دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده صنایع غذایی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی علوم و صنایع غذایی

بهینه‌سازی عوامل مؤثر در هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ

پژوهش و نگارش:

علیرضا مهرگان نیکو

اساتید راهنما:

دکتر علیرضا صادقی ماهونک

دکتر محمد قربانی

۱۳۹۱

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

دانشکده صنایع غذایی

پایان‌نامه جهت دریافت درجه‌ی کارشناسی ارشد در رشته‌ی علوم و صنایع غذایی

بهینه‌سازی عوامل مؤثر در هیدرولیز و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ

پژوهش و نگارش:

علیرضا مهرگان نیکو

اساتید راهنما:

دکتر علیرضا صادقی ماهونک

دکتر محمد قربانی

اساتید مشاور:

دکتر علی طاهری

دکتر مهران اعلمی

تابستان ۱۳۹۱

تعهدنامه پژوهشی

نظر به این‌که چاپ و انتشار پایان‌نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و هم‌چنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش‌آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱. قبل از چاپ پایان‌نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع و کسب اجازه نمایند.
۲. در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد، ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
۳. انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **علیرضا مهرگان نیکو** دانشجوی رشته **علوم و صنایع غذایی** مقطع کارشناسی ارشد، تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

نه که هرچه در جهانست

نه که عشق جان آن است

جز عشق هرچه بینی

همه جاودان نماند

مولانا

تقدیم به پدر و مادر عزیزم

پس از سپاس و ثنای پروردگار متعال، سپاس ویژه خود را تقدیم می نمایم به پدر و مادر عزیزم که همواره چراغ وجودشان روشنگر راهم بوده است.

نهایت سپاس خود را تقدیم می دارم به جناب آقایان دکتر صادقی و دکتر قربانی اساتید راهنمای گرانقدرم که در تمام مراحل انجام این پایان نامه همواره به بنده اعتماد نموده و به بهترین شکل و با صبر و دقت بسیار مرا از راهنمایی های ارزشمند خود بهره مند ساختند.

از جناب آقایان دکتر اعلمی و دکتر طاهری اساتید مشاور عزیزم که در تمام مراحل انجام این پایان نامه مرا راهنمایی و ارشاد نمودند صمیمانه کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از جناب آقایان دکتر میرزایی و دکتر جعفری که با کمال لطف، زحمت باز خوانی و داوری این پایان نامه را بر عهده گرفتند، بی نهایت سپاسگزارم. بدون تردید محبت ها، حمایت ها و تشویق های این دو بزرگوار در طول این مدت کمتر از تیم راهنمایی بنده نبوده است.

از نماینده محترم تحصیلات تکمیلی دانشگاه جناب آقای دکتر کاوسی که زحمت باز خوانی پایان نامه را تقبل فرمودند و مدیریت جلسه دفاع از رساله را بر عهده داشتند، قدردانی می نمایم.

از مشاوره ها و مساعدت های دوستان خوبم آقایان مهندس دارایی و قره خانی و تمامی همکلاسی های عزیزم تشکر می کنم.

چکیده

در سال‌های اخیر، توجه گسترده به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، منجر به تحقیقـاتی در زمینـه‌ی بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های منابع جانوری یا گیاهی گردیـده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پپتیدهای زیست‌فعال به توانایی آنها در مهار رادیکال‌هـای آزاد، عمـل به‌عنوان شلاته‌کننده‌ی فلـزات، و جلـوگیری از اکسیداسـیون چربـی نسـبت داده شـده اسـت. در ایـن پژوهش پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی کاراس (*Carassius carassius*) کـه یـک مـاهی کـم ارزش شیلاتی است از طریق هیدرولیز آنزیمی، توسط آنزیم آلکالاز تهیـه و بهینـه نمـودن شـرایط هیـدرولیز جهت دستیابی به درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی بهینه و بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اسـتفاده از روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی انجام گرفت و نیز فعالیت پروتئین‌های هیـدرولیز شـده در شلاته‌کردن یون‌های آهن و احیا نمودن آهن نیز مورد بررسی قرار گرفت. اثرات ترکیبـی دمـا، زمـان و فعالیت‌آنزیم، به عنوان سه متغیر مستقل اثرگذار بر متغیرهای وابسته، شامل درجه‌ی هیدرولیز، بازیافـت نیتروژنی و مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، توسط معادله درجه دوم با اسـتفاده از نـرم افـزار Design expert برازش گردیدند. مطابق مدل‌سازی ریاضی انجام گرفتـه بـالاترین درجـه هیـدرولیز بـه میـزان ۴۲/۰۲ درصد در شرایط هیدرولیز ۲۰۶/۳۷ دقیقه، ۴۸/۱۹ درجه سـانتی‌گـراد و فعالیـت‌آنزیمـی ۷۹/۵۵ واحد آنسون حاصل گردید؛ و نیز بـالاترین بازیافـت نیتروژنـی در شـرایط هیـدرولیز ۱۹۱/۴۶ دقیقـه، ۴۸/۳۸ درجه سانتی‌گراد ۷۰/۷۴ واحد آنسون به میزان ۸۱/۰۳ درصد بدست آمد. همچنین مدل ریاضی مشخص کننده‌ی ناحیه‌ای با بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی (بیش از ۵۸/۲۲ درصد) در شـرایط منطبـق با دمای ۴۸/۱۱ درجه سانتی‌گراد، زمان ۱۵۱/۲۷ دقیقه و فعالیت‌آنزیمی ۶۴/۴۳ واحد آنسون برکیلـوگرم بود. بالاترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن در زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه و به میزان ۴۴/۵۶ درصد بـه دست آمد. بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیزشـده در زمـان هیـدرولیز۱۲۰ دقیقـه، بـه دست آمد که در مقایسه با اسیدآسکوربیک ppm ۱۰۰، ۶۷/۳۲ درصد قدرت احیاکنندگی از خود نشان می‌داد. نتایج نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شـده‌ی مـاهی کـاراس مـی‌توانـد قابلیـت اسـتفاده در فرمولاسیون موادغذایی به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی و نیز کاربردهای دارویی داشته باشد.

واژه های کلیدی:

پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی، ماهی کاراس (*Carassius carassius*)، درجه‌ی هیـدرولیز، بازیافـت نیتروژنی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، روش سطح پاسخ

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات
۱-۱- اکسیداسیون و ضرورت پیشگیری از آن ۲
۱-۲- آنتی‌اکسیدان‌ها در سیستم‌های غذایی..... ۳
۱-۳- پپتیدهای زیست‌فعال..... ۳
۱-۴- مکانیسم آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده..... ۴
۱-۵- پپتیدهای آنتی‌اکسیداتیو به منظور بهبود سلامتی انسان..... ۴
۱-۶- هیدرولیز پروتئین..... ۵
۱-۶-۱- روش‌های تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی..... ۶
۱-۶-۱-۱- روش‌های شیمیایی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی..... ۶
۱-۶-۱-۲- روش‌های بیولوژیکی برای تولید پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی..... ۶
۱-۷- پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی حاصل از هیدرولیز آنزیمی..... ۸
۱-۸- آنزیم‌های مورد استفاده در تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده..... ۸
۱-۹- ماهی کاراس..... ۹
۱-۱۰- آنزیم آلکالاز..... ۱۱
۱-۱۱- درجه هیدرولیز..... ۱۱
۱-۱۲- بازیافت نیتروژنی..... ۱۲
۱-۱۳- طعم تلخ پروتئین هیدرولیز شده ماهی..... ۱۲
۱-۱۴- بهینه‌سازی فرایند..... ۱۳
۱-۱۴-۱- روش سطح پاسخ به منظور بهینه‌سازی فرایند..... ۱۴
۱-۱۴-۲- برخی اصطلاحات رایج در بهینه‌سازی فرایند..... ۱۴
۱-۱۵- فرضیات..... ۱۵
۱-۱۶- اهداف..... ۱۵

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل دوم: مروری بر منابع پیشین

۲-۱- هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها از منابع مختلف و ویژگی‌های آنها..... ۱۸

۲-۲- فعالیت آنتی‌آکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده از منابع مختلف..... ۱۸

۲-۳- کاربرد آنزیم‌ای مختلف در هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها..... ۲۲

۲-۴- بهینه سازی شرایط موثر در هیدرولیز به روش سطح پاسخ..... ۲۴

۲-۵- پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی به منظور کنترل فرایند اکسیداسیون در غذاها..... ۲۷

۲-۶- جمع‌بندی پیشینه‌ی تحقیق..... ۲۸

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد..... ۳۰

۳-۲- دستگاه‌ها..... ۳۰

۳-۳- روش‌ها..... ۳۲

۳-۳-۱- تهیه پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی..... ۳۲

۳-۳-۲- اندازه‌گیری ترکیبات شیمیایی نمونه..... ۳۳

۳-۳-۲-۱- اندازه‌گیری نیتروژن و پروتئین..... ۳۳

۳-۳-۲-۲- اندازه‌گیری چربی..... ۳۴

۳-۳-۲-۳- اندازه‌گیری رطوبت..... ۳۵

۳-۳-۲-۴- اندازه‌گیری خاکستر..... ۳۵

۳-۳-۳- اندازه‌گیری درجه‌ی هیدرولیز..... ۳۶

۳-۳-۴-اندازه‌گیری بازیافت نیتروژنی..... ۳۶

۳-۳-۵- اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی..... ۳۶

۳-۳-۵-۱- اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH..... ۳۷

۳-۳-۵-۲- آزمون قدرت احیاءکنندگی..... ۳۷

۳-۳-۵-۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++})..... ۳۸

۳-۴- تجزیه و تحلیل آماری ۳۸

۳-۵- آزمایشات بهینه‌سازی..... ۳۹

فهرست مطالب

عنوان | صفحه

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- ترکیبات شیمیایی ۴۲

۴-۱-۱- پروتئین ۴۲

۴-۱-۲- چربی ۴۲

۴-۱-۳- خاکستر ۴۳

۴-۲- نتایج پیش تیمارها ۴۳

۴-۲-۱- درجه‌ی هیدرولیز ۴۳

۴-۲-۲- مهار رادیکال‌های آزاد DPPH ۴۹

۴-۳- فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن (Fe^{++}) ۵۰

۴-۴- قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیزشده ۵۳

۴-۵- بهینه‌سازی ۵۵

۴-۵-۱- بهینه‌سازی درجه‌ی هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی ۵۵

۴-۵-۱-۱- بهینه‌سازی درجه‌ی هیدرولیز ۵۵

۴-۵-۱-۱-۱- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل درجه‌ی هیدرولیز ۶۶

۴-۵-۱-۲- بهینه‌سازی بازیافت نیتروژنی ۶۶

۴-۵-۱-۲-۱- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل بازیافت نیتروژنی ۷۵

۴-۵-۲- بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۷۶

۴-۵-۲-۱- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۸۵

فصل پنجم: نتیجه‌گیری کلی

۵-۱ نتیجه‌گیری کلی ۸۸

۵-۲- پیشنهادات پژوهشی و اجرایی ۹۰

فصل ششم: منابع

منابع ۹۲

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۳-۱- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی درجه‌ی هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس ۴۰
جدول ۳-۲- متغیرهای مستقل و سطوح مورد استفاده جهت بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس ۴۰
جدول ۴-۱- ترکیبات شیمیایی ماهی کاراس و پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از آن..... ۴۲
جدول ۴-۲- مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در زمان ها، دماها و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۶
جدول ۴-۳- میزان فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۸/۵ درجه سانتی گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم..... ۵۱
جدول ۴-۴- میزان قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۸/۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم..... ۵۴
جدول ۴-۵- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح کدبندی شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای درجه‌ی هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی پروتئین هیدرولیزشده ماهی کاراس..... ۵۶
جدول ۴-۶- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ برای درجه‌ی هیدرولیز..... ۵۷
جدول ۴-۷- ضرایب رگرسیونی مدل براورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش بینی معادله مدل متغیرهای مستقل در ارزیابی درجه‌ی هیدرولیز..... ۵۸
جدول۴-۸- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ برای بازیافت نیتروژنی..... ۶۷
جدول ۴-۹- ضرایب رگرسیونی مدل براورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش بینی معادله مدل متغیرهای مستقل در ارزیابی بازیافت نیتروژنی..... ۶۸
جدول ۴-۱۰- طرح آزمایشی مرکب مرکزی و سطوح کدبندی شده و پاسخ متغیرهای مستقل برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس..... ۷۷

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۴-۱۱- جدول تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مدل درجه دوم حاصل از طرح سطح پاسخ بـرای فعالیت آنتی‌اکسیدانی..... ۷۸
جدول ۴-۱۲- ضرایب رگرسیونی مدل براورد شده از طریق تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه جهت پیش‌بینی معادله مدل متغیرهای مستقل در ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی..... ۷۹

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- ماهی کاراس (*Carassius carassius*)..... ۱۰
شکل ۳-۱- مراحل تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کاراس..... ۳۲
شکل ۴-۱- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۷
شکل ۴-۲- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۷
شکل ۴-۳- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۸
شکل ۴-۴- درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۸
شکل ۴-۵- قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در ۴۸/۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مختلف..... ۴۹
شکل ۴-۶- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۸/۵ درجه سانتی-گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم..... ۵۲
شکل ۴-۷- قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس در دمای ۴۸/۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت آنزیمی ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم..... ۵۴
شکل ۴-۸- رابطه بین مقادیر مشاهده شده و مقادیر پیش بینی شده در آزمون درجه‌ی هیدرولیز (الف) و نمودار توازن (ب)..... ۶۰
شکل ۴-۹- نمودار سه‌بعدی تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۶۱
شکل ۴-۱۰- نمودار کانتور تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۶۲
شکل ۴-۱۱- نمودار سه‌بعدی تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۶۳
شکل ۴-۱۲- نمودار کانتور تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۶۴
شکل ۴-۱۳- نمودار سه‌بعدی تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در دماها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۶۴
شکل ۴-۱۴- نمودار کانتور تغییرات درجه‌ی هیدرولیز در دماها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۶۵
شکل ۴-۱۵- رابطه بین مقادیر مشاهده شده و مقادیر پیش بینی شده در آزمون بازیافت نیتروژنی (الف) و نمودار توازن (ب)..... ۷۰

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۴-۱۶- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژنی در زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۷۱
شکل ۴-۱۷- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژنی در زمان‌ها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۷۲
شکل ۴-۱۸- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۷۳
شکل ۴-۱۹- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۷۳
شکل ۴-۲۰- نمودار سه‌بعدی تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۷۴
شکل ۴-۲۱- نمودار کانتور تغییرات بازیافت نیتروژنی در دماها و فعالیت‌های آنزیمی مورد آزمایش..... ۷۵
شکل ۴-۲۲- رابطه بین مقادیر مشاهده‌شده و مقادیر پیش‌بینی شده در آزمون آنتی‌اکسیدانی (الف) و نمودار توازن (ب)..... ۸۰
شکل ۴-۲۳- نمودار سه بعدی تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در فعالیت‌های آنزیم و زمان‌های مورد آزمایش..... ۸۲
شکل ۴-۲۴- نمودار کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در فعالیت‌های آنزیم و زمان‌های مورد آزمایش..... ۸۲
شکل ۴-۲۵- نمودار سه‌بعدی تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۸۳
شکل ۴-۲۶- نمودار کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در دماها و زمان‌های مورد آزمایش..... ۸۳
شکل ۴-۲۷- نمودار سه‌بعدی تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در فعالیت‌های آنزیم و دماهای مورد آزمایش..... ۸۴
شکل ۴-۲۸- نمودار کانتور تغییرات درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH در فعالیت‌های آنزیم و دماهای مورد آزمایش..... ۸۵

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- اکسیداسیون و ضرورت پیشگیری از آن

پراکسیداسیون چربی بعنوان اصلی‌ترین مسیر تغییرات کیفیت که عطر، طعم، بافت و ظاهر غذاها را تحت تأثیر قرار می‌دهد شناخته شده است. علاوه بر این مشخص گردیده که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در ایجاد برخی از بیماری‌های خاص دارد. عامل این بیماری‌ها پراکسیدهای چربی و ترکیبات با وزن مولکولی پایین تولید شده در مرحله‌ی نهایی واکنش اکسیداسیون می باشند. از این رو به منظور پیش‌گیری از فساد غذاها و محافظت در مقابل بسیاری از بیماری‌ها ضروریست که جلوی پراکسیداسیون چربی ها و تشکیل رادیکالهای آزاد بوجود آمده در محصولات غذایی و سلول‌های زنده گرفته شود (لی[1] و همکاران، ۲۰۰۸).

در بدن انسان نیز تعادل آنتی‌اکسیدان– پرواکسیدان، می‌تواند طی افزایش سن و بعلت سایر عوامل نظیر آلوده کننده‌های محیطی، خستگی، دریافت کالری اضافه و رژیم غذایی پرچرب دستخوش تغییر شود. با پیشرفت سن قابلیت آنتی‌اکسیدانی سلولی و پلاسمایی و نیز جذب مواد مغذی، شامل آنتی-اکسیدان‌ها به تدریج کاهش یافته و منجر به افزایش آسیب پذیری پروتئین‌ها به حمله رادیکال‌های آزاد می‌گردد. سایر عوامل محیطی ذکر شده می تواند سیستم ایمنی بدن را ضعیف کرده و بدن را نسبت به حمله اکسیداتیو آسیب پذیر نماید. به منظور افزایش سلامت انسان مشخص گردیده که استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های رژیمی با بالابردن بار آنتی‌اکسیدانی بدن اقدامی موثر و عملی می‌باشد (ریزیوی[2] و همکاران، ۲۰۰۶؛ المادفا[3] و میر[4]، ۲۰۰۸).

1 - Li
2 - Rizvi
3 - Elmadfa
4 - Meyer

۱-۲- آنتی‌اکسیدان‌ها در سیستم‌های غذایی

آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور حفظ محصولات غذایی، با به تأخیراندازی تغییر رنگ و کاهش کیفیت ناشی از اکسیداسیون به کار می‌روند. یک آنتی‌اکسیدان به عنوان ماده‌ای که در غلظت‌های اندک نسبت به ماده‌ی اکسیدشونده بکار رفته و به گونه‌ای قابل توجه اکسیداسیون ماده را به تعویق می اندازد تعریف می‌گردد. بسیاری از آنتی‌اکسیدانهای سنتزی نظیر BHA[1] و BHT[2] به عنوان افزودنی غذایی جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا به کار برده می‌شوند. اگرچه این آنتی‌اکسیدان‌ها در مقایسه با آنتی‌اکسیدان های طبیعی نظیر آلفاتوکوفرول[3] و اسید آسکوربیک[4] قدرت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان می دهند ولی در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آنها نگرانی‌هایی وجود دارد. از این رو پیشرفت در استفاده از آنتی اکسیدان‌های طبیعی به منظور جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه محققین می باشد (بوگاتف[5] و همکاران، ۲۰۰۹).

۱-۳- پپتیدهای زیست‌فعال

در سال‌های اخیر توجه به استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، منجر به تحقیقاتی در زمینه‌ی بررسی قابلیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای فعال بیولوژیک از پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای نظیر پروتئین سویا، گندم، کازئین شیر، پروتئین ماهی و... شده است. پپتیدهای زیست فعال به عنوان اجزاء پروتئینی مورد بررسی قرار می‌گیرند که در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال بوده و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی از خود بروز می‌دهند. این پپتیدها در اندازه‌های ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه و جرم مولکولی کمتر از ۶۰۰۰ دالتون می‌باشند. ساختار آمینواسیدی و توالی‌های آنها فعالیت زیست فعالی را تحت تأثیر قرار می‌دهند. بر اساس ویژگی‌های ساختاری و ترکیب آمینواسیدی، آنها نقش‌های متعددی نظیر مهارکنندگی عناصر کمیاب، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، فعالیت ضدمیکروبی،

1 - butylated hydroxyanisole
2 - butylated hydroxytoluene
3 - alpha-tocopherol
4 - ascorbic acid
5 - Bougatef

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش‌دهندگی کلسترول و فعالیت ضدفشار خون بالا از خود نشان می‌دهند. با این حال پپتیدهای متعددی یافت شده‌اند که عملکردهای چندگانه از خود بروز می‌دهند (سرمدی و اسماعیل، ۲۰۱۰).

۱-۴- مکانیسم آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده

قابلیت آنتی‌اکسیدانی این هیدرولیز شده‌ها به تأثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آنها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل بعنوان شلاته‌کننده‌ی فلزات، خاموش کننده‌ی اکسیژن یا دهنده‌ی هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی بوسیله‌ی تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن می‌باشد (لی و همکاران، ۲۰۰۸). مشخص گردیده هضم آنزیمی بتاکانگلایسینین[1] و گلایسینین[2] فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن را افزایش داده، این می‌تواند در اثر این حقیقت باشد که در هیدرولیز، گروه‌های جانبی آمینواسیدی[3] فعال بیشتری در معرض قرار گرفته و این امرمنجر به افزایش خاصیت آنتی‌اکسیدانی گردیده است (ماتوبا[4]، ۲۰۰۲).

۱-۵- پپتیدهای آنتی‌اکسیداتیو در بهبود سلامتی انسان

در شرایط فیزیولوژکی طبیعی، سلامتی انسان با تعادل بین عوامل آنتی‌اکسیداتیو و اکسیداتیو در داخل بدن حفظ می‌گردد. گونه‌های فعال اکسیژن[5] نظیر رادیکال‌های هیدروکسیل[6]، رادیکال‌های

1 - beta-conglycinin
2 - glycinin
3 - R groups
4 - Matoba
5 - Reactive oxygen species (ROS)
6 - hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$)

متنوعی مانند جایگزینی برای شیر، مکمل‌های پروتئینی، محیط کشت باکتریایی، پایدارکننده‌ی نوشابه‌ها و طعم‌دهنده در صنایع شیرینی‌سازی تولید شود. روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده به کار گرفته می‌شوند. هیدرولیز آنزیمی به نوعی یک روش امیدبخش برای آینده محسوب می‌شود زیرا باعث تولید محصولاتی با خواص کاربردی بالا و ارزش تغذیه‌ای مطلوب می‌گردد (اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷).

۱-۶-۱- روش‌های تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی

همان‌گونه که ذکر گردید به طور کلی دو روش برای هیدرولیز نمودن پروتئین‌ها وجود دارد: روش شیمیایی و روش بیولوژیکی.

۱-۶-۱-۱- روش‌های شیمیایی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی

هیدرولیز شیمیایی ماهی روشی موفقیت آمیز بوده که طی آن شکسته شدن باندهای پپتیدی توسط اسید یا باز انجام می‌گیرد. این روش قدیمی بوده که به دلیل ارزان و ساده بودن، کاربرد بسیار گسترده‌ای داشته است. هیدرولیز کامل پروتئین‌های ماهی را می‌توان با قراردادن پروتئین ماهی به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۱۱۸ درجه سانتی‌گراد در معرض اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال انجام داد. به منظور هیدرولیز قلیایی پروتئین ماهی‌ها، به طور عمده از پروتئین‌های تغلیظ شده‌ی ماهی[1] (FPC) استفاده می‌شود (اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷).

۱-۶-۱-۲- روش‌های بیولوژیکی برای تولید پروتئین هیدرولیزشده‌ی ماهی

این روش‌ها را می‌توان به دو دسته‌ی کلی روش‌های اوتولیتیکی[2] و استفاده از آنزیم‌های تجاری دسته‌بندی نمود. آنزیم‌ها به دلیل اینکه کاملاً اختصاصی عمل می‌کنند و دارای نقاط خاصی برای اتصال

1 - Fish Protein Concentrate
2 - Autolytical

پراکسیل[۱]، یون سوپراکسید[۲] و پراکسی‌نیتریت[۳] در فرایندهای طبیعی بیولوژیک ساخته می‌شوند (دکر[۴] و و زو[۵]، ۱۹۹۸).

آنتی‌اکسیدان های با منشاء داخلی[۶] به حفظ بافت‌ها و اندام‌ها از آسیب‌های اکسیداتیو ناشی از چنین گونه‌های فعال اکسیژنی کمک می کنند. این سیستم آنتی اکسیدانی با منشاء داخلی در بدن شامل آنزیم‌هایی نظیر سوپراکسید دیسموتاز[۷]، کاتالاز[۸]، گلوتاتیون پراکسیداز[۹] و انواع ترکیبات غیرآنزیمی نظیر سلنیوم، آلفاتوکوفرول و ویتامین ث می‌باشند. گذشته از این اسیدهای آمینه و پپتیدها نیز در قابلیت آنتی‌اکسیداتیو سلول‌ها شرکت کرده و به حفظ سلامت بافت‌های بیولوژیکی کمک می‌کنند. گلوتاتیون[۱۰]، کارنوسین[۱۱]، آنسرین[۱۲] و اوفیدین[۱۳]، پپتیدهایی آنتی‌اکسیدانی هستند که به طور طبیعی بافت‌های ماهیچه‌ای حضور دارند (چان[۱۴] و همکاران، ۱۹۹۴؛ بابیژایو[۱۵] و همکاران، ۱۹۹۴).

۱-۶- هیدرولیز پروتئین

یکی از جدیدترین فن‌آوری‌ها برای تولید فراورده‌های با ارزش افزوده‌ی بالا، هیدرولیز پروتئین می‌باشد. عمل هیدرولیز را می‌توان به این صورت تعریف نمود: شکسته شدن شیمیایی یا آنزیمی پروتئین‌ها به پپتیدهایی با وزن مولکولی مختلف. پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به منظور کاربردهای

1 - peroxyl radicals ($^{\bullet}OOR$)
2 - superoxide anion ($^{\bullet}O2-$)
3 - peroxynitrite (ONOO)
4 - Decker
5 - Xu
6 - Endogenous antioxidants
7 - superoxide dismutase
8 - catalase
9 - glutathione peroxidase
10 - glutathione
11 - carnosine
12 - anserine
13 - ophidian
14 - Chan
15 - Babizhayev