Archive of SID

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 8, Issue 2, Spring 2019
Pages: 59-63
Type: Original Research

Effect of Molecular Weight of Isolated Protein Hydrolysate from *Sardinella sindensis* Obtained Using Pancratin on the Anti-Oxidative and Anti-Diabetic Properties

Fatan B.[1] *MSc*, Ahmadi Gavlighi H.[*1] *PhD*, Sahari A.[1] *PhD*

[1] Food Science & Technology Department, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The purpose of the present study was to hydrolyze *Sardinella sindensis* protein isolate by pancreatin enzyme and then fractionation hydrolysate based on molecular weight and finally evaluating and comparing the anti-oxidative and anti-diabetic properties of the fractions with hydrolysate.

Materials & Methods: Protein isolate from *Sardinella sindensis* muscle was extracted and then hydrolyzed using pancreatin enzyme in two enzyme/substrate ratio of 2.5 and 5% (W/W) for 2h. The hydrolysates were fractionated into three fractions included FPH-I (<2kDa), FPH-II (2-10kDa) and FPH-III (>10kDa) using an ultrafiltration (UF) membranes. The antioxidant and anti-diabetic activiteis of the fractions and hydrolysate were investigated.

Findings: The degree of hydrolysis increased with increasing hydrolysis time and it was significant between 30 and 60 minutes ($p<0.05$). FPH-III showed the highest DPPH radical scavenging activity. In terms of chelating activity on Fe^{2+}, there was no significant difference between the fractions and hydrolysate ($p>0.05$). Also, FPH-III showed a better ABTS radical-scavenging activity. FPH-III had the highest inhibitory potential against α-amylase at 2.5%. In addition, the inhibitory effect of samples at 20mg/ml against α-glucosidase was less than 50%.

Conclusion: FPH-III from *Sardinella sindensis* protein isolate by pancreatin enzyme had the highest DPPH radical scavenging, $ABTS^{+}$ activity and alpha-amylase inhibitory.

Keywords
Hydrolysates [Not in MeSH];
Sardine [Not in MeSH];
Chelating Activity [Not in MeSH];
Alpha Amylase Inhibition [Not in MeSH]

In Press

[*]Corresponding Author
Tel: +98 (21) 48292313
Fax: +98 (21) 48292313
Post Address: Food Science & Technology Department, Agricultural Faculty, Jalale Ale Ahmad Highway, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
ahmadi_ha@modares.ac.ir l

Received: June 8, 2018 Accepted: October 30, 2018 ePublished: June 20, 2019

www.SID.ir

Archive of SID

تاثیر وزن مولکولی آبکافته ایزوله پروتئین عضله ماهی *Sardinella sindensis* حاصل از آنزیم پانکراتین روی خواص ضداکسایشی و ضددیابتی

بهاره فتان MSc
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
حسن احمدی گاولیقی* PhD
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
محمدعلی سحری PhD
گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
اهداف: هدف از پژوهش حاضر، آبکافت ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند توسط آنزیم پانکراتین و سپس جزءبه‌جزءسازی آبکافته براساس وزن مولکولی و در نهایت ارزیابی و مقایسه خواص ضداکسایشی و ضددیابتی بخش‌های تفکیک‌شده با آبکافته بود.
مواد و روش‌ها: ایزوله توسط آنزیم پانکراتین در دو نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵% (وزنی/وزنی) در مدت ۲ساعت آبکافت شد. آبکافت حاصل توسط غشای فراپالایش به سه بخش FPH-I (کوچکتر از ۲کیلودالتون)، FPH-II (بین ۱۰-۲کیلودالتون) و FPH-III (بزرگتر از ۱۰کیلودالتون) جزءبه‌جزء شد. فعالیت ضداکسایشی و ضددیابتی بخش‌های تفکیک‌شده و خود آبکافته مورد سنجش قرار گرفت.
یافته‌ها: درجه آبکافت با افزایش زمان افزایش یافت و بین زمان‌های ۳۰ تا ۶۰دقیقه معنی‌دار بود ($p<0/05$). بخش FPH-III بیشترین توانایی مهار رادیکال DPPH را داشت. از نظر شلاته‌کنندگی یون آهن II تفاوت معنی‌داری بین بخش‌های تفکیک‌شده و آبکافته وجود نداشت ($p>0/05$). همچنین بخش FPH-III بیشترین توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS را داشت. FPH-III در غلظت ۲/۵% دارای بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز بود. همچنین فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها در غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمتر از ۵۰% بود.
نتیجه‌گیری: FPH-III بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH، $ABTS^+$ و بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز آبکافته ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند حاصل از آنزیم پانکراتین را داشت.
کلیدواژه‌ها: آبکافته آنزیمی، ماهی ساردین، شلاته‌کنندگی، بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۸
*نویسنده مسئول: ahmadi_ha@modares.ac.ir

مقدمه

دیابت یکی از مهم‌ترین بیماری‌هایی است که امروزه شیوع آن در جهان به‌سرعت رو به افزایش است. دیابت نوع دو حدود ۹۰-۸۰% موارد تشخیص دیابت را که یک بیماری قابل پیشگیری است، شامل می‌شود. هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا، نقش مهمی در گسترش دیابت نوع ۲ ایفا می‌کند[1]. در حال حاضر مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز مانند آکاربوز، مگلیتول و گلیبوز به‌عنوان داروهای درمانی برای درمان افراد دیابتی با هیپرگلیسمی پس از صرف غذا در نظر گرفته می‌شوند. با این حال استفاده مزمن از این عوامل می‌تواند منجر به عوارض جانبی نظیر استفراغ، اسهال و گرفتگی شکم شود[2]. تعدادی از مطالعات برای شناسایی منابع طبیعی مهارکننده‌های آلفاگلوکوزیداز و آلفاآمیلاز انجام شده است. گزارش شده است که طیف وسیعی از میوه‌ها، سبزیجات از جمله زغال‌اخته، توت فرنگی و نیز پپتیدهای عضله ماهی ساردین و اخیراً پروتئین تخم مرغ دارای فعالیت مهارکنندگی این آنزیم‌ها هستند[2].

از طرفی تنش اکسیداتیو ناشی از گونه‌های فعال اکسیژن مانند پراکسیدهیدروژن و سوپراکسید نقش مهمی در بروز بیماری‌هایی مانند دیابت، بیماری مزمن کبدی، سرطان و اختلالات قلبی و عروقی ایفا می‌کند[2]. همچنین اکسایش لیپیدها از مهم‌ترین نگرانی‌های صنعت مواد غذایی است، چراکه منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب، رنگ تیره و ترکیبات سمی در مواد غذایی می‌شود. به دلیل نگرانی‌هایی که در مورد ایمنی بلندمدت ضداکسایندهای سنتزی مانند هیدروکسی‌انیسول بوتیله‌شده (BHA) و دی‌بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) وجود دارد، تقاضا به سمت ضداکسایندهای طبیعی افزایش پیدا کرده است[3]. مطالعات علمی متعددی نشان می‌دهند که بسیاری از پروتئین‌های آبکافت‌شده و پپتیدهای حاصل از منابع مختلف دریایی شامل ماهی‌ها، نرم‌تنان و ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان یا محصولات جانبی آنها نیز توانایی ضداکسایشی بالایی دارند[4].

آبکافت پروتئین، فناوری سودمندی برای تولید فرآورده‌های با ارزش افزوده بالا از مواد خام کم‌ارزش مانند ماهی‌های کم‌مصرف و ضایعات آبزیان است. از مهم‌ترین عملکردهای این محصولات آبکافتی که حاوی پپتیدهای زیست‌فعال هستند می‌توان به فعالیت‌های ضداکسایشی، ضدمیکروبی، ضدسرطان، ضددیابتی، مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین I اشاره کرد[5]. وزن مولکولی پروتئین آبکافت‌شده یکی از مهم‌ترین عوامل در تولید آبکافته پروتئین با خواص عملکردی و بیولوژیکی مورد نظر است[6]. به‌منظور جداسازی و شناسایی آبکافته‌ها با بیشترین خواص زیستی روش‌های مختلفی به کار رفته است. در رابطه با مخلوط پیچیده‌ای از پروتئین‌ها و پپتیدها مشکل اصلی جداسازی، پپتیدهایی با اندازه و خواص فیزیکوشیمیایی متفاوت است که روند شناسایی توالی آنها را دچار مشکل می‌کند. در تعدادی مطالعات از غشاهای فراپالایش با وزن مولکولی مختلف، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی، طیف‌سنج جرمی و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا برای جداسازی و شناسایی توالی پپتیدهای زیست‌فعال از منابع آبزی استفاده شده است[7]. فرآیند استفاده از غشاهای فراپالایش این مزیت را دارد که می‌توان با استفاده از آن توزیع وزن مولکولی آبکافته‌های مورد نظر را با انتخاب اندازه غشای مناسب کنترل و موجب افزایش خواص عملکردی آن شد. در مطالعه‌ای فرآیند جزءبه‌جزءسازی غشایی منجر به افزایش خواص بیولوژیکی و عملکردی آبکافته پروتئین‌های شیر شد و سپس در مطالعات بعدی به‌تدریج به سمت استفاده از سایر

www.SID.ir

Archive of SID

سوبستراهایی مانند پروتئین‌های سویا، هموگلوبین، گلیادین گندم و آبزیان جهت یافت[8, 9].

ماهی ساردین یک گونه کوچک ماهی دریایی است که در آب‌های ساحلی جنوبی ایران یافت می‌شود. این گونه به‌عنوان گونه غالب ساردین ماهیان در آب‌های شمالی خلیج فارس است[10]. صید این ماهیان در استان هرمزگان پیشینه‌ای طولانی دارد. آمار صید نسبی در این استان نشان می‌دهد که سهم صید سطح زیان‌ریز از صید کل از میزان ۱۰% در سال ۱۳۸۰ به ۲۷% در سال ۱۳۹۰ افزایش یافته است[11]. ساردین عمدتاً برای تولید غذای ماهی استفاده می‌شود. اما به دلیل داشتن منبع غنی از پروتئین می‌تواند در تولید پپتیدهای زیست‌فعال و تبدیل آن به ماده‌ای با ارزش افزوده بالا در فرمولاسیون محصولات غذایی به‌عنوان ضداکساینده و فراسودمند استفاده شود.

بنابراین با توجه به مطالب ارایه‌شده، هدف از پژوهش حاضر تولید آبکافته از ایزوله پروتئین عضله ماهی ساردین سند توسط آنزیم پانکراتین و سپس جزءبه‌جزءسازی پروتئین آبکافت‌شده به بخش‌های مختلف و در نهایت ارزیابی و مقایسه خواص ضداکسایشی و ضددیابتی بخش‌های تفکیک‌شده با پروتئین آبکافت‌شده بود.

مواد و روش‌ها

ماهی ساردین سند با نام علمی *Sardinella sindensis* از دریای عمان صید و به صورت منجمد به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج ایزوله پروتئین در دمای ۸۰°C- در کیسه‌های زیپ‌دار نگهداری شدند. قبل از استفاده، ماهی‌های منجمد در دمای ۴°C انجمادزدایی و بعد از تخلیه شکمی و جداکردن سر، با استفاده از چرخ گوشت کاملاً چرخ شدند و سپس از مواد خام چرخ‌شده، ایزوله پروتئین استخراج شد. به‌منظور آبکافت آنزیمی، آنزیم پانکراتین پانکراس خوکی و همچنین برای بررسی خواص ضددیابتی، آنزیم‌های آلفاآمیلاز پانکراس خوکی (۵واحد بر میلی‌گرم) و آلفاگلوکوزیداز *ساکارومایسس سروزیه* (۱۰واحد بر میلی‌گرم) تهیه شدند (سیگما؛ ایالات متحده).

تهیه پروتئین ایزوله‌شده ماهی: تهیه ایزوله پروتئین به روش حلالیت و ترسیب ایزوالکتریک (ISP) با روش *هولتین* و همکاران انجام شد[14].

آبکافت آنزیمی ایزوله و تعیین درجه هیدرولیز

آبکافت ایزوله مطابق با روش *کلمپانگ* و همکاران انجام شد[13]. تعیین درجه آبکافت به وسیله روش pH-stat، توضیح داده‌شده توسط *آلدر و نیسن*[14] با استفاده از اطلاعات به‌دست‌آمده با pHمتر با مدل ۷۱۸ انجام شد. برای ثابت نگه‌داشتن pH در محدوه ۸، سود دو نرمال استفاده و درصد درجه آبکافت (DH%) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$DH\% = \frac{B \times N_b}{M_P} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

B: مقدار سود مصرفی بر حسب میلی‌لیتر، N_b: نرمالیته سود، α: نشان‌دهنده متوسط درجه تفکیک گروه‌های α-NH_2 که α برای آنزیم آلکالاز با اتخاذ درجه حرارت ۵۰°C برای هیدرولیز برابر ۰/۸۷ محاسبه شد. M_P: وزن پروتئین هیدرولیزشده (گرم)، h_{tot}: تعداد کل پیوندهای پپتیدی در سوبسترای پروتئینی بر حسب میلی‌اکی‌والان بر گرم پروتئین (meqv g^{-1} protein) که h_{tot} برای کنسانتره پروتئین ماهی ۸/۶میلی‌اکی‌والان به ازای گرم پروتئین است.

جزءبه‌جزءسازی آبکافته: آبکافته ایزوله پروتئین (FPH) تیمارشده با آنزیم پانکراتین توسط غشای فراپالایش با اندازه غشای ۲ و ۱۰کیلودالتون با پمپ Master flex-L/S (Coleman-Palmer؛ ایالات متحده) به سه بخش زیر تقسیم شدند: بخش تفکیک شده آبکافته با وزن مولکولی کمتر از ۲کیلودالتون (FPH-I)، بخش تفکیک شده آبکافته با وزن مولکولی بین ۱۰-۲کیلودالتون (FPH-II) و بخش تفکیک‌شده آبکافته با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰کیلودالتون (FPH-III). سپس تمامی زیربخش‌ها توسط خشک‌کن انجمادی Christ مدل Alpha 1-2 LD plus (Christ؛ آلمان) خشک و برای ادامه کار در دمای ۲۰°C- نگهداری شدند.

ارزیابی خواص ضداکسایشی و ضددیابتی آبکافته

فعالیت به دام‌اندازی رادیکال DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، طبق روش *نانجو* و همکاران[15] با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا از نمونه‌های پودرشده آبکافته و زیربخش‌های آن، محلولی با غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. ۵۰۰میکرولیتر از محلول نمونه‌ها با ۵۰۰میکرولیتر از محلول اتانولی رادیکال DPPH (۰/۱میلی‌مولار) مخلوط و به مدت ۳۰دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها توسط طیف‌سنج نوری Carry 60 UV-Vis (Agilent؛ ایالات متحده) در ۵۱۷نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از معادله منحنی کالیبراسیون ترولکس زیر محاسبه شد:

$Y = -0/0128X + 0/6991$

Y= جذب نمونه در طول موج ۵۱۷نانومتر

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن II (Fe^{+2})

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن II با استفاده از روش *دکر و وایچ*[16] با کمی تغییرات ارزیابی شد. ابتدا محلولی با غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه‌های پودرشده آبکافته و زیربخش‌های آن، ۲میلی‌مولار از کلریدآهن II و ۵میلی‌مولار از فروزین تهیه شد. سپس ۵۰۰میکرولیتر از نمونه به ۱۸۵۰میکرولیتر آب اضافه و به آن ۵۰میکرولیتر از محلول کلریدآهن II افزوده شد. پس از گذشت ۳دقیقه در تاریکی، ۱۰۰میکرولیتر محلول فروزین به آن افزوده و به مدت ۲۰دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۶۲نانومتر خوانده شد. EDTA به‌عنوان کنترل مثبت استفاده و فعالیت شلاته‌کنندگی از طریق معادله منحنی کالیبراسیون EDTA زیر محاسبه شد:

www.SID.ir

Archive of SID

Y= -۰/۰۱۲۸X+۱/۰۲۱۶

جذب نمونه در طول موج ۵۶۲نانومتر =Y

فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS

به‌منظور ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS از روش *تتسریموانگ* و همکاران[17] استفاده شد. ابتدا ۲۰میکرولیتر از نمونه به ۹۸۰میکرولیتر محلول ABTS اضافه و پس از گذشت ۱۰دقیقه در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS با استفاده از معادله منحنی کالیبراسیون ترولکس زیر محاسبه شد:

Y= -۰/۰۰۱۹X+۰/۷۰۹۴

جذب نمونه در طول موج ۷۳۴نانومتر =Y

سنجش فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز

بررسی فعالیت بازدارندگی نمونه‌ها نسبت به آنزیم آلفاگلوکوزیداز براساس روش *کیم* و همکاران انجام شد[18]. میزان ۲۵۰میکرولیتر از نمونه با ۱۵۰میکرولیتر از آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمر *ساکارومایسس سروزیه* (۰/۲واحد در هر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و به مدت ۵دقیقه در دمای ۲۵°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰میکرولیتر از محلول ۴- نیتروفنیل‌آلفادی‌گلوکوپیرانوزید (PNPG) به مخلوط واکنش اضافه و جذب نمونه واکنش در ۴۱۰نانومتر قرائت شد. میزان بازدارندگی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی آلفاگلوکوزیداز} = \frac{\text{شیب خط نمونه} - \text{شیب خط کنترل}}{\text{شیب خط کنترل}} \times ۱۰۰$$

سنجش فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز

بررسی فعالیت بازدارندگی نمونه‌ها نسبت به آنزیم آلفاآمیلاز براساس روش *مک‌دوگال* و همکاران انجام شد[19]. به این منظور ۱۰۰میکرولیتر از نمونه حل‌شده در بافر فسفات (۰/۲مول بر لیتر حاوی ۰/۰۶۹مول بر لیتر سدیم‌کلرید و با pH=۶/۸) به ۱۰۰میکرولیتر آنزیم آلفاآمیلاز پانکراس خوکی (فعالیت ۰/۵واحد بر میلی‌لیتر) اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۷°C به مدت ۵دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس در حدود ۱۰۰میکرولیتر محلول نشاسته (۰/۵گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر بافر فسفات) اضافه و دوباره محلول در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰دقیقه در حمام آب نگهداری شد. سپس با استفاده از حمام آب گرم در ۱۰۰°C به مدت ۱۰دقیقه آنزیم غیرفعال و بعد به مدت ۲دقیقه در ۱۳۰۰۰دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا نشاسته نامحلول رسوب کند. پس از آن ۲۰میکرولیتر از محلول رویی نمونه‌ها با ۱میلی‌لیتر از محلول رنگی به مدت ۱۰دقیقه در ۷۰°C نگهداری شد و سپس جذب آن در طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۱۰نانومتر خوانده شد. میزان بازدارندگی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی آلفاآمیلاز} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب پیش زمینه}) - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times ۱۰۰$$

جذب نمونه شامل نمونه، نشاسته و آنزیم؛ جذب پیش‌زمینه شامل نمونه، نشاسته و بافر و جذب کنترل شامل بافر، نشاسته و آنزیم است.

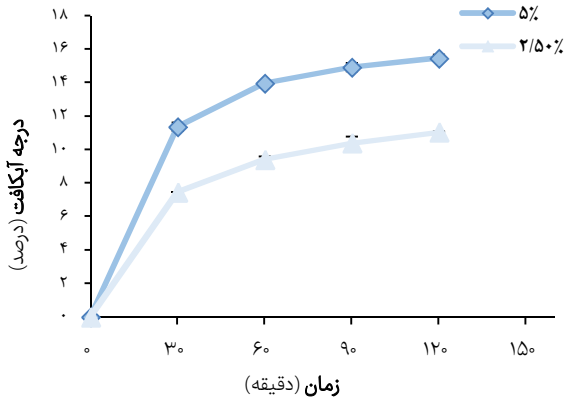
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (آنووا) با استفاده از نرم‌افزار JMP 10 در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور بررسی اختلاف میانگین در صورت معنی‌داربودن اثر فاکتورها ($p<۰/۰۵$) از آزمون توکی استفاده شد. رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد. تمامی نتایج به صورت میانگین آماری در سه تکرار بیان شد.

یافته‌ها

درجه آبکافت

درجه آبکافت با افزایش مدت زمان افزایش یافت، اما بعد از ۶۰دقیقه اول با افزایش مدت زمان از شدت و سرعت آبکافت کاسته شد. تغییرات درجه آبکافت بین زمان ۳۰ تا ۶۰دقیقه معنی‌دار ($p<۰/۰۵$) بود، اما بین زمان‌های ۱۲۰-۶۰دقیقه معنی‌دار نبود. همچنین نتایج نشان داد که تغییر غلظت آنزیم پانکراتین (نسبت آنزیم/سوبسترا) از ۲/۵ تا ۵% به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درجه آبکافت شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) روند تغییرات درجات آبکافت آنزیم پانکراتین در دو نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵% در زمان‌های مختلف

خواص ضداکسایشی

برای ارزیابی خواص ضداکسایشی نمونه‌ها، ابتدا پیش‌آزمایشی از غلظت‌های مختلف نمونه‌ها در مهار رادیکال DPPH، رادیکال $ABTS^{+}$ و شلاته‌کنندگی یون آهن انجام شد. نتایج نشان داد که آزمون‌های ضداکسایشی نمونه‌ها وابسته به غلظت هستند و با افزایش غلظت نمونه‌ها خواص ضداکسایشی آنها نیز افزایش یافت. در ادامه برای مقایسه خواص ضداکسایشی نمونه‌ها با یکدیگر، یک غلظت (۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان غلظت پایه انتخاب شد. در جدول ۱ نتایج آزمون‌های ضداکسایشی نمونه‌ها آورده شده است. نتایج نشان داد که بخش FPH-III در هر دو سطح ۲/۵ و ۵%،

www.SID.ir

Archive of SID

بیشترین توانایی را دارد. FPH-I کمترین توانایی را در مهار رادیکال DPPH داشت و تغییر غلظت آنزیم پانکراتین تفاوت معنی‌داری در مهار این رادیکال نداشت (p>۰/۰۵). همچنین طبق نتایج تفاوت معنی‌داری بین بخش‌های تفکیک‌شده با آبکافته در شلاته‌کنندگی یون آهن وجود نداشت (p>۰/۰۵) و تغییر غلظت آنزیم باعث افزایش معنی‌داری در شلاته‌کنندگی یون آهن نمونه‌ها داشت (p<۰/۰۵). همچنین FPH-I در هر دو سطح دارای بیشترین توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS بود.

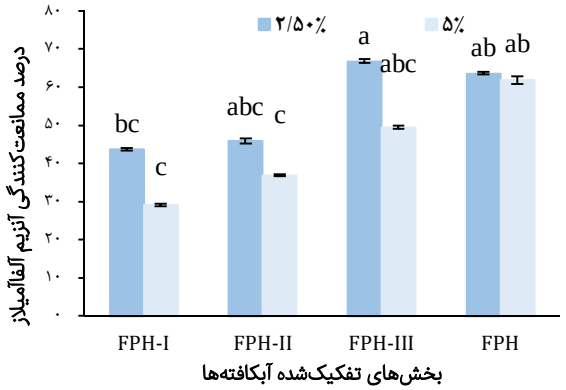
جدول ۱) نتایج فعالیت ضداکسایشی نمونه‌های آبکافته ایزوله پروتئین در غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

نسبت آنزیم/سوبسترا	بخش تفکیک‌شده آبکافته	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (میکروگرم ترولکس/گرم ماده خشک)	فعالیت کی‌لیت‌کنندگی فلز (میکروگرم EDTA/گرم ماده خشک)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS (میکروگرم ترولکس/گرم ماده خشک)
%۲/۵	FPH-I	۵/۰۲±۰/۲۰^{d}	۱۰/۴۲±۰/۰۳^{b}	۲۴۲±۰/۷۳^{a}
	FPH-II	۵/۵۹±۰/۰۱^{bcd}	۸/۲۱±۰/۰۶^{d}	۲۰۸/۹۶±۱/۶۴^{d}
	FPH-III	۶/۳۹±۰/۱۴^{ab}	۸/۷۴±۰/۰۶^{d}	۱۹۳/۹۲±۲/۷۱^{e}
	FPH	۶/۱۶±۰/۲۰^{abc}	۹/۹۵±۰/۱۷^{bc}	۲۳۲/۲۴±۱/۰۷^{b}
%۵	FPH-I	۵/۲۳±۰/۲۰^{cd}	۱۳/۳۷±۰/۲۲^{a}	۲۴۳/۷۲±۲/۶۵^{a}
	FPH-II	۵/۴۲±۰/۰۶^{bcd}	۹/۵۰±۰/۱۳^{c}	۲۲۰/۹۲±۱/۹۲^{c}
	FPH-III	۷/۱۳±۰/۵۲^{a}	۱۳/۴۳±۰/۳۰^{a}	۱۷۶/۱۲±۰/۰۵^{f}
	FPH	۶/۶۱±۰/۲۶^{a}	۱۳/۸۵±۰/۱۷^{a}	۲۲۶/۱۴±۱/۷۸^{bc}

*حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها است (p<۰/۰۵).

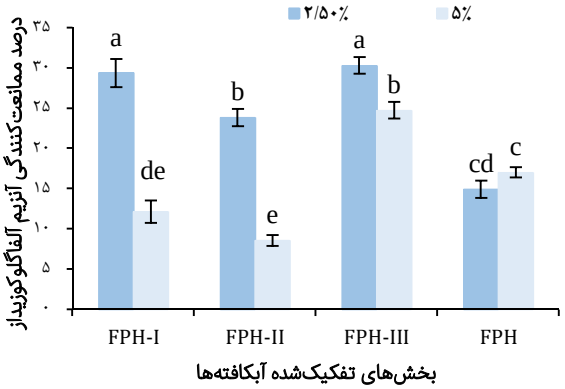
خواص ضددیابتی

برای بررسی خواص بازدارندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز ابتدا پیش‌آزمایشی از غلظت‌های مختلف نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌ها در غلظت‌های کمتر از ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عملکرد ضعیفی در بازدارندگی این آنزیم‌ها داشتند و در غلظت‌های بالا نیز کدورت مانع از انجام آزمایش شد. بنابراین در ادامه به‌منظور مقایسه خواص ضددیابتی نمونه‌ها با یکدیگر از غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج آزمون‌های بازدارندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها نشان داد که غلظت کمتر آنزیم پانکراتین یعنی ۲/۵% نسبت به ۵% فعالیت بازدارندگی بالاتری دارد. در نمودار ۲ درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاآمیلاز نمونه‌ها در دو غلظت آورده شده است. همچنین FPH-III در سطح ۲/۵% با ۶۶% ممانعت‌کنندگی، بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز را داشت. FPH-I در سطح ۵% نیز با ۲۹% ممانعت‌کنندگی، دارای کمترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز بود.



نمودار ۲) درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاآمیلاز نمونه‌ها در غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵%؛ حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح ۹۵% است.

نتایج بازدارندگی نمونه‌ها در هر دو غلظت بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز عملکرد ضعیف و فعالیت آنها کمتر از ۵۰% بود. در بین تمام نمونه‌ها، FPH-III در سطح ۲/۵% با ۳۰% ممانعت‌کنندگی، بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز را دارا بود (نمودار ۳).



نمودار ۳) درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها در غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵%؛ حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح ۹۵% است.

بحث

طبق نتایج، کاهش شدت آبکافت بعد از ۶۰دقیقه اول با افزایش زمان آبکافت، کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و همچنین کاهش میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم را به دنبال داشت. از طرفی شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت‌کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد[20].

تغییر در اندازه، ساختار، توالی اسیدآمینه‌ها و پپتیدها در اثر گذشت زمان آبکافت، فعالیت ضداکسایشی را تحت تاثیر قرار می‌دهد[21].

www.SID.ir

Archive of SID

ساز و کار عمل پپتیدها به‌عنوان ضداکسایندە به‌طور واضح مشخص نیست، اما اسیدآمینه‌هایی مانند هیستیدین، سیستئین، والین، پرولین، فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان نقش مهمی در فعالیت ضداکسایشی پپتیدها و پروتئین آبکافته‌شده ماهی دارند[22]. وجود اسیدآمینه‌های آب‌گریز در پپتیدها و پروتئین آبکافت‌شده، انحلال آنها در چربی را افزایش داده و دسترسی آنها را به رادیکال‌های آب‌گریز افزایش می‌دهد و بنابراین باعث افزایش فعالیت ضداکسایشی می‌شود[23]. انتخاب آنزیم پروتئولتیک مناسب عامل بسیار مهمی برای رهاسازی پپتیدهای ضداکسایشی از پروتئین ماهی است. آنزیم‌هایی مانند آلکالاز، آلفاکیموتریپسین، پروتامکس و تریپسین به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید پپتیدهای ضداکسایشی از منابع پروتئینی ماهی بررسی شده‌اند[21, 22, 24]. در کنار انتخاب آنزیم مناسب، شرایط فیزیکی و شیمیایی مانند دما و pH بهینه برای عملکرد مناسب آنزیم و همچنین مدت زمان آبکافت از عوامل موثر در تولید پروتئین آبکافت‌شده با فعالیت ضداکسایشی بالا هستند[25].

طبق نتایج حاضر، در آزمون بازدارندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن II، بیشترین فعالیت ضداکسایشی مربوط به بخش FPH-III بود که با آبکافته (FPH) تفاوت معنی‌داری نداشت (p>۰/۰۵). در حالی که در آزمون بازدارندگی ABTS بیشترین فعالیت ضداکسایشی مربوط به بخش FPH-I بود که با آبکافته تفاوت معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). *جون* و همکاران در مطالعه‌ای که بهبود خواص عملکردی آبکافته پروتئین فریم ماهی کاد را با استفاده از غشاهای فراپالایش مورد بررسی قرار دادند، گزارش کردند که از لحاظ خواص عملکردی آبکافته‌های تفکیک‌شده بهتر از آبکافته بود و بخش تفکیک‌شده آبکافته با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰کیلودالتون فعالیت ضداکسایشی بالاتری را از خود نشان داد[6]. همچنین در پژوهش حاضر با افزایش غلظت آنزیم پانکراتین از ۲/۵ تا ۵% درجه آبکافت و به دنبال آن خصوصیات ضداکسایشی آبکافته نیز افزایش یافتند. این نتایج مشابه نتایج پژوهش *نالینانون* و همکاران است که آنها به افزایش خاصیت ضداکسایشی پروتئین آبکافت‌شده با افزایش درجه آبکافت اشاره کرده‌اند[26]. در مقابل *کلومپونگ* و همکاران اختلاف معنی‌داری در فعالیت ضداکسایشی پروتئین آبکافت‌شده با درجه‌های آبکافت ۵ تا ۲۵% مشاهده نکردند[13]. اختلاف در گزارش‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در ماده اولیه، نوع آنزیم پروتئاز و شرایط آبکافت باشد که موجب تولید پپتیدهایی با ساختار و عملکرد متفاوت می‌شود.

گان و همکاران گزارش کردند که آبکافته‌های پروتئین ماهی حلوای زرد باله تیمارشده با پپسین، در پایین‌ترین درجه آبکافت (۲۲%) نسبت به آنزیم‌های دیگر فعالیت مهارکنندگی DPPH بالاتری داشت. وزن مولکولی ضداکسایندەها از بین بخش‌های تفکیک‌شده ۳۰-۱۰، ۱۰-۵، ۵-۳، ۳-۱ و کمتر از ۱کیلو دالتون، ۱۳کیلودالتون تعیین شد[27]. *ژانگ* و همکاران نیز نشان دادند که آبکافته پروتئین کپور نقره‌ای تیمارشده با آنزیم پپسین بالاترین خاصیت مهار رادیکال DPPH (۶۸/۴% در غلظت ۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به آنزیم‌های دیگر دارد. در ادامه آبکافته حاصل از آنزیم پپسین توسط غشای فراپالایش به بخش‌های بزرگتر از ۱۰کیلودالتون، بین ۱۰-۵، ۵-۳، ۳-۱ و کمتر از ۱کیلودالتون تفکیک شد. همچنین در میان بخش‌های مختلف، بخش تفکیک‌شده کمتر از ۱کیلودالتون خاصیت ضداکسایشی بالاتری (۷۷/۸%) را نشان داد و آبکافته حاصل از آنزیم پپسین، ۵۲% خاصیت مهار رادیکال DPPH داشت[28]. *دانگ* و همکاران گزارش کردند که بین فعالیت شلاته‌کنندگی آبکافته‌های حاصل از آنزیم فلاورزیم و آلکالاز با درجه آبکافت رابطه‌ای خطی وجود دارد. به این معنی که افزایش درجه آبکافت منجر به افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی آبکافته‌ها می‌شود[23]. همچنین در پژوهش *گیم‌نز* و همکاران گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه اسیدی و اسیدهای آمینه بازی در مهار یون آهن II نقش اصلی را ایفا می‌کنند[29].

متسویی و همکاران گزارش کردند که آبکافته عضله ماهی ساردین تیمارشده با پروتئاز قلیایی در ۱۷ساعت آبکافت بالاترین فعالیت بازدارندگی علیه آلفاگلوکوزیداز با IC_{50} برابر ۴۸/۷میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. به گفته آنها آبکافته‌های عضله ساردین که از پروتئازهای مختلف به دست آمدند، فعالیت‌های مهارکنندگی مختلفی روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نشان دادند. این تفاوت در فعالیت مهارکنندگی آبکافته‌ها توسط پروتئازهای مختلف به دلیل تفاوت در اندازه محصول هیدرولیتیک با سوبسترای خاص است. دو پپتید Val-Trp با IC_{50} برابر ۲۲/۶میلی‌مولار و Tyr-Tyr-Pro-Leu با IC_{50} برابر ۳/۷میلی‌مولار از آبکافته عضله ساردین شناسایی شدند که خاصیت بازدارندگی روی آنزیم آلفاگلوکوزیداز داشتند[30].

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که بین وزن مولکولی پپتیدها با فعالیت زیستی آنها ارتباط وجود دارد[31]. استفاده از غشاهای فراپالایش به‌منظور تفکیک آبکافته‌ها، می‌تواند پپتیدهایی که دارای فعالیت زیستی خاصی هستند را در یک محدوده معین وزن مولکولی تغلیظ کند و فعالیت زیستی آبکافته‌های جزءبه‌جزءشده را بهبود بخشد[28]. در پژوهش حاضر نیز با جزءبه‌جزءسازی آبکافته، به دلیل تغلیظ پپتیدهای دارای فعالیت بیشتر در یک بخش، فعالیت ضداکسایشی و ضددیابتی بخش‌های تفکیک‌شده آبکافته نسبت به خود آبکافته اولیه افزایش یافت. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین (در محدوده بین ۱۰-۱کیلودالتون) خاصیت ضداکسایشی بیشتری نسبت به انواع آنها با وزن مولکولی بالا دارند. این اثر با واکنش بهتر رادیکال‌های آزاد فعال با پپتیدهای کوچک مرتبط است[32].

نتیجه‌گیری

استفاده از غشاهای فراپالایش باعث افزایش فعالیت ضداکسایشی و بازدارندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز نسبت به آبکافته شد و FPH-III بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH، $ABTS^{+}$ و بازدارندگی

www.SID.ir

Archive of SID

آنزیم آلفاآمیلاز آبکافته ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند حاصل از آنزیم پانکراتین را داشت.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری مسئولان و کارکنان آزمایشگاه مرکزی و گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان این پژوهش وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهاره فتان (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰%)؛ حسن احمدی گاولیقی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰%)؛ محمدعلی سحری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰%).

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شده است.

منابع

1- Cui-Feng ZH, Guan-Zhi LI, Hong-Bin PE, Zhang F, Yun CH, Yong LI. Effect of marine collagen peptides on markers of metabolic nuclear receptors in type 2 diabetic patients with/without hypertension. Biomed Environ Sci. 2010;23(2):113-20.

2- Patil P, Mandal S, Tomar SK, Anand S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. Eur J Nutr. 2015;54(6):863-80.

3- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. J Agric Food Chem. 2002;50(6):1619-24.

4- Kim SK, editor. Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013.

5- Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. Curr Pharm Des. 2003;9(16):1289-96.

6- Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. Process Biochem. 1999;35(5):471-8.

7- Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. J Funct Foods. 2012;4(1):6-24.

8- Chabeaud A, Vandanjon L, Bourseau P, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guérard F. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. Sep Purif Technol. 2009;66(3):463-71.

9- Saidi S, Deratani A, Belleville MP, Amar RB. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. Food Res Int. 2014;65(Part C):453-61.

10- Abdollahi M, Rezaei M, Jafarpour SA. Gel forming and physico-chemical properties of protein recovered from whole and gutted common kilka (Clupeonella cultriventris). J Fish Sci Technol. 2015;4(3):102-17. [Persian]

11- Van Zaling NP, Owfi F, Ghasemi S, Khorshidian K, Niamaimandi N. Resources of small pelagic in Iranian waters, a review. Rome: Food and Agriculture Organisation; 1993.

12- Hultin HO, Kristinsson HG, Lanier TC, Park JW. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. In: Park JW. Surimi and surimi seafood. 2nd Edition. Didcot: Taylor & Francis; 2005. pp. 107-39.

13- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Hayes KD, Shahidi F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. Int J Food Sci Technol. 2008;43(6):1019-26.

14- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. Essex: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.

15- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radic Biol Med. 1996;21(6):895-902.

16- Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. J Agric Food Chem. 1990;38(3):674-7.

17- Thetsrimuang Ch, Khammuang S, Chiablaem K, Srisomsap Ch, Sarnthima R. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from Lentinus polychrous Lév. Food Chem. 2011;128(3):634-9.

18- Kim KT, Rioux LE, Turgeon SL. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from Fucus vesiculosus and Ascophyllum nodosum. Phytochemistry. 2014;98:27-33.

19- McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α-amylase and α-glucosidase. J Agric Food Chem. 2005;53(7):2760-6.

20- Diniz FM, Martin AM. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (Squalus acanthias) protein. Composition of the hydrolysates. Int J Food Sci Nutr. 1997;48(3):191-200.

21- Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (Scomber austriasicus). Food Res Int. 2003;36(9-10):949-57.

22- Hsu KC, Lu GH, Jao CL. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (Bacillus subtilis). Food Res Int. 2009;42(5-6):647-52.

23- Dong Sh, Zeng M, Wang D, Liu Z, Zhao Y, Yang H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). Food Chem. 2008;107(4):1485-93.

24- Batista I, Ramos C, Coutinho J, Bandarra NM, Nunes ML. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (Aphanopus carbo) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochem. 2010;45(1):18-24.

25- Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a Review. Food Chem. 2012;135(4):3020-38.

26- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. Food Chem. 2011;124(4):1354-62.

27- Gan KH, Heijerman HG, Geus WP, Bakker W, Lamers CB. Comparison of a high lipase pancreatic enzyme extract with a regular pancreatin preparation in adult cystic fibrosis patients. Aliment Pharmacol Ther. 1994;8(6):603-7.

www.SID.ir

Archive of SID

28- Zhong S, Ma Ch, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (Hypophthalmichthys molitrix) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chem. 2011;126(4):1636-42.
29- Giménez B, Alemán A, Montero P, Gómez-Guillén MC. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chem. 2009;114(3):976-83.
30- Matsui T, Oki T, Osajima Y. Isolation and identification of peptidic α-glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolyzate. Zeitschrift für Naturforschung C. 1999;54(3-4):259-63.
31- Saidi S, Deratani A, Belleville MP, Amar RB. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. Food Res Int. 2014;65(Part C):453-61.
32- He R, Girgih AT, Malomo SA, Ju X, Aluko RE. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. J Funct Foods. 2013;5(1):219-27.

www.SID.ir