Archive of SID

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume 8, Issue 3, Summer 2019
Pages: 155-163
Type: Original Research

Effect of Extraction Temperature of Gelatin from the Skin of Cultured Great Sturgeon (*Huso huso*) on Molecular Weight Distribution of Peptides, Amino Acid Composition and Antioxidant Activity of Gelatin Hydrolysates

Gholipour Gomari R.[1] *MSc*, Nikoo M.[*1] *PhD*

[1] Pathobiology & Quality Control Department, Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, Iran

Abstract

Aims: The aim of the present study was to extract gelatin from the skin of farmed great sturgeon at different temperatures, hydrolysis using Alcalase enzyme, and to measure molecular weight distribution of peptides, amino acid composition and antioxidant activity of hydrolysates.

Materials & Methods: After removing pigments and non-collagenous proteins, defatting, and swelling of triple-helix structure, gelatin was extracted at the temperatures of 50, 60, 70, and 80°C for 6h and then hydrolysed using Alcalase (E/S ratio of 1:20w/w) for 3h. Molecular weight distribution of peptides, amino acid composition and antioxidant activity of hydrolysates were determined in different models.

Findings: Degree of hydrolysis (DH) reached its maximum within the first 30min in all samples. The highest DH was in the 80°C. There were no significant differences among hydrolysates with regards to amino acid composition and peptide molecular weight distribution. Hydrolysates produced at the extraction temperature of 60°C showed that the content of small peptides (molecular weight<1kDa) and total amino acids (g/100g) were slightly higher compared to other samples. This could influence antioxidant activity. At higher extraction temperature of gelatin, the efficacy of hydrolysates in preventing the loss in total sulfhydryl groups content was decreased ($p<0.05$) while there was no effect on TBARS and surface hydrophobicity ($p<0.05$).

Conclusion: Extraction temperature of gelatin did not reveal a considerable effect on properties and antioxidant activities of the resulting hydrolysates and gelatin hydrolysates with antioxidant activity and rich in peptides with molecular weight less than 1kDa could be produced at 50°C.

Keywords
Gelatin [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68005780];
Hydrolysates [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/D011492];
Temperature [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68013696];
Antioxidative Peptides [Not in MeSH];
Amino Acid Composition [Not in MeSH]

[*]Corresponding Author
Tel: +98 (44) 33467097
Fax: +98 (44) 33440295
Post Address: Artemia & Aquaculture Research Institute, Urmia University, Shahid Beheshti Street, Urmia, Iran.
Postal Code 5717944514
m.nikoo@urmia.ac.ir

Received: September 14, 2018 Accepted: February 18, 2019 ePublished: September 21, 2019

www.SID.ir

Archive of SID

اثر درجه حرارت استخراج ژلاتین از پوست فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی بر دامنه وزن مولکولی پپتیدها، ترکیب اسیدآمینه و فعالیت ضداکسایشی ژلاتین هیدرولیز

راضیه قلی‌پورگماری MSc

گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

مهدی نیکو* PhD

گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران

چکیده

اهداف: هدف مطالعه حاضر استخراج ژلاتین از پوست فیل‌ماهی پرورشی در درجه حرارت‌های مختلف، سپس آبکافت توسط آنزیم پروتئازی آلکالاز و در نهایت سنجش دامنه وزن مولکولی پپتیدها، ترکیب اسیدآمینه و ارزیابی فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها بوده است.

مواد و روش‌ها: ابتدا ژلاتین از پوست پس از حذف رنگدانه‌ها و پروتئین‌های غیرکلاژنی، چربی‌گیری و بازکردن زنجیره‌های مارپیچ سه‌گانه کلاژن در درجه حرارت‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰°C طی مدت ٦ ساعت استخراج و سپس توسط آلکالاز در نسبت آنزیم به پروتئین ۱ به ۲۰ (وزنی/وزنی) برای مدت ۳ ساعت هیدرولیز شد. دامنه وزن مولکولی پپتیدها، ترکیب اسیدآمینه و فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها در مدل‌های مختلف بررسی شد.

یافته‌ها: درجه آبکافت در تمامی نمونه‌ها طی ۳۰ دقیقه اول به بیشترین میزان خود رسید. بالاترین درجه آبکافت مربوط به استخراج در دمای ۸۰°C بود. اختلاف محسوسی بین نمونه‌های آبکافته ژلاتین از لحاظ ترکیب اسیدآمینه و پروفیل پپتیدی تحت تاثیر دمای استخراج ژلاتین مشاهده نشد. در آبکافته حاصل از استخراج در درجه حرارت ۶۰°C، مقدار پپتیدهای کوچک‌اندازه (با وزن مولکولی کمتر از ۰/۵کیلودالتون) و میزان کل اسیدهای آمینه (گرم در ۱۰۰گرم) نسبت به سایر آبکافته‌ها اندکی بیشتر بود. این امر تا حدی بر فعالیت ضداکسایشی اثر داشت. در دماهای بالاتر استخراج ژلاتین، توانایی آبکافته‌ها در جلوگیری از کاهش گروه‌های سولفیدریل کل کاهش یافت ($p<0/05$) ولی بر TBARS و آب‌گریزی سطح تاثیر نداشت ($p<0/05$).

نتیجه‌گیری: دمای استخراج ژلاتین بر ویژگی‌ها و فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها اثری محسوس نداشت و آبکافته ژلاتین با فعالیت ضداکسایشی و غنی از پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۱کیلودالتون در دمای استخراج ۵۰°C قابل تولید است.

کلیدواژه‌ها: ژلاتین، آبکافته، درجه حرارت، پپتیدهای ضداکسایشی، ترکیب اسیدآمینه

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۶/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۱/۲۹

*نویسنده مسئول: m.nikoo@urmia.ac.ir

مقدمه

فرآورده‌های دریایی منبع مناسبی از پروتئین، اسیدآمینه‌های ضروری و اسیدهای چرب غیراشباع از جمله ایکوزاپنتانوئیک‌اسید و دوکوزاهگزانوئیک‌اسید هستند که اثرات متعدد بر سلامتی انسان دارند. با این وجود، اکسایش چربی و پروتئین علت اصلی کاهش کیفیت، فساد و بوی نامطبوع در فرآورده‌های دریایی است[1]. تغییرات ناشی از اکسایش و واسرشتی در ساختار اسیدهای آمینه منجر به تشکیل ترکیبات کربونیلی در پروتئین‌های میوفیبریل می‌شود که مرتبط با ازدست‌رفتن بافت، افزایش آب آزاد، تغییر نامطلوب در طعم و کاهش ارزش غذایی است[2]. به‌منظور حفظ کیفیت فرآورده‌های غذایی و دریایی ترکیبات سنتزی مختلفی به کار برده می‌شوند. ولی گزارشاتی در رابطه با اثرات سمیت این افزودنی‌ها و از جمله ضداکسایندهای سنتزی در مدل‌های جانوری بررسی‌شده گزارش شده است. بنابراین توجه به کاربرد ترکیبات طبیعی در فرآورده‌های غذایی طی سال‌های اخیر مورد توجه بیشتری قرار گرفته است[3].

از فرآوری آبزیان مقادیر زیادی مواد باقیمانده تحت عنوان ضایعات تولید می‌شود، به‌طوری که در فرآوری صنعتی ممکن است تا ۷۰% تولید را نیز شامل شود[4]. ضایعات آبزیان با دارابودن ۱۰ تا ۲۳% پروتئین با کیفیت بالا، می‌توانند منبع بالقوه‌ای برای استخراج پروتئین به‌منظور تولید آبکافته و پپتیدهای زیست‌فعال باشند[5-7]. این پپتیدها فعالیت‌های زیستی مختلفی از جمله ضداکسایشی، ضدسرطان، ضددیابتی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی و ضدفشار خون از خود نشان داده‌اند[8-9]. مطالعات متعددی نشان دادند که آبکافته/پپتیدهای آبزیان می‌توانند به‌عنوان ترکیبات ضداکسایشی در فرآورده‌های غذایی مورد استفاده قرار گیرند[6, 10]. سازوکار عملکرد ضداکسایشی پپتیدها تا حدی به اندازه آنها بستگی دارد. پپتیدها با اندازه کوچکتر فعالیت بالاتری در کنترل اکسایش چربی نسبت به پپتیدهای بزرگتر نشان دادند. پپتیدهایی با ۲ تا ۱۰ اسیدآمینه فعالیت ضداکسایشی و شلاته‌کنندگی قوی‌تری نسبت به پروتئین یا پلی‌پپتید (۱۰ تا ۵۰ آمینواسید یا بیشتر) دارند. پپتیدهای ضداکسایشی با توانایی کنترل اکسایش چربی می‌توانند به‌عنوان افزودنی طبیعی برای حفظ کیفیت و تازگی فرآورده‌های دریایی از طریق جلوگیری از تندی اکسیداتیو (طعم و بوی نامطبوع) به کار گرفته شوند[10]. پپتیدها و آبکافته‌ها دارای خواصی هستند که می‌توانند واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد را خاتمه دهند و یا از شکل‌گیری آنها جلوگیری کنند. بنابراین ترکیب اسیدهای آمینه و توالی آنها برای فعالیت ضداکسایشی پپتید مهم است. اسیدهای آمینه آب‌گریز و اسیدهای آمینه هیستیدین، متیونین، سیستئین، تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین فعالیت ضداکسایشی پپتیدهای مختلف را افزایش دادند[11].

ژلاتین پروتئین محلول در آب است که از طریق شکستن ساختار مارپیچ سه‌گانه کلاژن تحت تاثیر فرآیند حرارتی تولید می‌شود. درواقع تبدیل کلاژن به ژلاتین محلول، یک فرآیند واسرشتی است که در آن ساختار مارپیچ سه‌گانه کلاژن در اثر تخریب اتصالات عرضی داخل و بین مولکولی شکسته می‌شود[12]. پپتیدهای زیستی و ضداکسایشی مختلفی از آبکافته ژلاتین جداسازی شده‌اند[13-15]. مطالعات پیشین نشان دادند که درجه حرارت استخراج ژلاتین می‌تواند بر کیفیت و ویژگی‌های مختلف آن تاثیر بگذارد[16, 17]. با

www.SID.ir

Archive of SID

این وجود، تاثیر درجه حرارت استخراج ژلاتین بر فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌های حاصل مشخص نیست. هدف این مطالعه، استخراج ژلاتین از پوست فیل‌ماهی پرورشی در درجه حرارت‌های مختلف، بررسی وزن مولکولی پپتیدها و ترکیب اسیدآمینه و فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها بود.

مواد و روش‌ها

تهیه و آماده‌سازی پوست ماهی

پوست فیل‌ماهی (*Huso huso*) پرورشی از مزرعه پرورش ماهی در ساری (آبزی‌پروری ساعی؛ ایران) تهیه و پس از منجمدکردن در دمای ۲۰°C- در مزرعه درون یونولیت قرار داده و به آزمایشگاه فرآوری آبزیان پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری دانشگاه ارومیه منتقل شد. قبل از استخراج ژلاتین، ابتدا باقیمانده گوشت و چربی از پوست به کمک چاقو گرفته و پوست چند بار با آب و یخ شست‌وشو شد تا خونابه و مواد لزج (موکوس) تا حد زیادی کم شوند. سپس توسط قیچی به تکه‌های کوچک با ابعاد تقریبی ۱سانتی‌متری بریده و پس از چند بار شست‌وشو به روش ذکرشده تا زمان استخراج در دمای ۲۰°C- در کیسه‌های زیپ‌دار نگهداری شدند. آنزیم آلکالاز (۲/٤AU/g) از *باسیلوس لیکنی فورمیس* تهیه شد (سیگما؛ ایالات متحده).

استخراج ژلاتین

پوست تمیزشده به نسبت ۱ به ۱۰ (پوست به محلول) با هیدروکسیدسدیم ۰/۱مول برای مدت ۲ ساعت مخلوط و توسط همزن به هم زده شد تا حذف رنگدانه‌ها و پروتئین‌های غیرکلاژنی پوست تا حد ممکن انجام گیرد[16]. این فرآیند ۲ بار دیگر تکرار و نهایتاً شست‌وشو تا رسیدن به pH حدود خنثی یا کمی قلیایی انجام شد. چربی‌زدایی توسط محلول ۱۰% الکل ۱- بوتانول برای مدت ۱۸ ساعت انجام شد. پس از شست‌وشو تا رفع بوی الکل، توسط اسیداستیک ۰/۰۵مول به مدت ۳ ساعت فرآیند تورم‌زایی پوست انجام گرفت. محلول اسیدی نیز هر ۱ ساعت یک‌بار تعویض شد. در تمامی مراحل از یخ برای پایین‌نگه‌داشتن دما استفاده می‌شد. پس از شست‌وشوی پوست‌های تورم‌یافته تا pH حدود خنثی، استخراج ژلاتین در دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰°C به مدت ۶ ساعت انجام گرفت.

آبکافت آنزیمی ژلاتین

آبکافت آنزیمی مطابق با روش *نیکو* و همکاران[13] انجام شد. درجه آبکافت از طریق ثبت مقدار محلول قلیایی (هیدروکسیدسدیم ۱مول) طی زمان واکنش و به روش pH-stat ارایه‌شده توسط *آلدر-نیسن*[18] طبق فرمول زیر محاسبه شد:

$$DH\ (\%)= BN_{\frac{B}{\alpha}} \times h_{tot} \times Mp$$

در این معادله B مقدار محلول قلیایی مصرفی بر حسب میلی‌لیتر، BN نرمالیته محلول قلیایی (۱مول)، Mp وزن پروتئین بر حسب گرم، h_{tot} مقدار کل پپتیدهای موجود برای آبکافت (میلی‌اکی‌والان بر گرم پروتئین) و برای ژلاتین ۱۱/۱میلی‌اکی‌والان بر گرم پروتئین است.

تعیین دامنه وزن مولکولی پپتیدها در آبکافته (SEC-HPLC)

دامنه وزن مولکولی پپتیدها در آبکافته‌ها توسط ستون TSKgel 2500 PWXL (۷/۸×۳۰۰میلی‌متر؛ توسو؛ ژاپن) متصل به دستگاه HPLC Agilent 1100 (Agilent؛ ایالات متحده) به روش *گوآ* و همکاران[19] اندازه‌گیری شد. آلبومین سرم گاوی (وزن مولکولی ٦٦۰۰۰دالتون)، سیتوکروم C (وزن مولکولی ۱۲۳۸٤دالتون)، باسیتراسین (وزن مولکولی ۱٤۲۳دالتون) و گلوتاتیون احیا (وزن مولکولی ۳۰۷دالتون) به‌عنوان استانداردهای وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند.

تعیین ترکیب اسیدآمینه آبکافته‌ها

برای تعیین ترکیب اسیدهای آمینه، ابتدا آبکافته‌ها (۱۰۰ تا ۱۲۰میلی‌گرم) در اسیدکلریدریک ٦مول در درجه حرارت ۱۱۰°C به مدت ۲۲ ساعت آبکافت شدند. از ستون Zorbax 80A C18 (۱۸۰×٤/٦Øمیلی‌متری؛ Agilent؛ ایالات متحده) متصل به دستگاه HPLC Agilent 1100 (Agilent؛ ایالات متحده) برای تعیین اسیدهای آمینه استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال‌های کاتیونی ABTS

فعالیت مهار رادیکال‌های ABTS به روش *نیکو* و همکاران[13] اندازه‌گیری شد. محلول واکنشی از ترکیب ۷/٤میلی‌مول ABTS و ۲/٦میلی‌مول پتاسیم‌پرسولفات به نسبت ۱ به ۱ تهیه و پس از ۱۲ ساعت نگهداری در تاریکی در دمای محیط توسط مقدار مناسب متانول جذب آن به ۱/۱۰۰ در طول موج ۷۳٤ نانومتر رسانده شد. ۱۵۰میکرولیتر از نمونه در غلظت ۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر به ۲۸۵۰میکرولیتر محلول ABTS اضافه و پس از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی، جذب در ۷۳٤نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکال‌های ABTS از طریق فرمول زیر بر حسب درصد تعیین شد:

$$\text{ABTS RSA } (\%)= \frac{Ac-As}{Ac} \times 100$$

فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد هیدروکسیل

فعالیت مهار رادیکال‌های هیدروکسیل به روش *نیکو* و همکاران[13] اندازه‌گیری شد. یک‌میلی‌لیتر محلول ۱/۸۶۵میلی‌مول ۱ و ۱۰-فنانترولین با ۲میلی‌لیتر نمونه مخلوط و سپس یک‌میلی‌لیتر محلول ۱/۸۶۵میلی‌مول سولفات‌آهن اضافه و ورتکس شد. پس از افزودن یک‌میلی‌لیتر محلول ۰/۰۳% پراکسیدهیدروژن و نگهداری نمونه‌ها برای یک ساعت در دمای ۳۷°C، جذب نمونه (As) در ۵۳۶نانومتر خوانده شد. مخلوط واکنشی بدون نمونه پپتیدی به‌عنوان کنترل منفی (An) و مخلوط فاقد پراکسیدهیدروژن به‌عنوان بلانک (Ab) نیز تهیه شدند. توانایی مهار رادیکال‌های هیدروکسیل از طریق فرمول زیر بر حسب درصد تعیین شد:

www.SID.ir

Archive of SID

$$HRSA\ (\%)=\frac{As-An}{Ab-An}\times 100$$

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فلزی

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فلزی به روش *نیکو* و همکاران[13] اندازه‌گیری شد. پس از واکنش ۳۰۰میکرولیتر نمونه با ۳۵/۵میکرولیتر کلریدآهن۲ و نگهداری برای ۳ دقیقه، با ٦٦/۵میکرولیتر محلول ۵میلی‌مول فروزین مخلوط و پس از به‌هم‌زدن طی مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس جذب در ۵٦۲نانومتر خوانده و فعالیت شلاته‌کنندگی از طریق فرمول زیر بر حسب درصد تعیین شد:

$$\text{Metal chelating activity}\ (\%)=\frac{Ac-As}{Ac}\times 100$$

تهیه مدل خمیر ماهی و نگهداری

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) از یک فروشگاه ماهی (ارومیه) خریداری و درون یونولیت به آزمایشگاه منتقل شد. ماهی‌ها شسته و سرزنی شدند و پوست و امعا و احشا آنها جدا شد. فیله‌ها با چرخ گوشت (با قطر سوراخ ۳میلی‌متر) چرخ و پس از ۳ بار شست‌وشو با آب سرد ٤°C، در دور ۷۰۰۰g به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند. آبکافته‌های دمای ۵۰ (BSGH50)، ٦۰ (BSGH60)، ۷۰ (BSGH70) و ۸۰ (BSGH80) در سطح ۸گرم در ۱۰۰گرم خمیر شسته شدند و همچنین ساکاروز+سوربیتول (۸گرم در ۱۰۰گرم خمیر شسته‌شده) نیز اضافه شد. نمونه‌ها در دمای ۱۸°C- منجمد و در معرض ٦ چرخه انجماد- انجمادزدایی شامل ۱۸ ساعت انجماد و ٦ ساعت انجمادزدایی در ٤°C قرار گرفتند[13]. آزمایشات در سیکل‌های صفر، ۳ و ٦ انجام شدند.

اندازه‌گیری ترکیبات واکنشی تیوباربیتوریک‌اسید (TBARS)

ترکیبات ثانویه اکسیداسیون چربی به روش *بواگه* و *آست*[20] اندازه‌گیری شدند. پس از واکنش، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۳۲نانومتر خوانده و نتیجه بر حسب میلی‌گرم مالون در آلدهید بر کیلوگرم بیان شد.

اندازه‌گیری مقدار گروه‌های سولفیدریل کل

سولفیدریل کل به روش *المن*[21] اندازه‌گیری شد. جذب نمونه‌ها با محلول DTNB پس از نگهداری در دمای ٤۰°C (۱۵ دقیقه) در طول موج ٤۱۲نانومتر خوانده شد. مقدار گروه‌های سولفیدریل بر حسب میکرومول در گرم بیان شد.

استخراج اکتومیوزین و اندازه‌گیری آب‌گریزی سطح

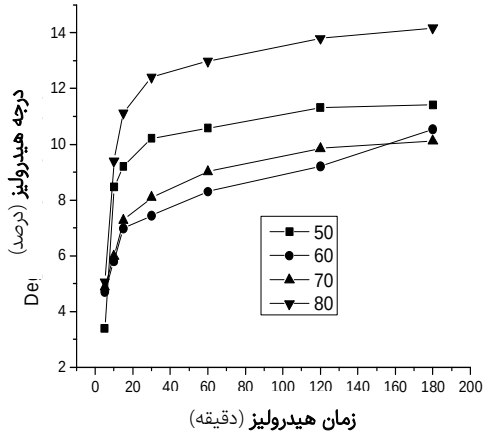
برای سنجش آب‌گریزی سطح ابتدا اکتومیوزین به روش *بنجاکول* و همکاران[22] استخراج و سپس آب‌گریزی سطح به روش *چلهه* و همکاران[23] اندازه‌گیری شد. ۱میلی‌لیتر اکتومیوزین با ۲۰۰میکرولیتر محلول بروموفنول‌بلو به مدت ۱۰ دقیقه به هم زده و سپس در دور ۲هزار در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ٤°C سانتریفیوژ شد. مایع روماند با بافر فسفات به نسبت ۱ به ۱ مخلوط و جذب در ۵۹۵نانومتر خوانده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم‌افزار SPSS 16 برای آنالیز آماری استفاده و معنی‌داری داده‌ها در سطح اطمینان ۹۵% (p<۰/۰۵) با آزمون آنالیز واریانس دوطرفه بررسی و تفاوت میانگین‌ها با آزمون چنددامنه دانکن مشخص شد.

یافته‌ها

درجه آبکافت در تمامی نمونه‌ها طی ۳۰ دقیقه اول به بیشترین میزان خود رسید. سپس با شیب افزایشی ملایمی تا ۳ ساعت ادامه یافت. بالاترین درجه آبکافت مربوط به آبکافته تولیدشده از استخراج ژلاتین در دمای ۸۰°C بود ولی بین سایر آبکافته‌ها تفاوت چندانی مشاهده نشد (نمودار ۱).



نمودار ۱) روند آبکافت ژلاتین پوست فیل‌ماهی حاصل از درجه حرارت متفاوت استخراج با استفاده از آنزیم آلکالاز (۵% آنزیم به پروتئین) برای مدت زمان ۱۸۰ دقیقه

اسیدهای آمینه گلیسین (۲٤/۷۲-۲۱/٦۷%)، پرولین (۷/۰٦-۵/۱۰%)، گلوتامین (۱۱/۰۳-۹/٦۹%)، آلانین (۹/۹۲-۸/۵۹%) و آرژنین (۸/۰۷-٦/٦۹%) بیشترین اسیدآمینه‌ها در آبکافته‌ها بوده‌اند (جدول ۱). افزایش درجه حرارت استخراج ژلاتین سبب کاهش اغلب اسیدهای آمینه چون آسپاراژین، آرژنین، گلیسین، گلوتامین، والین و متیونین به‌خصوص در آبکافته‌ها در دماهای ۷۰ و ۸۰°C شد که البته این کاهش معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). در آبکافته‌های ژلاتین، تیروزین، هیستیدین و متیونین کمترین درصد را شامل شده بودند (جدول ۱).

کروماتوگرام دامنه وزن مولکولی پپتیدها و درصد هر یک از اجزای پپتیدی با اوزان مولکولی مختلف در آبکافته‌های مختلف ژلاتین تعیین شد(نمودار ۲؛ جدول ۲). طبق آنالیز SEC-HPLC، در آبکافته دمای ٦۰°C، درصد دی‌پپتیدها و تری‌پپتیدها (با وزن مولکولی کمتر از ۰/۵کیلودالتون) به میزان ۰/۸۵ تا ۲/۰۱% بیشتر از سایر نمونه‌ها بود که البته این تفاوت معنی‌دار نبود (p>۰/۰۵). پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر از ۳۰۰۰دالتون کمتر از ۰/۳% کل پپتیدها را شامل شده بودند. پپتیدهای با وزن مولکولی بیشتر از ۱کیلودالتون بین

www.SID.ir

Archive of SID

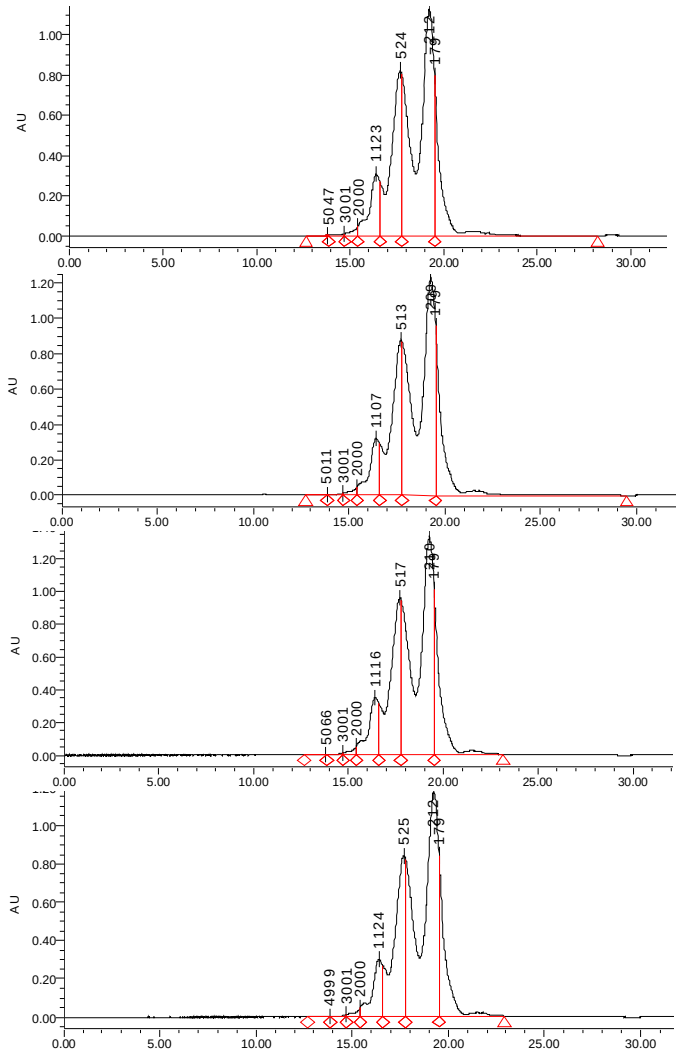
۸/۸۸ تا ۹/۵۹% کل اجزای پپتیدی در آبکافته‌ها بوده و کمترین میزان مربوط به آبکافته دمای ۶۰°C استخراج ژلاتین بود (نمودار ۲؛ جدول ۲).

فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها تحت تاثیر دمای استخراج ژلاتین قرار گرفت. به‌طوری که با افزایش دمای استخراج، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد کمتر بود ($p<0/05$). تفاوتی در فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌های دمای ۵۰ و ۸۰°C در مهار رادیکال‌های ABTS مشاهده نشد ($p>0/05$). ولی در آبکافته دمای ۶۰°C استخراج ژلاتین، فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS، هیدروکسیل و توانایی شلاته‌کنندگی بالاتر از سایر نمونه‌ها بود (جدول ۳؛ $p<0/05$).

اثر آبکافته‌های مختلف بر تشکیل TBARS، گروه‌های سولفیدریل کل و آب‌گریزی سطح خمیر کپور معمولی پس از ۳ و ۶ سیکل انجماد- انجمادزدایی ارزیابی شد. در دماهای بالاتر استخراج ژلاتین، توانایی آبکافته‌ها در جلوگیری از کاهش گروه‌های سولفیدریل کل در هر دو سیکل ۳ و ۶ کاهش نشان داد ($p<0/05$)، ولی بر TBARS و آب‌گریزی سطح تاثیر نداشت (جدول ٤؛ نمودار ۳؛ $p<0/05$).

جدول ۱) ترکیب اسیدهای آمینه (گرم در ۱۰۰گرم) آبکافته ژلاتین حاصل از درجه حرارت‌های متفاوت استخراج

اسیدهای آمینه	دمای استخراج (°C)			
	۵۰	٦۰	۷۰	۸۰
آسپاراژین (Asp)	٦/۱۲	٦/۲۳	۵/۸٤	۵/۵۰
گلوتامین (Glu)	۱۰/۸۷	۱۱/۰۳	۱۰/۳٤	۹/۹٦
سرین (Ser)	۳/۲۲	۳/٦۷	۳/٤۱	۳/٤۱
هیستیدین (His)	۰/۹۱	۰/۹٦	۰/۸۹	۰/۷۹
گلیسین (Gly)	۲٤/۰۱	۲٤/۷۲	۲۳/۱۳	۲۱/٦۷
ترئونین (Thr)	۲/۳۳	۲/٤۱	۲/۲۸	۲/۱۳
آرژنین (Arg)	۷/٦٦	۸/۰۷	۷/٦٤	٦/٦۹
آلانین (Ala)	۹/۸٤	۹/۹۲	۹/۲۳	۸/۵۹
تیروزین (Asp)	۰/۵۰	۰/۵۳	۰/٤۳	۰/۳۳
سیستئین (Cys)	۲/۰۰	۲/۰٤	۲/۰۲	۱/۷۳
والین (Val)	۲/۷۰	۲/۸۲	۲/٦٤	۲/۵۰
متیونین (Met)	۱/۱۱	۱/۲٦	۱/۰۵	۰/۸۹
فنیل‌آلانین (Phe)	۲/۰۳	۲/۱۷	۲	۱/۸۷
ایزولوسین (Ile)	۱/۳۵	۱/٤٤	۱/۳٤	۱/۲٦
لوسین (Leu)	۲/۱۰	۲/۱۲	۱/۹۹	۱/۸۷
لیزین (Lys)	۳/۵۵	۳/٦۳	۳/٤۵	۳/۲۷
پرولین (Pro)	٦/۹۸	۷/۰٦	۵/۱	٦/۹۲



نمودار ۲) کروماتوگرام دامنه وزن مولکولی پپتیدها (دالتون) توسط SEC-HPLC در آبکافته ژلاتین استخراج‌شده در دماهای الف) ۵۰، ب) ٦۰، ج) ۷۰ و د) ۸۰°C

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۲) درصد هر یک از اجزای پپتیدی با اوزان مولکولی مختلف در آبکافته‌های ژلاتین پوست

دامنه وزن مولکولی پپتیدها (کیلودالتون)	دمای استخراج (°C)			
	۵۰	۶۰	۷۰	۸۰
۰/۰۵>	۶۵/۶۹	۶۷/۷	۶۶/۸۵	۶۶/۱۵
۰/۰۵-۱	۲۴/۷۱	۲۳/۴۳	۲۴/۰۳	۲۴/۸۱
۱<	۹/۵۹	۸/۸۸	۹/۱۱	۹/۰۴

جدول ۳) نتایج فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌های ژلاتین در غلظت ۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر

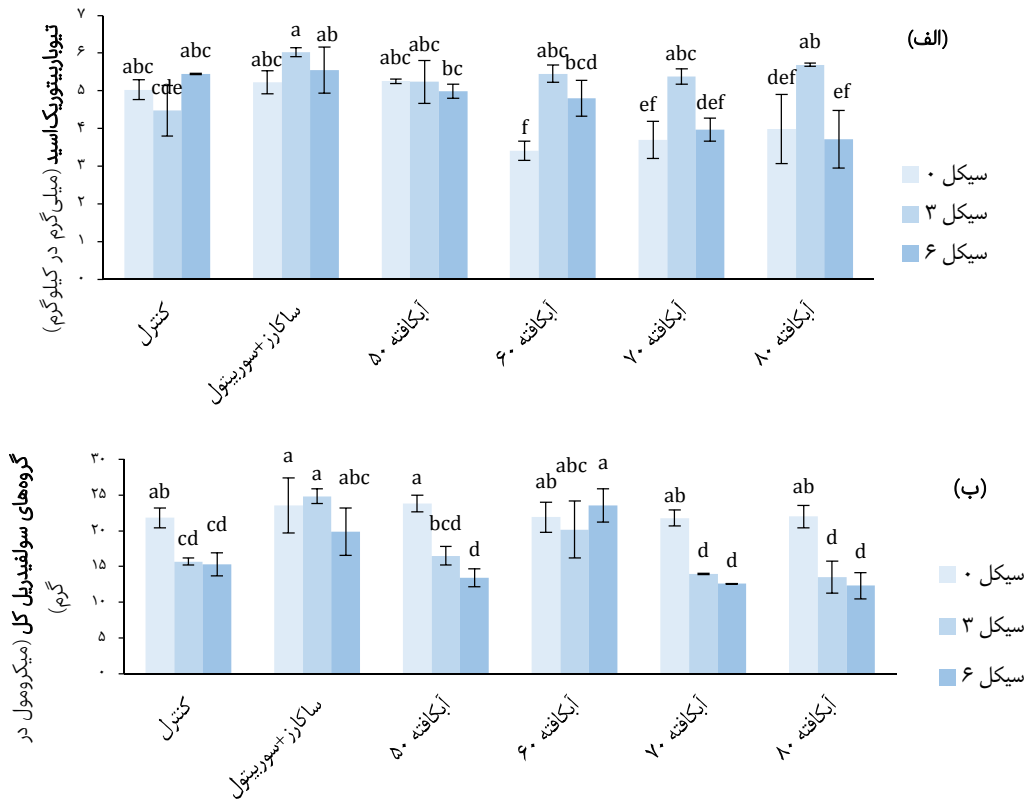
دمای استخراج (°C)	فعالیت مهار رادیکال کاتیون ABTS (درصد)	فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل (درصد)	فعالیت شلاته‌کنندگی یون فلزی (درصد)
۵۰	۵۸/۱۲±۰/۹^{b}	۶۶/۳۶±۰/۴۴^{b}	۷۶/۱۲±۲۰/۰۰^{a}
۶۰	۶۳/۱۵±۰/۶۵^{ab}	۷۴/۲۰±۰/۵۴^{ab}	۸۰/۰۵±۰/۱۱^{a}
۷۰	۵۴/۱۳±۲/۱۷^{b}	۷۱/۱۵±۰/۲۵^{ab}	۷۸/۲۰±۱/۱۴^{a}
۸۰	۵۶/۷۸±۱/۰۲^{b}	۵۸/۱۸±۰/۱۰^{b}	۷۰/۳۵±۰/۷۸^{b}

حروف ذکرشده در انتهای اعداد نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های بین ستون‌ها و ردیف‌های مختلف هستند.

جدول ٤) نتایج آب‌گریزی سطح عضله کپور معمولی حاوی ۸گرم در ۱۰۰گرم آبکافته و ساکارز+سوربیتول پس از ۳ و ۶ سیکل انجماد- انجمادزدایی

نمونه	چرخه انجماد و انجمادزدایی		
	صفر	۳	٦
کنترل	۰/۳٦±۰/۰۱^{c}	۰/٦٤±۰/۰۵^{a}	۰/۵۱±۰/۰۹^{b}
ساکارز- سوربیتول	۰/۲٦±۰/۰۱^{de}	۰/٤۱±۰/۰۱^{c}	۰/۱۷±۰/۰۲^{ef}
ژلاتین هیدرولیز- ۵۰	۰/۲۵±۰/۰۷^{def}	۰/۱۹±۰/۰۱^{def}	۰/۲۰±۰/۰٤^{def}
ژلاتین هیدرولیز- ٦۰	۰/۱۸±۰/۰۲^{def}	۰/۲۰±۰/۰۲^{def}	۰/۱۸±۰/۰٤^{def}
ژلاتین هیدرولیز- ۷۰	۰/۲۰±۰/۰۵^{def}	۰/۳۵±۰/۰۳^{c}	۰/۲۰±۰/۰۵^{def}
ژلاتین هیدرولیز- ۸۰	۰/۲۷±۰/۰۲^{d}	۰/۳۷±۰/۰۲^{c}	۰/۱٦±۰/۰۱^{f}

حروف ذکرشده در انتهای اعداد نشان‌دهنده تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌های بین ستون‌ها و ردیف‌های مختلف هستند.



نمودار ۳) ترکیبات ثانویه اکسیداسیون (الف) و گروه‌های سولفیدریل کل (ب) عضله کپور معمولی حاوی ۸گرم در ۱۰۰گرم آبکافته و ساکارز+سوربیتول پس از ۳ و ۶ سیکل انجماد- انجمادزدایی

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

درجه هیدرولیز طی ۳۰ دقیقه اول افزایش تندی داشت و سپس به آهستگی ادامه یافت. این امر نشان داد که پروتئین به پپتیدهای با اندازه‌های مختلف شکسته شده است. با این وجود کندشدن آبکافت پس از ۳۰ دقیقه به دلایلی چون کم‌شدن مناطق قابل آبکافت در پروتئین، خودهضمی آنزیم و شکل‌گیری ترکیبات بازدارنده فعالیت آنزیم کند شد[24].

نتیجه آنالیز دامنه وزن مولکولی پپتیدهای آبکافته ژلاتین نشان داد که آبکافته‌ها از گروه‌های مختلف پپتیدی شامل پلی‌پپتیدها، اولیگوپپتیدها، دی‌پپتیدها و تری‌پپتیدها و اسیدهای آمینه آزاد تشکیل یافته‌اند. آبکافته دمای ۵۰°C استخراج ژلاتین، شامل ۰/۹۳% پلی‌پپتید، ۳۳/۳۷% اولیگوپپتید، ۵۲/۲۳% دی‌پپتید و تری‌پپتید و ۱۳/٤٦% اسیدهای آمینه آزاد بوده است. پپتیدهای با ۲ یا ۳ اسیدآمینه بیشترین درصد پپتیدها را در تمامی آبکافته‌ها تشکیل داده بودند. با افزایش درجه حرارت استخراج ژلاتین، دامنه وزن مولکولی پپتیدها تغییرات اندکی نشان داد. در دمای ۶۰°C، پپتیدهای با وزن مولکولی ۰/۵ تا ۱ و بالاتر از ۱کیلودالتون نسبت به سایر آبکافته‌ها کمتر و در عوض درصد پپتیدهای کمتر از ۰/۵کیلودالتون بین ۱ تا ۲% بیشتر بوده است. از سویی دیگر، افزایش بیشتر دمای استخراج ژلاتین منجر به افزایش درصد اسیدهای آمینه نشد. متوسط وزن مولکولی آبکافته‌ها بین ٤۲۷ تا ٤۳۷دالتون بوده است. همچنین متوسط وزن مولکولی پپتیدهای کلاژن آبکافته پوست ماهی آلاسکا پولاک تولیدشده توسط آنزیم تریپسین در حدود ۵۰۰دالتون گزارش شد که با نتایج این مطالعه مطابقت دارد[19]. این نتیجه نشان داد که پس از واکنش ژلاتین با آلکالاز، زنجیره‌های پلی‌پپتید در ژلاتین شکسته و پپتیدهایی با اندازه مختلف تولید شدند. مطالعات پیشین نشان دادند که اندازه پپتیدها یکی از عوامل مهم تاثیرگذار بر فعالیت ضداکسایشی آنها است[7, 10].

عملکرد آبکافته پروتئین که حاوی پپتید است عمدتاً به ترکیب اسیدآمینه آن بستگی دارد[10]. همان‌طور که در جدول ۱ مشخص است آسپاراژین، آرژنین، گلوتامین، گلیسین، آلانین و پرولین عمده‌ترین اسیدهای آمینه در نمونه‌ها بودند. مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه آزاد چهار نمونه آبکافته نشان داد که اختلاف محسوسی بین نمونه‌ها وجود نداشت. افزایش درجه حرارت استخراج ژلاتین سبب کاهش غیرمعنی‌دار آسپاراژین، آرژنین، گلیسین، گلوتامین، والین و متیونین به‌خصوص در آبکافته‌ها در دماهای ۷۰ و ۸۰°C شد. همچنین مقدار کمی اسیدآمینه سیستئین در ترکیب آبکافته‌ها وجود داشت که می‌تواند به‌علت وجود پروتئین‌های غیرکلاژنی به شکل ناخالصی مانند پروتئین‌های استروما باشد[17]. در مطالعه *ناگاراجان* و همکاران[17] با افزایش دمای استخراج ژلاتین از ۵۰ به ۸۰°C، میزان ایمینواسیدها (پرولین و هیدروکسی‌پرولین) در ژلاتین استخراج‌شده از پوست اسکوئید کاهش یافت و این کاهش به‌دلیل کاهش هیدروکسی‌پرولین بوده است ولی تغییری در میزان پرولین مشاهده نشد. در این مطالعه آبکافته دمای ۷۰°C دارای کمترین میزان پرولین بوده است. وجود تیروزین، متیونین، هیستیدین و لیزین به میزان زیادی بر فعالیت ضداکسایشی پپتیدها تاثیر می‌گذارد[10]. وجود تیروزین در ترکیب دی- پپتید تیروزین- لوسین و فنیل‌آلانین- تیروزین آبکافته پروتئین دانه پریلا بر فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد آن موثر بود[25]. میزان اسیدآمینه هیستیدین بین ۰/۸ تا ۱گرم در ۱۰۰گرم بوده است. هیستیدین با یون‌های فلزی پرواکسایشی کمپلکس ایجاد کرده است و از کاهش آهن۳ به فرم ۲ آن که برای القای اکسایش چربی ضروری است، جلوگیری می‌کند[26]. اسیدهای آمینه آسپاراژین و گلوتامین نیز به‌دلیل وجود الکترون‌های اضافی که در زمان واکنش با رادیکال‌های آزاد می‌توانند اهدا شوند، نقش مهمی بر فعالیت ضداکسایشی پپتیدها می‌گذارند[27]. در رابطه با فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها، با افزایش دمای استخراج، فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد کاهش یافت. تفاوتی در فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌های دمای ۵۰ و ۸۰°C در مهار رادیکال‌های ABTS مشاهده نشد، ولی در آبکافته دمای ٦۰°C استخراج ژلاتین، فعالیت مهار رادیکال کاتیونی ABTS، هیدروکسیل و توانایی شلاته‌کنندگی بالاتر از سایر نمونه‌ها بود. در پپتیدهای کوچک اندازه نسبت بار منفی (گروه‌های کربوکسیل) به وزن در مقایسه با پپتیدهای بزرگتر بیشتر است که این امر سبب می‌شود تا به‌طور موثرتری با یون‌های فلزی کمپلکس ایجاد کنند. این حالت سبب کاهش در دسترسی یون‌های فلزی برای واکنش‌های شیمیایی خصوصاً اکسایش چربی می‌شود[6, 10].

مطالعات متعددی نقش حفاظتی آبکافته پروتئین ماهی را در خمیر شسته‌نشده و شسته‌شده (سوریمی) منجمد گوشت ماهی به‌عنوان فرآورده‌های حد واسط شیلاتی نشان دادند[28-30]. در گوشت ماهی در نمونه کنترل در چرخه‌های ۳ و ٦ انجماد- انجمادزدایی میزان TBARS افزایش یافت. کلیه آبکافته‌ها به استثنای آبکافته دمای ۵۰°C توانستند مقدار TBARS را در زمان نگهداری کاهش دهند. *نیکو* و همکاران[13] گزارش کردند که تتراپپتید پرولین- آلانین- گلیسین- تیروزین (۴۰۵/۹۹دالتون) آبکافته ژلاتین پوست تاس‌ماهی آمور قادر به کاهش TBARS در مدل مینس ماهی سی‌باس ژاپنی بود. در رابطه با تغییر گروه‌های سولفیدریل کل در دماهای بالاتر استخراج ژلاتین، توانایی آبکافته‌ها در جلوگیری از کاهش گروه‌های سولفیدریل کاهش یافت. با این حال گروه‌های سولفیدریل کل نمونه حاوی آبکافته دمای ٦۰°C و ساکاروز+سوربیتول تا حد زیادی پس از ٦ سیکل انجماد- انجمادزدایی حفظ شد. کاهش در گروه سولفیدریل به‌دلیل تشکیل پیوند دی‌سولفید از طریق اکسایش گروه سولفیدریل و یا تبادلات گروه‌های دی‌سولفید است[31]. *کارنجان اپراتوم* و *بنجاکول*[32] گزارش کردند که آبکافته ژلاتین یونیکورن لترجکت می‌تواند از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و شلاته‌کردن یون‌های فلزی سبب به‌تعویق‌افتادن واسرشتی پروتئین شود. این نتایج با فعالیت ضداکسایشی بالاتر آبکافته دمای ٦۰°C ژلاتین مطابقت دارد. البته اکسایش چربی و پروتئین الگوی مشابهی از لحاظ درجه حرارت استخراج نشان نداد، به‌طوری که خمیر شسته‌شده حاوی ژلاتین

www.SID.ir

Archive of SID

هیدرولیز دمای ۶۰°C دارای تیوباربیتوریک‌اسید بیشتر و همزمان مقدار گروه‌های سولفیدریل کل آن نیز بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و برعکس نمونه‌های ژلاتین هیدرولیز حاصل از دماهای بالاتر استخراج (۷۰ و ۸۰°C) اکسایش چربی کمتری پس از ۶ سیکل انجماد و انجمادزدایی نشان دادند. آب‌گریزی سطح اکتومیوزین نشان داد که خمیر حاوی آبکافته‌ها پس از سیکل ٦ انجماد- انجمادزدایی کمترین مقدار آب‌گریزی سطح را نشان داده است و بیشترین مقدار آب‌گریزی سطح در نمونه کنترل مشاهده شد. در اکتومیوزین سوریمی سیم دم‌نخی نیز آب‌گریزی سطح با افزایش سیکل انجماد و انجمادزدایی افزایش نشان داد و در سوریمی بدون ژلاتین هیدرولیز آب‌گریزی سطح بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و ژلاتین هیدرولیز با درجه هیدرولیز ۱۰% توانایی بالاتری برای جلوگیری از واسرشتی اکتومیوزین داشت[16]. آبکافته‌های ژلاتین با ویژگی آب‌دوستی بالای خود احتمالاً با اکتومیوزین از طریق برهم‌کنش آب‌دوستی-آب‌دوستی واکنش دهند. درنتیجه ناحیه آب‌دوست اکتومیوزین بیشتر در معرض قرار می‌گیرد و آب‌گریزی سطحی کاهش می‌یابد[22]. تشکیل کریستال‌های یخ و افزایش قدرت یونی در زمان انجماد- انجمادزدایی ناشی از واسرشت میوزین و اختلال در اکتومیوزین است[28].

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، از پوست فیل‌ماهی پرورشی ژلاتین استخراج شد. اختلاف محسوسی بین نمونه‌های آبکافته ژلاتین از لحاظ ترکیب اسیدآمینه و پروفیل پپتیدی تحت تاثیر دمای استخراج ژلاتین مشاهده نشد. در درجه حرارت ۶۰°C استخراج ژلاتین، مقدار پپتیدهای کوچک‌اندازه (کمتر از ۰/۵کیلودالتون) اندکی بیشتر بود و میزان اسیدآمینه بیشتری در ترکیب اسیدآمینه مشاهده شد. این امر تا حدی بر فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد نیز اثر داشت. در رابطه با مدل بررسی‌شده، اکسایش چربی و پروتئین الگوی یکسانی از لحاظ درجه حرارت استخراج نشان ندادند، به‌طوری که خمیر شسته‌شده حاوی ژلاتین هیدرولیز دمای ۶۰°C دارای تیوباربیتوریک‌اسید بیشتر و همزمان مقدار گروه‌های سولفیدریل کل آن نیز بیشتر از سایر نمونه‌ها بود و برعکس نمونه‌های ژلاتین هیدرولیز حاصل از دماهای بالاتر استخراج (۷۰ و ۸۰°C) اکسایش چربی کمتری پس از ۶ سیکل انجماد و انجمادزدایی نشان دادند. بنابراین به نظر می‌رسد دمای استخراج ژلاتین بر ویژگی‌ها و فعالیت ضداکسایشی آبکافته‌ها اثری نداشته است و از این لحاظ در دامنه دمایی بررسی‌شده قابل استخراج باشد. ولی با درنظرگرفتن انرژی مورد نیاز در درجه حرارت بالاتر استخراج و احتمال اثر دمای بالا بر ویژگی‌های حسی و رنگ ژلاتین، دماهای ۵۰ و ۶۰°C از لحاظ صنعتی به نظر مناسب‌تر است.

تشکر و قدردانی: از پژوهشکده آرتمیا و آبزی‌پروری به‌دلیل پشتیبانی مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافعی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: راضیه قلی‌پورگماری (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۵۰%)؛ مهدی نیکو (نویسنده دوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۵۰%)

منابع مالی: مطالعه حاضر از پشتیبانی مالی دانشگاه ارومیه برخوردار بوده است.

منابع

1- Jacobsen Ch, Undeland I, Storrø I, Rustad T, Hedges N, Medina I. Preventing lipid oxidation in seafood. In: Børresen T, editor. Improving seafood products for the consumer. Cambridge: British Welding Research Association; 2008. pp. 426-60.

2- Estévez M. Protein carbonyls in meat systems: A review. Meat Sci. 2011;89(3):259-79.

3- Shahidi F, Zhong Y. Novel antioxidants in food quality preservation and health promotion. Eur J Lipid Sci Technol. 2010;112(9):930-40.

4- Olsen RL, Toppe J, Karunasagar I. Challenges and realistic opportunities in the use of by-products from processing of fish and shellfish. Trends Food Sci Technol. 2014;36(2):144-51.

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

6- Samaranayaka AG, Li-Chan EC. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. J Funct Foods. 2011;3(4):229-54.

7- Nikoo M, Benjakul S. Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant–cryoprotectant: A review. J Funct Foods. 2015;19:753-64.

8- Kim SK, Wijesekara I. Development and biological activities of marine-derived bioactive peptides: A review. J Funct Foods. 2010;2(1):1-9.

9- Batista I. Biological activities of fish-protein hydrolysates. In: Kim SK, editor. Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Hoboken: Wiley; 2013. pp. 385-406.

10- Aluko RE. Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. In: Shahidi F, editor. Handbook of antioxidants for food preservation. Cambridge: Woodhead Publishing; 2015. pp. 105-40.

11- Mills S, Stanton C, Hill C, Ross RP. New developments and applications of bacteriocins and peptides in foods. Annu Rev Food Sci Technol. 2011;2:299-329.

12- Boran G, Regenstein JM. Fish gelatin. In: Taylor SL. Advances in food and nutrition research. Amsterdam: Elsevier; 2010. pp. 119-43.

13- Nikoo M, Benjakul S, Ehsani A, Li J, Wu F, Yang N, et al. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. J Funct Foods. 2014;7:609-20.

14- Ngo DH, Qian ZJ, Ryu B, Park JW, Kim SK. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. J Funct Foods. 2010;2(2):107-17.

15- Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. J

www.SID.ir

Archive of SID

aquatic foods. Chichester: John Wiley & Sons Ltd; 2014. pp. 237-81.
25- Yang J, Hu L, Cai T, Chen Q, Ma Q, Yang J, et al. Purification and identification of two novel antioxidant peptides from perilla (Perilla frutescens L. Britton) seed protein hydrolysates. PLoS One. 2018;13(7):e0200021.
26- Wang T, Zhao Q, Wang Q. Production and antioxidant properties of marinederived bioactive peptides. In: Kim SK, editor. Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Hoboken: Wiley; 2013. pp. 385-406.
27- 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.
28- Lin J, Hong H, Zhang L, Zhang Ch, Luo Y. Antioxidant and cryoprotective effects of hydrolysate from gill protein of bighead carp (Hypophthalmichthys nobilis) in preventing denaturation of frozen surimi. Food Chem. 2019;298:124868.
29- Jenkelunas PJ, Li-Chan EC. Production and assessment of Pacific hake (Merluccius productus) hydrolysates as cryoprotectants for frozen fish mince. Food Chem. 2018;239:535-43.
30- Zhou WJ, Wang FX, Yu J, Li XH, Liu YL. Cryoprotective Effects of protein hydrolysates prepared from by-products of Silver Carp (Hypophthalmichthys Molitrix) on freeze-thawed surimi. Appl Sci. 2019;9(3):563.
31- Benjakul S, Bauer F. Physicochemical and enzymatic changes of cod muscle proteins subjected to different freeze-thaw cycles. J Sci Food Agric. 2000;80(8):1143-50.
32- Karnjanapratum S, Benjakul S. Antioxidative gelatin hydrolysate from unicorn leatherjacket skin as affected by prior autolysis. Int Aquat Res. 2015;7(2):101-14.
Agric Food Chem. 2005;53(3):581-7.
16- Kittiphattanabawon P, Benjakul S, Visessanguan W, Shahidi F. Effect of extraction temperature on functional properties and antioxidative activities of gelatin from shark skin. Food Bioprocess Technol. 2012;5(7):2646-54.
17- Nagarajan M, Benjakul S, Prodpran T, Songtipya P, Kishimura H. Characteristics and functional properties of gelatin from splendid squid (Loligo formosana) skin as affected by extraction temperatures. Food Hydrocoll. 2012;29(2):389-97.
18- Adler-Nissen J. A review of food hydrolysis specific areas. In: Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science Publishers; 1986. pp. 57-109.
19- Guo L, Hou H, Li B, Zhang Z, Wang Sh, Zhao X. Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. Process Biochem. 2013;48(5-6):988-93.
20- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 1978;52:302-10.
21- Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. Archiv Biochem Biophys. 1959;82:70-7.
22- Benjakul S, Seymour TA, Morrissey MT, An H. Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. J Food Sci. 1997;62(4):729-33.
23- Chelh I, Gatellier P, Santé-Lhoutellier V. A simplified procedure for myofibril hydrophobicity determination. Meat Sci. 2006;74(4):681-3.
24- Benjakul S, Yarnpakdee S, Senphan T, Halldorsdottir SM, Kristinsson HG. Fish protein hydrolysates: Production, bioactivities, and applications. In: Kristinsson HG, editor. Antioxidants and functional components in

www.SID.ir