Archive of SID
DOI: 10.22059/ijbse.2018.243764.664999 مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۴۹، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷ (ص ۵۹۶-۵۸۹)

Investigation of Properties of Bioactive Peptides Derived from Enzymatic Hydrolysis of Chicken Slaughter Waste

KHATEREH PARHIZKARY[1], SEYED EBRAHIM HOSSEINI[2*], AKRAM SHARIFI[3]

1. Graduated MSc of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
2. Associate Professor of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Science and Research Branch, Tehran, Iran.
3. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Industrial and Mechanical Engineering, Qazvin Branch, Islamic Azad University, Qazvin, Iran
(Received: Oct. 15, 2017- Revised: May. 18, 2018- Accepted: May. 26, 2018)

ABSTRACT

The purpose of this study was to investigate the possibility of producing bioactive peptides from chicken waste proteins by enzymatic hydrolysis. Protein extract of chicken waste was hydrolyzed by Actinidin Cyanocele extract. Then it was estimated the degree of hydrolysis, mean length of the peptide chain and the antioxidant property of the hydrolyzed product. Assay of antioxidant property of protein hydrolyzates showed that in the first four hours, antioxidant property of experiment samples increased to 85%, while with increasing the hydrolysis until 8 hours, the antioxidant activity decreased to 32%. The reason for this reduction can be more hydrolysis and degradation in regions of bioactive peptides that have antioxidant properties. So, the results of this study indicated that enzymatic hydrolysis of chicken waste is a way for production of natural antioxidant compounds that can be considered as drug or additive in food and pharmaceutical industries.

Key words: Bioactive peptides, chicken waste, antioxidant property, actinidin

* Corresponding Author's Email: Ebhoseini@yahoo.com

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی خواص پپتیدهای زیست فعال حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات کشتارگاه مرغ

خاطره پرهیزکاری[۱]، سید ابراهیم حسینی[۲]*، اکرم شریفی[۳]

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۲. دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

۳. استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده مهندسی صنایع و مکانیک، واحد قزوین، دانشگاه آزاد اسلامی، قزوین، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۷/۲۳- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۷/۲/۲۸- تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۵)

چکیده

هدف از این تحقیق، امکان تولید پپتیدهای زیست فعال از پروتئین های ضایعات مرغ با روش هیدرولیز آنزیمی بود. عصاره پروتئینی ضایعات مرغ به وسیله عصاره آنزیمی اکتینیدین کیوی هیدرولیز شد. سپس درجه هیدرولیز، متوسط طول زنجیره پپتیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی محصول هیدرولیز شده بررسی گردید. ارزیابی ویژگی آنتی اکسیدانی هیدرولیزات های پروتئینی حاصل از هیدرولیز نشان داد که در ۴ ساعت اول در نمونه های آزمایشی خاصیت آنتی اکسیدانی تا حدود ۸۵ درصد افزایش یافت در حالی که با افزایش میزان هیدرولیز تا ۸ ساعت میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به۳۲ درصد کاهش یافت. دلیل این کاهش را می توان هیدرولیز بیشتر و شکست در مناطقی از پپتید های زیست فعال دانست که دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بودند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که هیدرولیز آنزیمی ضایعات مرغ راهی برای تولید ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی است که می تواند به عنوان دارو یا افزودنی در صنایع غذایی و دارویی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: پپتیدهای زیست فعال، ضایعات مرغ، خاصیت آنتی اکسیدانی، اکتینیدین

مقدمه

پروتئین ها ملکول های پیچیده و متنوعی هستند که به عنوان منبعی از انرژی و آمینو اسیدهای ضروری شناخته می شوند و ویژگی های عملکردی آنها ناشی از تاثیر حضور پروتئین بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی و حسی غذا است (Korhonen & Pihlanto 2006). اخیرا بسیاری از پروتئین های غذایی با داشتن ویژگی زیست فعالی پپتید های موجود در آنها، بسیار مورد توجه قرار گرفته اند. بخش عمده پپتید های زیست فعال[۱] دارای ۲۰-۲ اسید آمینه هستند و وزن ملکولی آنها کمتر از ۶ کیلو دالتون بوده است. این پپتید ها قسمت به خصوصی از یک پروتئین می باشند که در پروتئین اولیه غیر فعال هستند و توسط روش های زیر از توالی ملکولی آزاد می شوند: ۱) هضم توسط آنزیم های هضم کننده گوارشی ۲) طی فرآیند تخمیر با باکتری های خاص ۳) به وسیله آنزیم های پروتئولیتیک جدا شده از میکروارگانیسم ها یا گیاه و در شرایط آزمایشگاهی (Korhonen & Pihlanto 2006; Moller *et al*., 2008).

این پپتیدها تا زمانی که درون توالی پروتئین قرار دارند، فعال نبوده اما طی پروتئولیز آنزیمی در بدن موجود زنده یا در محیط آزمایشگاهی تولید شده و می توانند فعالیت شبه هورمونی در بدن اعمال نمایند. با توجه به ترکیب و توالی آمینو اسیدی، پپتید های زیست فعال ویژگی های مختلفی نظیر کاهش فشار خون[۲]، اثرات انعقادی، آنتی اکسیدانی، آرام بخشی[۳]، بخشی[۳]، تاثیر بر سیستم ایمنی بدن، ضد میکروبی[۴]، کاهش دهندگی کلسترول و غیره نشان می دهند. علاوه بر آن بسیاری از پپتید ها دارای خواص چند گانه هستند. پپتید های زیست فعال از رنج گسترده ای از مواد غذایی تولید شده اند که از آن جمله می توان به منابع حیوانی (شیر، تخم مرغ، پنیر، گوشت گاو، گوشت خوک، غذاهای دریایی، ماهی)، منابع گیاهی (ذرت، گندم، لوبیا، جو، سویا، برنج)، قارچ های خوراکی و ... اشاره کرد (Korhonen & Pihlanto 2006; Moller *et al*., 2008).

هیدرولیز آنزیمی رایج ترین روش برای تولید پپتید های بیواکتیو است. آنزیم های پانکراس به ویژه تریپسین برای

* نویسنده مسئول: Ebhoseini@yahoo.com

1. Bioactive peptides

2. Antihypertensive
3. Opiate
4.Antimicrobial

www.SID.ir

Archive of SID

شناسایی تعداد زیادی از پپتید های بیواکتیو مورد استفاده قرار گرفتند. همچنین آنزیم های دیگری نظیر آلکالاز، کیموتریپسین، پانکراتین و پپسین و آنزیم ها از منابع قارچی و باکتریایی برای تولید پپتید های زیست فعال به کار رفتند. آنزیم اکتینیدین یک آنزیم پروتئولیتیک در کیوی است که می تواند باند های پپتیدی پروتئن ها وهمچنین آمید ها و استر های ساده را هیدرولیز کند. ضایعات حیوانی از جمله ضایعات مرغ منبعی از پروتئین های مختلف می باشند که سالانه میزان زیادی از این ضایعات به شکل سر، پا، استخوان، احشا و پروبال تولید می شوند که به صورت خوراک، کود و غذای حیوان فرآوری یا بدون استفاده دور ریخته می‌شوند. بخش های مختلف این ضایعات دارای نوع و مقادیر مختلف پروتئین می باشند. استفاده از روش هایی به منظور تولید اجزای بیولوژیکی ارزشمند از این ضایعات در قسمت های مختلف جهان به میزان محدودی صورت گرفته است. پپتید های زیست فعال تولید شده از ضایعات حیوانی نقش های افزایش دهنده سلامتی را با کاربرد های غذایی و دارویی می توانند ایفا کنند (Lasekan *et al*., 2013). همان طوری که هیدرولیزات پروتئین احشا طیور نشان داد که بخش های حاصل از هیدرولیز، فعالیت به دام انداختن رادیکال های DPPH، ABTS و رادیکال هیدروکسیل، قدرت احیا کنندگی و فعالیت آنتی اکسیدانی کل بالایی دارند (Jamdar *et al*., 2012). همچنین کلاژن جوجه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز تولید شد که دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بود و کلاژن به عنوان یک انتخاب موثر دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE)[1] برای استفاده در فرمولاسیون غذاهای عملگرا پیشنهاد شد (Soladoye *et al*., 2015). هدف از تحقیق اخیر، بررسی امکان تولید پپتید های زیست فعال با خاصیت آنتی اکسیدانی از ضایعات مرغ با استفاده از آنزیم پروتئازی کیوی بود.

مواد و روش ها

مواد

مواد مصرفی شامل ویتامین c، سولفات آمونیوم، تری سدیم سیترات، کوماسی بریلیانت گرین بلو G-250 ،اتانول، اسید فسفریک، آلبومین سرم گاوی، سدیم فسفات، B- مرکاپتواتانول، EDTA ، تری کلرواستیک اسید، سولفات مس ۵ آبه، سدیم پتاسیم تارتارات، سود، دی سدیم تترا بورات(دکا هیدرات)، سدیم دودسیل سولفات(SDS)، L- لوسین و متانول ساخت شرکت مرک آلمان و کازئین (شرکت FLUKA آمریکا)، افتال دی آلدئید (سیگما آمریکا) و DPPH (سیگما آمریکا) مورد استفاده قرار گرفتند.

روش ها

استخراج عصاره آنزیمی

ابتدا پوست کیوی ها (واریته هیوارد، خریداری شده از نهالستان کیوی هیوارد) کنده شده و بخش گوشتی میوه از دانه ها جدا گردید. بخش گوشتی (یک کیلوگرم) با مخلوط کن کاملا یکنواخت شد و عصاره بدست آمده از چند لایه صافی پارچه ای عبورداده شد. به عصاره صاف شده ویتامین C در غلظت نهایی یک میلی مولار اضافه شد و به مدت یک ساعت در دمای اتاق قرار گرفت. عصاره به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) سانتریفوژ شد و مایع رویی جمع آوری و رسوب آن دور ریخته شد(Mostafaie *et al*., 2006).

رسوب دهی با سولفات آمونیوم: به نمونه های مختلف عصاره کیوی، سولفات آمونیوم در غلظت نهایی۶۰٪ به آرامی و در حال همزدن اضافه شد نمونه یک ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرار گرفت و سپس ۳۰ دقیقه در۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه دردمای ۴ درجه سانتی گراد (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) سانتریفوژ شد. رسوب بدست آمده در بافرسیترات پنج صدم مولار با۵/۵ =pH حل و سپس یک شب در مقابل بافر مربوطه دیالیز گردید (کیسه دیالیز ۱۲ کیلو دالتون ساخت آمریکا). محلول دیالیز شده به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در۲۰۰۰ دور بر دقیقه (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) سانتریفوژ شد. مایع رویی جدا و برای مرحله بعد نگه داری گردید (Mostafaie *et al*., 2006).

تعیین غلظت پروتئینی عصاره آنزیمی

برای تعیین مقدار پروتئین از روش برادفورد استفاده شد. در روش برادفورد با معرف برادفورد (شامل ۰/۱ گرم کوماسی G-250 ،۵۰ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد، ۱۰۰ میلی لیتر اسید فسفریک ۸۵ درصد در حجم نهایی یک لیتر)، غلظت پروتئین در کیوی بر اساس غلظت های مشخص آلبومین سرم گاوی اندازه گیری شد. در این روش با استفاده از جذب غلظت های مختلف آلبومین سرم گاوی در دامنه ۱/۰-۱ میلی گرم در میلی لیتر منحنی استاندارد رسم گردید و بر اساس منحنی استاندارد، غلظت پروتئین نمونه ها اندازه گیری شد. برای آزمایش ۱۰۰ میکرولیتر نمونه با ۵ میلی لیتر معرف برادفورد مخلوط شد و به

1.Angiotensin converting enzyme

www.SID.ir

Archive of SID

مدت ۲ دقیقه عمل مخلوط کردن با ورتکس انجام گردید و جذب بعد از ۲۰ دقیقه در ۵۹۵nm با اسپکتروفوتومتر(LAMBDA 35 PERKIN ELMER آمریکا) قرائت شد(Bradford, 1976; Mostafaie *et al*., 2006).

اندازه گیری فعالیت پروتئازی اکتینیدین

برای اندازه گیری فعالیت آنزیم از روش Englund(1968) استفاده شد. به ۲ میلی لیتر از محلول سدیم فسفات۰/۱ مولار (pH= ۷) حاوی ۰/۰۰۷ مولار مرکاپتو اتانول، ۰/۰۰۱ مولار EDTA و ۰/۵ درصد کازئین، ۱۰۰ میکرولیترمحلول آنزیمی بدست آمده افزوده شد و مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد نگهداری گردید. واکنش با اضافه کردن ۳ میلی لیتر محلول ۵ درصد تری کلرو استیک اسید خاتمه یافت و پس از سانتریفوژ کردن با سرعت۴۰۰۰ دور بر دقیقه (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) به مدت ۱۰دقیقه میزان جذب نوری مایع رویی در طول موج ۲۸۰ نانومتربا اسپکترومتر(LAMBDA 35 PERKIN ELMER آمریکا) اندازه گیری گردید تا میزان فعالیت آنزیم بر اساس واحد گزارش گردد. یک واحد آنزیم برابر با مقدار آنزیمی می باشد که میزان جذب محلول کازئینات سدیم را یک واحد جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش دهد(Englund *et al*.,1968).

تهیه عصاره پروتئینی از ضایعات مرغ

مقدار یک کیلوگرم نمونه چرخ شده از ضایعات مرغ در ۱/۵ لیتر محلول آبی pH= ۴و۵ برای مدت ۴ و۶ ساعت جوشانده شد تا پروتئین ها از قطعات چرخ شده به اندازه کافی استخراج گردند. سپس عصاره فیلتر شد و به مدت ۲۰دقیقه در ۴ درجه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) سانتریفوژ گردید و ماده شناور به عنوان عصاره پروتئینی مورد استفاده قرار گرفت(Saiga *et al*., 2003).

اندازه گیری پروتئین عصاره مرغ

میزان پروتئین عصاره با روش بیورت تعیین گردید. اساس روش بیورت اتصال مس به پروتئین ها تحت شرایط قلیایی است. شدت جذب ترکیبی که از کمپلکس شدن مس با پروتئین حاصل می شود به صورت خطی با مقدار پروتئین موجود در محلول متناسب است. ۱/۵ گرم سولفات مس دارای ۵ ملکول آب و ۶ گرم سدیم پتاسیم تارتارات در ۵۰۰ میلی لیتر آب حل شده و به عنوان واکنشگر بیورت استفاده شد. سپس در حین همزدن، به آن ۳۰۰ میلی لیتر محلول سود ۱۰٪ وزنی- حجمی اضافه و با افزودن آب مقطر حجم به یک لیتر رسید. یک میلی لیتر از عصاره در لوله آزمایش ریخته و به آن ۴ میلی لیتر معرف بیورت اضافه گردید و پس از همزدن، به مدت ۳۰ الی۴۵ دقیقه در محل تاریک و در دمای اتاق نگه داری شد. میزان جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر(LAMBDA 35 PERKIN ELMER آمریکا) قرائت گردید. از سرم آلبومین گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد(Khatib, 2010).

هیدرولیز آنزیمی

pH عصاره پروتئینی استخراج شده از ضایعات، روی ۵ تنظیم شد. سپس آنزیم اکتینیدین در درصد های مختلف ۱، ۱/۲۵ و ۱/۵ به عصاره ها اضافه گردید و در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و در زمان های ۰، ۴، ۸ ساعت نگه داری شد. هر هضم با جوشاندن برای مدت ۱۰ دقیقه برای غیر فعال کردن آنزیم ها، متوقف شد. سپس محلول پروتئینی هیدرولیز شده برای جداسازی مواد هیدرولیز شده از بقایای هیدرولیز نشده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد و۹۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (توسط دستگاه HERMLEZ 323K آلمان) گردید و سوپرناتانت که حاوی مواد هیدرولیز شده است به منظور آزمایشات بعدی در دمای ۱۸- درجه نگه داری شد (Khatib, 2010; Ha *et al*., 2013).

تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به وسیله روش اسپکتروفتومتریک افتالدی الدهید تخمین زده شد.

تهیه محلول OPA[1]

محلول تازه OPA بطور روزانه بصورت زیر تهیه گردید: ۲۵ میلی لیتر سدیم تترا هیدرو بورات ۱۰۰ میلی مولار، ۲/۵ میلی لیتر محلول SDS[2] ۲۰٪(w/w)، ۴۰ میلی گرم OPA (حل شده در ۱میلی لیتر متانول) و ۱۰۰ میکرولیتر β- مرکاپتو اتانول مخلوط شده و با آب مقطر به حجم نهایی ۵۰ میلی لیتر رسید.

تهیه محلول استاندارد

۶۰ میلی گرم لوسین در ۱۵ میلی لیتر آب مقطر(۴ میلی گرم در هر میلی لیتر) حل شد. غلظت محلول استاندارد باید در دامنه ۰/۱ تا ۴ میلی گرم در هر میلی لیتر باشد. منحنی استاندارد به صورت جذب در طول موج ۳۴۰ nm در برابر تعداد میکرومول گروه آمین رسم گردید. برای ارزیابی پروتئولیز با پروتئین های عصاره ضایعات مرغ به عنوان سوبسترا، مقدار کمی مستقیما به ۱ میلی لیتر محلول OPA در لوله اسپکتروفتومتر اضافه شد و محلول آهسته باوارونه کردن لوله مخلوط شده و برای ۲ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردید. گروههای آلفا آمینو آزاد شده بوسیله

1.Ophethal dialdehyde
2. Sodium dodecyl sulfate

www.SID.ir

Archive of SID

هیدرولیز با OPA و β - مرکاپتو اتانول واکنش داده و جذب نمونه با دستگاه اسپکتروفتومتر(LAMBDA 35 PERKIN ELMER آمریکا) در طول موج ۳۴۰ nm اندازه گیری شد. مقدار به دست آمده از شاهد کم شده و به درصد درجه هیدرولیز تبدیل گردید (Esmaielpoor, 2015; Mirzaie, 2015).

تعیین متوسط طول زنجیرپپتیدی

میانگین طول زنجیرپپتیدی برای نمونه های پروتئین هیدرولیز شده برطبق معادله زیر محاسبه شد(Khatib., 2010; Mirzaie, 2015; Esmaielpoor , 2015).

طول میانگین زنجیرپپتیدی = ۱۰۰/DH

تعیین فعالیت به دام انداختن رادیکال DPPH[1]

فعالیت به دام انداختن رادیکال DPPH با استفاده از روش توصیف شده توسط Kim (2009) با اندکی تغییرات اندازه گیری شد. ۶۰ میکرولیتر از نمونه به ۶۰ میکرولیتر از DPPH (۶۰ میکرومولار) در محلول متانول اضافه شد سپس برای ۱۰ ثانیه مخلوط شد و فعالیت به دام انداختن نمونه های هیدرولیز شده با درصد مختلف آنزیم روی رادیکالDPPH با استفاده از یک اسپکترومتر (LAMBDA 35 PERKIN ELMER آمریکا) اندازه گیری گردید (kim *et al*., 2009; Mirzaie, 2015; Esmaielpoor., 2015).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال (٪) = ۱۰۰ × جذب کنترل/ جذب کنترل- جذب نمونه

تجزیه وتحلیل آماری

در کلیه آزمایشات برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون فاکتوریل در قالب طرح کاملا تصادفی استفاده شد. میانگین داده‌ها بر اساس آزمون مقایسه میانگین چند دامنه ای دانکن انجام گرفت. آزمایش ها در سه تکرار انجام شد و برای تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SAS استفاده شد.

نتایج و بحث

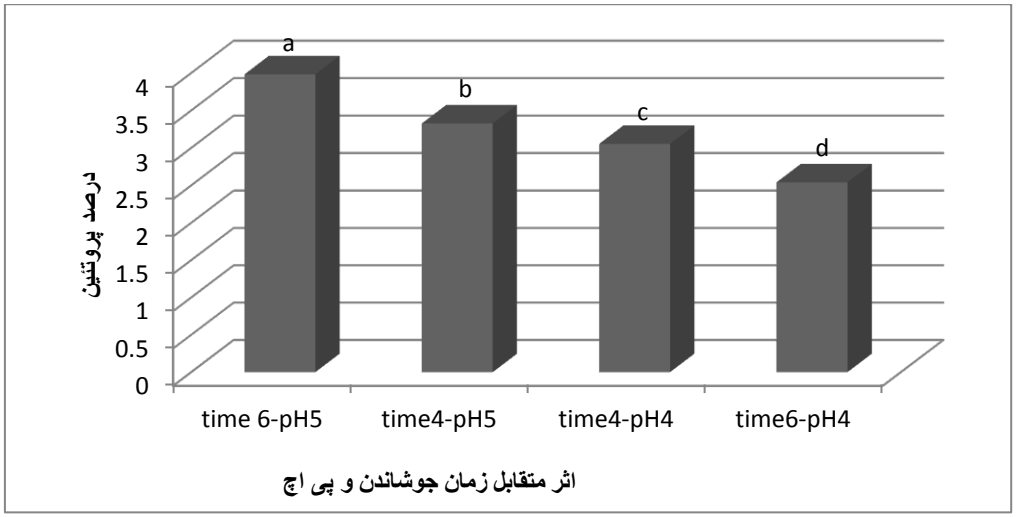
فعالیت عصاره آنزیمی

فعالیت عصاره آنزیمی ۰/۶ ml بدست آمد. میزان فعالیت آنزیم بر اساس واحد گزارش گردید. یک واحد آنزیم برابر با مقدار آنزیمی بود که میزان جذب محلول کازئینات سدیم را یک واحد جذب در طول موج ۲۸۰ نانومتر افزایش داد(Englund *et al*.,1968).

اندازه گیری پروتئین عصاره مرغ

بیشترین میزان پروتئین ۴/۰۰۱ mg/ml بدست آمد. مطابق با نتایج بدست آمده، با افزایش زمان جوشاندن ضایعات مرغ، میزان پروتئین استخراج شده افزایش یافت. اما این تغییرات معنی دار نبود($P>0/05$). همچنین با افزایش pH از ۴ به ۵، میزان پروتئین استخراج شده افزایش یافت بنابراین تاثیر زمان جوشاندن وpH روی میزان پروتئین استخراج شده از ضایعات مرغ در شکل (۱) نشان داد بیشترین میزان پروتئین استخراج شده در pH=۵ و زمان جوشاندن ۶ ساعت بدست آمد. اپتیمم pH فعالیت آنزیم اکتینیدین برای استخراج انواع پروتئین ها در محدوده ۳-۸ است (Boland, 2013) که در این تحقیق pH=۵ برای استخراج پروتئین از ضایعات مرغ موثرترین میزان بود.

1. Diphenyl picrylhydrazyl



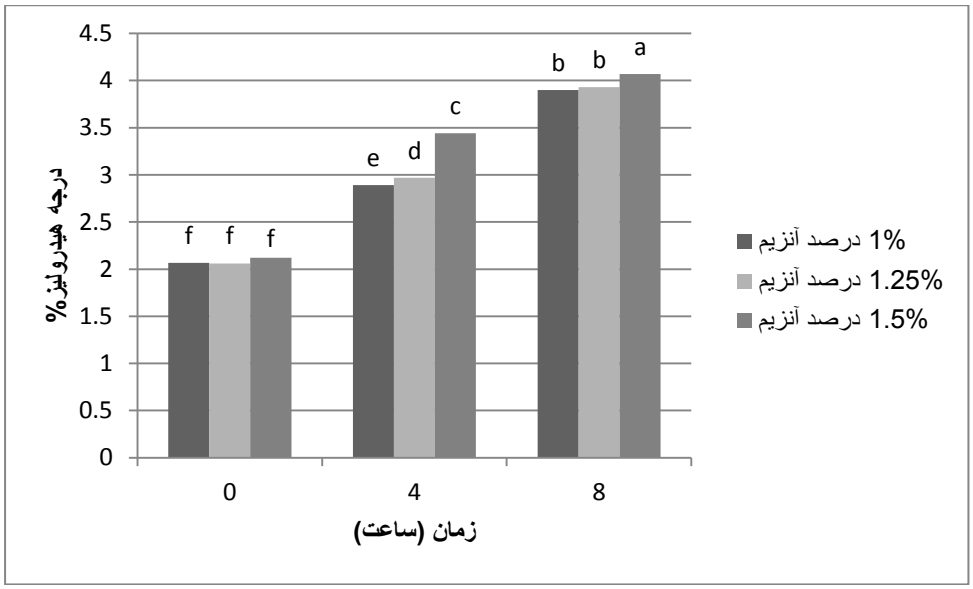
شکل ۱. تاثیر زمان جوشاندن و pH روی میزان پروتئین استخراج شده از ضایعات مرغ

www.SID.ir

Archive of SID

درجه هیدرولیز

اثر درصد آنزیم و زمان های هیدرولیز روی میزان هیدرولیز بررسی گردید. با افزایش درصد آنزیم، درجه هیدرولیز افزایش یافت اما تفاوت معنی داری دیده نشد. همچنین با افزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه هیدرولیز به تدریج افزایش یافت که به دلیل فرصت بیشتر تاثیر آنزیم روی پروتئین، هیدرولیز بیشتر اتفاق افتاد. همچنین نتایج نشان داد به منظور بدست آوردن درجه هیدرولیز بیشتر پروتئین ها بهتر است درصد آنزیم بیشتر مورد استفاده قرار گیرد. همان طوری که در شکل(۲) نشان داده شده است کمترین درجه هیدرولیز در زمان صفر و بیشترین آن در زمان ۸ ساعت بود و البته بین نمونه ها با درصد آنزیم متفاوت تفاوت معنی داری وجود نداشت. در تحقیق Khatib در سال 2010 از آنزیم فیسین از انجیر(جز خانواده سیستئین پروتئاز) در هیدرولیز گوشت شتر استفاده شد و نتایج نشان داد با افزایش میزان آنزیم و زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش یافت. اثر عصاره کیوی در هضم پروتئازی کلاژن گوشت گاو توسط Sugiyama و همکاران در سال 2005 نشان داد که عصاره کیوی توانست کلاژن دناتوره شده را تخریب کند و به طور مشخص نیروی برشی بافت پیوندی را کاهش داد و آزاد شدن پپتید های مرتبط با کلاژن را افزایش داد. Ha و همکاران در سال 2012، پروتئاز های پاپائین، بروملائین، اکتینیدین را برای هیدرولیز پروتئین های موجود در بافت پیوندی و عصاره میوفیبریلی گوشت گاو مورد بررسی قرار دادند و نتایج آنها نشان داد که پروتئاز اکتینیدین بیشترین اثر را در هیدرولیز پروتئین های میوفیبریلی گوشت گاو داشت. اثر عصاره های آنزیمی میوه کیوی و مارچوبه روی پروتئین های بافت پیوندی و عصاره میوفیبریلی گوشت گاو نشان داد که عصاره پروتئازی کیوی در هیدرولیز پروتئین های کلاژن و میوفیبریلی موثرتر بود که پتانسیل این آنزیم ها را برای کاربرد در ترد کردن گوشت پیشنهاد داد(Ha *et al*.,2013).



شکل۲. تاثیر زمان هیدرولیز و درصد آنزیم روی میزان درجه هیدرولیز

متوسط طول زنجیر پپتیدی

با افزایش درصد آنزیم، طول پپتید کاهش یافت اما تفاوت معنی داری بین نمونه ها وجود نداشت. بررسی اثر زمان هیدرولیز روی میزان طول پپتید نشان داد با افزایش زمان هیدرولیز، متوسط طول زنجیر پپتیدی کاهش یافت که به علت هیدرولیز بیشتر در طی زمان بود. همان طوری که در شکل(۳) نشان داده شده است بیشترین میزان طول پپتید در زمان صفر و کمترین میزان آن در زمان ۸ ساعت مشاهده گردید. نتایج حاصل از هیدرولیز آنزیمی نشان داده است که با افزایش زمان هیدرولیز، طول پپتید کاهش یافته است(Khatib, 2010).

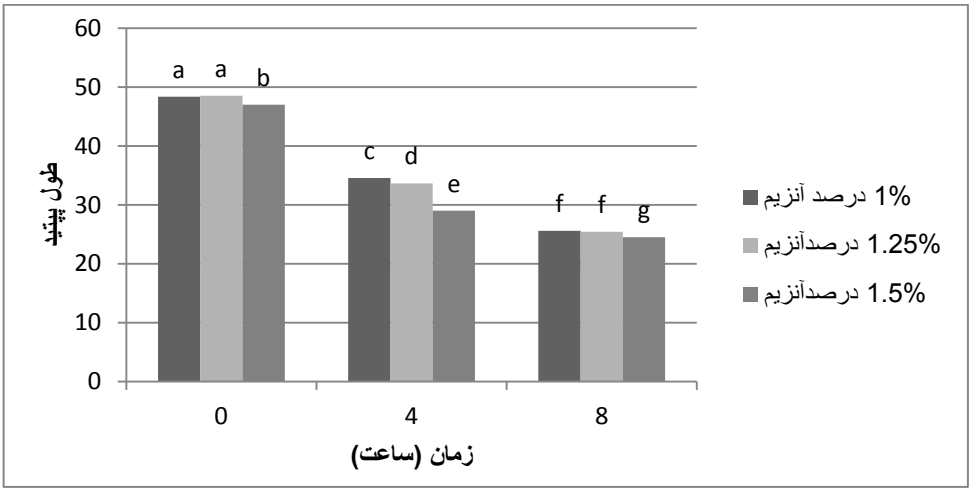
فعالیت به دام انداختن رادیکال DPPH

نتایج حاصل از هیدرولیز نشان داد درصد متفاوت آنزیم تاثیر معناداری روی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی نداشت و بیشترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی با میزان آنزیم ۱٪ بدست آمد. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در طی هیدرولیز تغییر یافت. تفاوت معنی داری بین فعالیت آنتی اکسیدانی زمان های

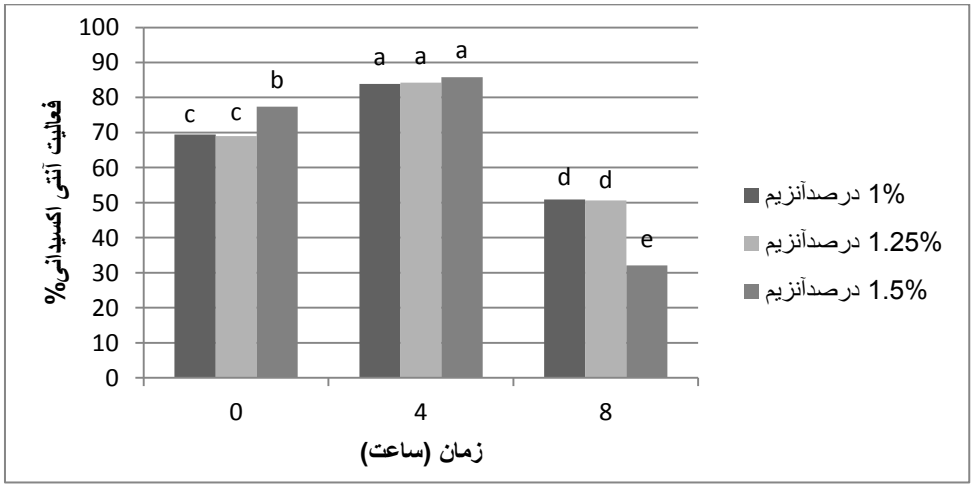
www.SID.ir

Archive of SID

مختلف وجود داشت($P < ۰/۰۵$). با افزایش زمان تا ۴ ساعت میزان فعالیت آنتی اکسیدانی افزایش یافت سپس تا ۸ ساعت از میزان آن کاسته شد. علت این کاهش را به دلیل هیدرولیز بیشتر و شکست در مناطقی از پپتید های دارای خاصیت آنتی اکسیدانی می توان دانست. تاثیر زمان هیدرولیز و درصد آنزیم روی فعالیت آنتی اکسیدانی (شکل۴) نشان داد بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی در زمان ۴ ساعت مشاهده شد و بین نمونه ها از نظر درصد آنزیم اختلاف معناداری وجود نداشت و کمترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در زمان ۸ ساعت مشاهده گردید. نتایج تحقیق Khatib در سال ۲۰۱۰ نشان داد که زمان هیدرولیز روی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی اثر گذار بوده است و تا زمان ۴ ساعت میزان درجه هیدرولیز، افزایش و سپس با افزایش زمان، میزان درجه هیدرولیز کاهش یافته است و همچنین درصد متفاوت آنزیم فیسین در هیدرولیز پروتئین های گوشت شتر روی فعالیت آنتی اکسیدانی اثر نداشت. تولید هیدرولیزات پروتئین بقایای طیور (گردن جوجه) با استفاده از چهار آنزیم (آلکالاز، نوتراز، فلیورزیم، پروتامکس) نشان داد که هیدرولیزات ها از الیگوپپتید های کوتاه ساخته شدند و دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالایی بودند(Nikolaev *et al*., 2016). بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های کلاژن و کراتین از منابع مختلف حیوانی (گوشت گاو های ماده، استخوان ماهی، پروبال جوجه و شاخ و سم گاو های ماده) نشان داد که همه بخش ها فعالیت آنتی اکسیدانی برای به دام انداختن رادیکال DPPH را دارا بودند (Ohba *et al*., 2003). Soladoye و همکاران در سال 2015، کلاژن جوجه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز تولید کردند که دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بود و کلاژن به عنوان یک انتخاب موثر دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و بازدارندگی ACE برای استفاده در فرمولاسیون غذاهای عملگرا پیشنهاد شد.



شکل۳. تاثیر زمان هیدرولیز و درصد آنزیم روی متوسط طول پپتید



شکل۴. تاثیر زمان هیدرولیز و درصد آنزیم روی فعالیت آنتی اکسیدانی نتیجه گیری

www.SID.ir

Archive of SID

میزان پروتئین موجود در عصاره پروتئینی نشان داد ضایعات مرغ می توانند به عنوان یک منبع پروتئینی مناسب تحت تاثیر هیدرولیز آنزیمی قرار بگیرند. عصاره آنزیمی کیوی قابلیت بالایی در هیدرولیز پروتئین ها داشت. پیشنهاد می گردد به منظور بدست آوردن درصد آنزیم و زمان مناسب برای هیدرولیز، تحقیقات بیشتری صورت گیرد. در این تحقیق پپتید های تولید شده از پروتئین ضایعات مرغ خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان دادند که می توانند به عنوان آنتی اکسیدان های طبیعی در مواد غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرند.

REFERENCES

Boland, M. (2013). Kiwifruit proteins and enzymes: actinidin and other significant proteins. *Advances in food and nutrition research*. 68, 59-80.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*. 72, 248-254.

Englund, P.T., King, T.P., Craig, L.C. & Walti, A.N.D.A. (1968). Ficin. I. Its isolation and characterization. *Biochemistry*, 7(1), 163-175.

Esmaielpoor, M. (2015). Seperation and survey of bioactive properties of peptides from enzymatic hydrolysis of goat milk. Ph.D. dissertation, University ofTehran Science and Research, Food science and technology. (In Farsi).

Ha, M., Bekhit, A.E.D.A., Carne, A. & Hopkins, D.L. (2012). Characterisation of commercial papain, bromelain, actinidin and zingibain protease preparations and their activities toward meat proteins. *Food chemistry*, *134*(1), 95-105.

Ha, M., Bekhit, A.E.D., Carne, A. & Hopkins, D.L. (2013). Characterisation of kiwifruit and asparagus enzyme extracts, and their activities toward meat proteins. *Food chemistry*, 136(2), 989-998.

Jamdar, S.N., Rajalakshmi, V. & Sharma, A. (2012). Antioxidant and ace inhibitory properties of poultry viscera protein hydrolysate and its peptide fractions.*Journal of Food Biochemistry*, 36(4), 494-501.

Khatib, N. (2010). Measurment and survey of bioactive properties of peptides from enzymatic treatment camel meat. Master of Science Thesis, University of Esfehan, Agriculture College. (In Farsi).

Kim , E.K., Lee, S.J., Jeon, B.T., Moon, S.H., Kim, B., Park, T.K., Han, J.S. & Park, P.J. (2009). Purification and characterisation of antioxidative peptides from enzymatic hydrolysates of venison protein. *Food Chemistry*, 114(4), 1365-1370.

Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16(5), 945-960.

Lasekan , A., Bakar, F.A. & Hashim, D. (2013). Potential of chicken by-products as sources of useful biological resources . *Waste Management*, 33(3), 552-565.

Mirzaie, M. (2015). Production and seperation bioactive peptides from enzymatic hydrolysis of sacharomyses serviziye yeast proteins with antioxidant and antimicrobial properties. Ph.D.dissertation,University ofTehran Science and Research, Food science and technology. (In Farsi).

Moller, N. P ., Scholz-Ahrens, K.E., Roos, N. & Schrezenmeir, J. (2008). Bioactive peptides and proteins from foods: indication for health effects. *European Journal of Nutrition*, 47(4), 171-182.

Mostafaie, A. & Chelbi, M. (2006). Kiwifruit actinidin: purification and survey its amount in native varieties. *Journal of Agriculture and Natural Sources Sciences and Techniques*, 10(3), 223-230. (In Farsi).

Nikolaev, I.V., Sforza, S., Lambertini, F., Ismailova, D.Y., Khotchenkov, V.P., Volik, V.G., Dossena, A., Popov, V.O. & Koroleva, O.V. (2016). Biocatalytic conversion of poultry processing leftovers: Optimization of hydrolytic conditions and peptide hydrolysate characterization. *Food chemistry.*197, 611-621.

Ohba, R., Deguchi, T., Kishikawa, M., Arsyad, F., Morimura, S. & Kida, K. (2003). Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen or keratin contained in livestock and fish waste. *Food Science and Technology Research*, 9(1), 91-93.

Saiga, A.I., Tanabe, S. & Nishimura, T. (2003). Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 51(12), 3661-3667.

Saiga, A., Okumura, T., Makihara , T., Katsuta, S., Shimizu, T., Yamada, R. & Nishimura, T. (2003). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in a hydrolyzed chicken breast muscle extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51(6), 1741-1745.

Soladoye, O.P., Saldo, J ., Peiro, L., Rovira, A. & Mor-Mur, M. (2015). Antioxidant and angiotensin 1 converting enzyme inhibitory functions from chicken collagen hydrolysates. *Journal of Nutrition & Food Sciences* ,5(3), 1-9.

Sugiyama, S., Hirota, A., Okada, C., Yorita, T., Sato, K. & Ohtsuki, K. (2005). Effect of kiwifruit juice on beef collagen. Journal of nutritional science and vitaminology, 51(1), 27-33.

www.SID.ir