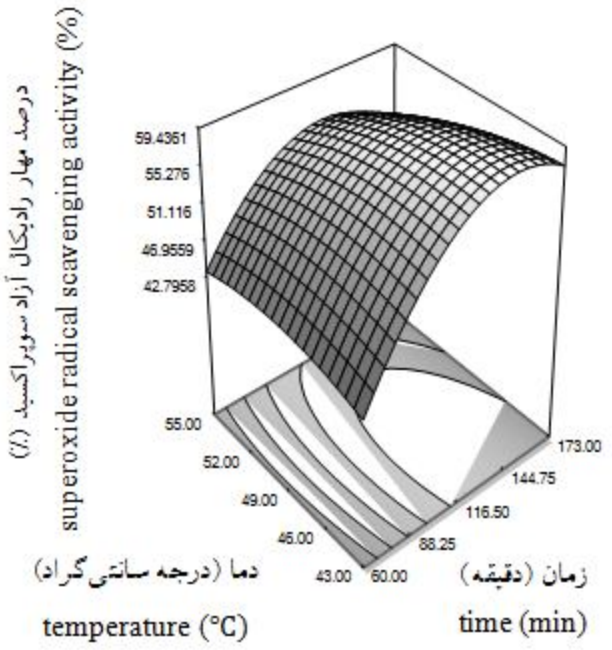
جدول ۵: برآورد ضرایب معادله رگرسیونی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Table 5. Estimation of regression equation coefficients of antioxidant activity

متغیر مدل Model variable	ضریب Coefficient
ثابت Constant	-206.36183
(زمان)x_1 (time) x_1	+1.28199
(دما) x_2 (Temperature) x_2	+4.71717
(فعالیت آنزیم) x_3 (Enzyme) x_3	+1.9122
x_1^2	-0.0023574
x_2^2	0.044835
x_3^2	-0.0075548
x_1x_2	-0.0061725
x_1x_3	0.005198
x_2x_3	0.00165

بـه‌منظـور تعیـین شـرایط بهینـه‌ی هـر متغیـر در هیـدرولیز آنزیمـی جهـت حصـول بـالاترین قـدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد سوپراکسید، نمودارهای سه بعدی سطحی برای متغیرها در شکل‌هـای ۱ تـا ۳ ترسیم شده است.

شکل ۱ نشان می‌دهـد کـه زمـان هیـدرولیز تـأثیر زیادی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد با توجـه بـه ایـن نمودارها در زمان‌های حدود ۹۸ تا ۱۹۶ دقیقه بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مشـاهده گردیـد و زمـان بهینـه ۱۰۴/۰۲ دقیقه می‌باشد، این نتایج کاملا مشـابه نتـایج طاهری و همکاران (۲۰۱۱آ) اسـت. شـرایط بهینـه در تحقیق آن‌ها دمای ۵۴/۳۷ درجـه سـانتی‌گـراد، زمـان ۱۰۷/۲۱ دقیقه و نسبت آنـزیم بـه سوبسـترای ۶۹/۴۹ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین محاسبه گردیـد کـه پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصـل تحـت ایـن شـرایط ظرفیت ۴۹/۷۴ درصدی در مهار رادیکـال‌هـای آزاد DPPHاز خـود نشـان مـی‌داد. تغییـرات فعالیـت آنتی‌اکسیدانی بـا گذشـت زمـان در اثـر تغییـر طـول زنجیـره‌هـای پپتیـدی حاصـل یـا افـزایش هیـدرولیز می‌باشد (۳۴). بسیاری از محققین گزارش نموده‌اند که پپتیدهای با وزن مولکولی پایین فعالیت آنتی‌اکسـیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهنـد (35). در ایـن تحقیـق بیشترین میزان فعالیت آنتـی‌اکسـیدانی ۶۳/۴۴ درصـد به‌دست آمد که با پژوهش چابئود و همکاران (۲۰۰۹) شـباهت داشـت. آن‌هـا نیـز در تحقیقـی کـه بـرای بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسـیدانی پـروتئین هیـدرولیز شـده‌ی مـاهی *Saithe* داشـتند گـزارش کردنـد کـه بیشترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۶۶/۴٪ می باشـد که در دمـای ۶۰ درجـه سـانتی‌گـراد، pH ۸، نسـبت آنزیم به سوبسـترای ۵۳/۸٪ (واحـد آنسـون/کیلوگرم پروتئین) به دست می‌آید (۳۶).



شکل ۱: اثر دما و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد سوپراکسید در نمودار سه بعدی سطح پاسخ

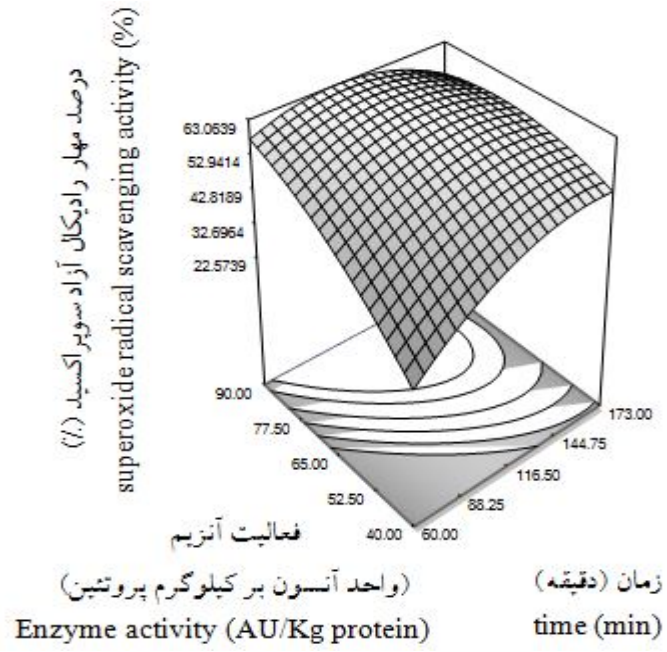
Figure 1. Effects of temperature and hydrolysis time on superoxide radical scavenging activity in three dimensional response surface plot

در شکل ۲ با افزایش زمان هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی در یک دمای ثابت افزایش یافته و در زمان‌های نهایی هیدرولیز کاهش یافته است. این نتایج مشابه نتایج مهرگان (۱۳۹۱) در بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی کاراس می‌باشد (37). طاهری و همکاران (۲۰۱۱) نیز با بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماهی ساردین رنگین کمان نشان دادند 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 (34). در این پژوهش میزان بهینه فعالیت بازدارندگی رادیکال سوپراکسید ٪۶۳/۴۴ به‌دست آمد که این نتیجه مشابه پژوهش زی و همکاران (۲۰۰۸) بود، آن‌ها فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای برگ آلفا آلفت (ALPS)[1] را مورد ارزیابی قرار دادند. ALPS در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و ۰/۹ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، به‌ترتیب فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH و سوپراکسید ۷۱/۷۹ درصد و ۶۷ درصد را نشان داد. با استفاده از نتایجی که از پروفایل آمینواسیدها به‌دست آمد گزارش شد که ALPS علاوه بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی نیز می‌باشد (۳۸).

با توجه به نمودارهای آنزیم- دما (شکل ۳) می‌توان دریافت که اثر نسبت آنزیم به سوبسترا بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با دما بیشتر بوده و این فاکتور تأثیر مهمی بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد. این نمودارها نشان می‌دهد که بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در دمای ۴۰ تا ۵۴ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی حدود ۷۵ تا ۱۰۲ واحد آنسون/کیلوگرم پروتئین به‌دست آمد. گرارد و همکاران (۲۰۰۷) نیز از روش سطح پاسخ به‌منظور بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز (شامل دما، pH و غلظت آنزیم آلکالاز) جهت دستیابی به بالاترین فعالیت

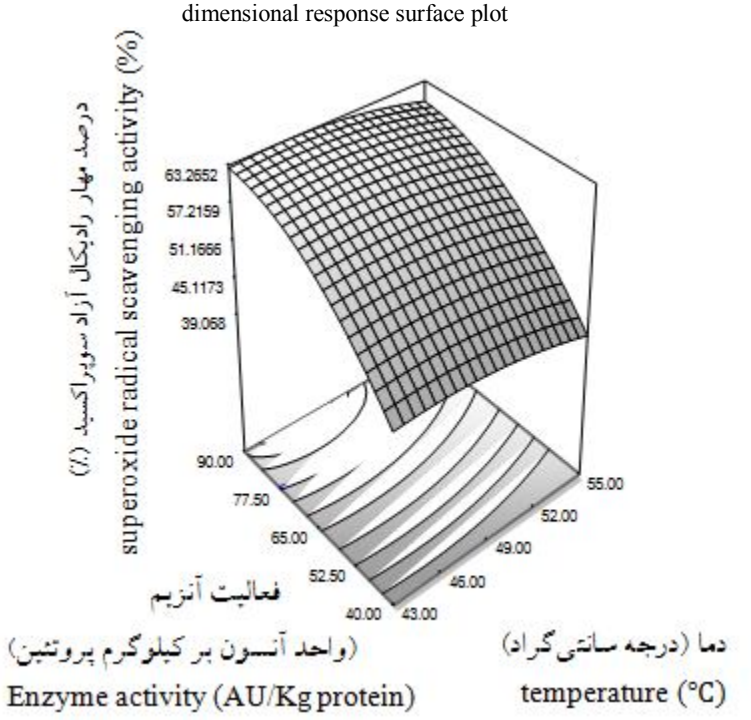
1. alfalfa leaf peptides

آنتی‌اکسیدانی در مهار رادیکال‌های آزاد DPPH استفاده نمودند. شرایط بهینه جهت این منظور برای دما، pH و غلظت آنزیم به‌ترتیب ۶۶/۲ درجه سانتی‌گراد، ۹/۷ و ۶۸/۱ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین به‌دست آمد (۳۹).



شکل ۲: اثر فعالیت آنزیم و زمان هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد سوپراکسید در نمودار سه بعدی سطح پاسخ

Figure2. Effects of Enzyme activity and hydrolysis time on superoxide radical scavenging activity in three dimensional response surface plot



شکل ۳: اثر فعالیت آنزیم و دمای هیدرولیز بر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد سوپراکسید در نمودار سه بعدی سطح پاسخ

Figure 3. Effects of Enzyme activity and temperature on superoxide radical scavenging activity in 3-D response surface plot

بهینه سازی فعالیت آنتی اکسیدانی و اعتبارسنجی مدل: شرایط بهینه توسط نرم‌افزار Design Expert به‌دست آمد. شرایط هیدرولیز برای پروتئین هیدرولیز شده آب پنیر با فعالیت بهینه‌ی مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید مطابق با شرایط زمان ۱۰۴/۰۲ دقیقه، دمای ۴۷/۲ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۹۶/۸۵ واحد آنسون بر کیلوگرم به‌دست آمد که منطبق با ۶۳/۴۴ درصد قدرت مهار رادیکال‌های آزاد سوپراکسید بود. به‌منظور تایید شرایط پیشنهاد شده توسط معادله ریاضی، آزمایش‌های اضافی در شرایط پیش‌بینی شده توسط مدل اجرا گردید (در سه تکرار) که قدرت مهار رادیکال آزاد سوپراکسید در این شرایط ۶۱/۷۹ درصد بود. مقادیر آزمایشی تقریباً مطابق با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل بود که مؤید شرایط بهینه‌ی پیش‌بینی شده جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده با خواص آنتی‌اکسیدانی از ایزوله پروتئین آب پنیر می‌باشد.

نتیجه‌گیری کلی

امروزه با توجه به خاصیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در جلوگیری از عمل پاتوژن‌ها و رادیکال‌های آزاد، کاربرد آن‌ها در پزشکی و صنایع غذایی بیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است و منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، آب پنیر، پروتئین ماهی و... شده است. هدف از این پژوهش تبدیل پروتئین آب پنیر به ترکیبی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی و دارای خواص مفید و سلامتی‌بخش و نیز یافتن مقادیر بهینه‌ی شرایط اثرگذار در هیدرولیز آنزیمی شامل دما، زمان هیدرولیز و فعالیت آنزیمی آنزیم آلکالاز بود. به‌منظور بهینه‌سازی پارامترها از روش سطح پاسخ در قالب طرح مرکب مرکزی (CCD) و از نرم‌افزار Design Expert استفاده گردید.

منابع

1. Ovissipour, M.R. AbedianKenari, 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: 696-705.
2. Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M.M., and Millgn, F. 2001. Obtencion aplicaciones de hidrolizados proteicos. Grasas y Aceites. 52: 132-136.
3. 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.
4. Pena-Ramos, E.A., and Xiong, Y.L. 2007. Antioxidant activity of soy protein hydrolyzates in a liposomial system. Food Science. 67:2952–2956.
5. Sakanaka, S., and Tachibana, Y. 2006.Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry. 95:243-249.
6. Marcuse, R. 1960. Antioxidative effect of amino-acids. Nature. 186:886–887.
7. Hattori, M., Yamaji-Tsukamoto, K.A., Kumagai, H., Feng, Y., and Takahashi, K. 1998. Antioxidative activity of soluble elastin peptides. Agricultural and Food Chemistry. 46:2167–2170.
8. Hwang, J.Y., Shyu, Y.S., Wang, Y.T., and Hsu, C.K. 2010. Antioxidative properties of protein hydrolysate from defatted peanut kernels treated with esperase. Food Science and Technology. 43:285–290.
9. Revilla, E., Maria, C.S., Miramontes, E., Bautista, J., Garcia-Martinez, A., and

Cremades, O. 2009. Nutraceutical composition, antioxidant activity and hypocholesterolemic effect of a water-soluble enzymatic extract from rice bran. Food Research International. 42:387–393.

10. Megias, C., Pedroche, J., Yust, M.M., Giron-Calle, J., Alaiz, M., and Millan, F. 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. Food Science and Technology. 41: 1973–1977.
11. Liu, J.R., Chen, M.J., and Lin, C.W. 2005. Antimutagenic and antioxidant properties of milk kefir and soy milk-kefir. Agricultural and Food Chemistry. 53:2467–2474.
12. Nagai, T., Suzuki, N., Tanoue, Y., Kai, N., and Nagashima, T. 2007. Antioxidant and antihypertensive activities of autolysate and enzymatic hydrolysates from yam (Dioscorea opposit aThunb.) ichyoimo tubers. Food and Agriculture Environment. 5: 64–68.
13. Sakanaka, S., and Tachibana, Y. 2006. Active oxygen scavenging activity of egg-yolk protein hydrolysates and their effects on lipid oxidation in beef and tuna homogenates. Food Chemistry. 95: 243-249.
14. Wachtel-Galor, S., Szeto, Y.T., Tomlinson, B., and Benzie, I.F. 2004. Ganoderma lucidum (‘Lingzhi’); acute and short-term biomarker response to supplementation. International Food Science and Nutrition. 55:75–83.
15. Sheih, I.C, Wu, T.K., and Fang, T.J. 2009. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. Bioresource Technology. 100:34193425.
16. Tang, C.H., Peng, J., Zhen, D.W., and Chen, Z. 2009. Physicochemical and antioxidant properties of buckwheat (Fagopyrum esculentum Moench) protein hydrolysates. Food Chemistry. 115:672–678.
17. Cross, K.J., Huq, N.L., Palamara, J.E., Perich, J.W., and Reynolds, E.C. 2005. Physicochemical characterization of casein phosphopeptide amorphous calcium phosphate nano complexes. The Journal of Biological Chemistry. 280:15362–15369.
18. Gauthier, S.F., Pouliot, Y., and Saint-Sauveur, D. 2006. Immunomodulatory peptides obtained by the enzymatic hydrolysis of whey proteins. International Dairy. 16: 11.1315–1323.
19. Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim, S.K. 2005. Antioxidant properties of a radicals scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. Agricultural and Food Chemistry. 53:581–587.
20. Zhong, F., Liu, J., Ma, J., and Shoemaker, C.F. 2007. Preparation of hypocholesterol peptides from soy protein and their hypocholesterolemic effect in mice. Food Research International. 40:661677.
21. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H., and Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International.42:1266–1272.
22. Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., and Yasuhara, T.2003.Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 51:3668–3674.
23. Walzem, R.L., DiUard, C.J., and German, J.B. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be over lookins. Jouranlof Crif Rev Food SeiNwir. 42:353-375.
24. Ha, E., and Zeniel, M.B. 2003. Functional properties of whey, whey components, and essential amino acids: mechanisms underlying health benefits for active people. The Journal of Nutritional Biochemistry.14:251-258.
25. Giménez, B., Aleman, A., Montero, P., and Gomez-Guillén, M.C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin

of sole and squid. Food Chemistry. 114:976-983.

26. 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.
27. Diniz, F., M., and Martin, A.M. 1996. Use of response surface methodology to describe the combined effect of pH, temperature and E/S ratio on the hydrolysis of dog fish (*Squalusacanthias*) muscle. Food Science and Technology. 31:419-426.
28. Aspmo, S.I., Horn, S.J., and Eijsink, V.G.H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (Gadusmorhua L.) viscera. Process Biochemistry. 40:1957–1966.
29. Taheri, A., AbedianKenari, A., Motamedzadegan, A., and Habibi-Rezaei, M. 2011b. Poultry By-Products and Enzymatic Hydrolysis: Optimization by Response Surface Methodology Using Alcalase® 2.4L. International Journal of Food Engineering. 7:1556-3758. (In Persian)
30. AOAC. Official methods of analysis (18th ed.). 2005. Association of Official Analytical Chemists.Washington, DC.
31. AOAC. Official methods of analysis (18^{th}ed.). 2000. Association of Official Analytical Chemists .Washington, DC.
32. 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.47:469-474.
33. Bezerra, M.A., Santelli, R.E., Oliveira, E.P., Villar, L.S., and Escaleira, L.A. 2008. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. Talanta 76:965977.
34. Taheri, A. 2011a. 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. 39-43.
35. 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. Nutritional Biochemistry. 16:562-569.
36. Chabeaud, A., Dutournie, P., Guerard, F., Vandanjon, L., and Bourseau, P. 2009. Application of Response Surface Methodology to Optimise the Antioxidant Activity of a Saithe (*Pollachiusvirens*) Hydrolysate. Marine Biotechnology. 11:445–455.
37. MehreganNikoo, A.R. SadeghiMahoonak, A.R. Ghorbani, M. Taheri, A. and Alami, M. 2012. Optimization of different factors affecting antioxidant activity of crucian carp (*Carassiuscarassius*) protein hydrolysate by response surface methodology. Electronic journal of food processing and preservation 5:1.95-110 (In Persian).
38. Xie, Z., Huang, J., Xu, X., and Jin, Z. 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alf alfa leaf protein hydrolysate. Food Chemistry. 111:366–370.
39. Guerard, F., Guimas, L., and Binet, A. 2002.Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Molecular Catalysis B: Enzymatic, 20:489–498.

EJFPP, Vol. 11 (1): 117-130
http://ejfpp.gau.ac.ir

Optimization of different factors affecting antioxidant activity of whey protein hydrolysate by response surface methodology

S. Piri Gheshlaghi[1*], A. Sadeghi Mahoonak[2], M. Alami[2], M. Ghorbani[2]
[1]M.Sc. graduate, 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

Received: 2015/03/12; Accepted: 2018/03/17

Abstract

Background and objectives: Due to safety concerns and health aspects over the use of synthetic antioxidants, the natural antioxidant compounds are considered by researchers. In the recent years a great deal of attention for application of natural antioxidants, has led to studies in investigation of antioxidative or bioactive potential of hydrolysates peptides from plant or animal sources. Bioactive peptides are considered specific protein fragments that are inactive within the sequence of the parent protein, after they are released by enzymatic hydrolysis, they may exert various physiological functions such as antioxidative activity. Antioxidant activity of bioactive peptides can be attributed to their radical scavenging, metal ion chelation and inhibition of lipid peroxidation properties of peptides.

Materials and methods: In the present study, response surface methodology was used to optimize hydrolysis conditions for preparing protein hydrolysate from the whey protein, using Alcalase. The investigated factors were temperature (43-55°C), time (60-173 min) and enzyme/substrate ratio (40-90 AU/Kg protein) to achieve maximum antioxidant activity. Experiments were designed according to the central composite design.

Results: The optimal conditions to achieve the highest superoxide free radical scavenging capacity were as: temperature (47/2 °C), time (104/02 min) and enzyme/ substrate ratio (96/85 AU/Kg protein).Under these conditions superoxide free radical scavenging capacity was 63/44 %. Regression coefficient for the model (Quadratic type) was 0.989, indicating the high accuracy of the model to predict the reaction conditions considering different variables.

Conclusion: Advances in the technology of preparing protein hydrolysate has provided the opportunity of use of unavailable protein sources. The optimization of antioxidant activity of protein hydrolysate, can save time, cost and amount of enzyme needed for hydrolysis. The Results indicated that whey protein hydrolysate has the potential to be applied as a natural antioxidant in food and pharmaceutical ingredients in the future.

***Keywords*:** Whey Protein, Response Surface Methodology (RSM), Antioxidant activity, enzymatic hydrolysis

[*]Corresponding author; shima_piri1366@yahoo.com