بررسی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت بدست آمده از ضایعات، در فرآیند فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*)

عبدالوهاب بخشان[۱]، ابراهیم علیزاده دوغیکلایی[۲*]، علی طاهری[۳و۴]

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی خواص آنتی اکسیدان پروتئین آبکافت ضایعات فیله کردن ماهی آزاد تولید شده با آنزیم ترپیسین می پردازد. پروتئین آبکافت در دمای یکسان تحت دو متغیر متفاوت زمان آبکافت و مقدار آنزیم تولید شد. ترکیب تقریبی، میزان آبکافت، فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH، فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو و قدرت کاهندگی برای سه نوع پروتئین آبکافت تولیدی محاسبه شد. بیشترین میزان پروتئین ۰/۰±۸۹/۷٤ و کمترین میزان چربی، رطوبت و خاکستر پروتئین‌های آبکافت به ترتیب ۰/۰۱±۰/٦، ۰/۲±۵/۷ و ۰/۲±۳/۵ بود که با ضایعات ماهی آزاد اختلاف معنی‌دار داشت (p<۰/۰۵). بیشترین مقدار آبکافت، فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH، کلاته کردن یون آهن فرو و قدرت کاهندگی پروتئین‌های تولیدی به ترتیب: ۰/٤۸±۸۱/۷۸، ٤/۵٦±۹۳/۹۹، ۰/٦±۱۲/۸ و ۰/۰۰±۰/٤۲ اندازه گیری شد. در نتیجه‌گیری می‌توان گفت آبکافت آنزیمی ضایعات ماهی آزاد منجر به تولید پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی می‌گردد و می‌تواند بعد از تایید مطالعات کلینیکی بعنوان مکمل غذایی مورد استفاده قرار گیرد.

واژگان کلیدی: *ترپیسین، پروتئین آبکافت، ماهی آزاد، رادیکال آزاد*

تاریخ دریافت: ۹۲/۵/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۲/٦/۳۰

مقدمه

گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن (ROS) و رادیکال‌های آزاد در طی تنفس سلولی در انسان‌ها و دیگر موجودات هوازی شکل می‌گیرند. علاوه بر تولید فیزیولوژیکی رادیکال‌های آزاد و واکنش‌های ثانویه آنها، منابع دیگری برای تولیدشان وجود دارد. اکسیداسیون چربی‌ها و روغن‌ها در طی فرآوری و نگهداری محصولات غذایی باعث از دست رفتن کیفیت، ارزش غذایی و تشکیل رادیکال‌های آزاد می‌شود (۲۱). گزارش شده است که رادیکال‌های آزاد نقش مهمی را در بیماریهایی از قبیل سرطان، مشکلات قلبی، پارکینسون، آلزایمر و فشار خون بالا ایفا می‌کنند (۲۹).

آنتی اکسیدان‌ها به عنوان هر ماده‌ای که بطور قابل ملاحظه‌ای باعث کاهش گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن از قبیل اکسیژن فعال و نیتروژن در فعالیت‌های فیزیولوژیک بدن شود و اکسیداسیون ماده را به تاخیر اندازد یا از آن جلوگیری کند تعریف می‌شوند. به منظور جلوگیری از پراکسیداسیون لیپید در محصولات غذایی، در غذا و صنعت دارویی از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن، بوتیل هیدروکسی آنیزول، ترت بوتیل هیدروکوئینون و پروپیل گالات استفاده شده است. با این حال استفاده از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی به علت خطرات بالقوه‌ای که این ترکیبات برای سلامتی دارند تحت مقررات سختگیرانه‌ای است. به همین دلیل تحقیق برای یافتن آنتی اکسیدان‌های طبیعی و امن امری ضروری است.

در سال‌های اخیر، پروتئین‌های آبکافت از منابع مختلف گیاهی و جانوری از قبیل کازئین شیر، سویا، سبوس برنج، پروتئین بذر quinoa، کانولا، پروتئین زرده‌ی تخم مرغ و ماهی نشان داده است که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می‌باشند (۳).

مقادیر زیادی مواد غنی از پروتئین محصولات جانبی کارخانه‌های فرآوری غذاهای دریایی بدون هیچ گونه تلاشی

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد رشته فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشگاه زابل، زابل، ایران

۲*.استادیار گروه شیلات، دانشگاه زابل، زابل، ایران ebi_alizadeh2003@yahoo.com

۳. استادیار گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

٤. گروه پژوهشی زیست فناوری دریایی، مرکز تحقیقات علوم زیستی دریای عمان، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران

Archive of SID

www.SID.ir

برای بازیافت آنها دور ریخته می‌شوند. صنعت فرآوری ماهی بیش از ٦٠٪ محصولات جانبی بعنوان ضایعات تولید می‌کند که شامل پوست، سر، باله، دم، امعا و احشا و استخوان‌ها می‌باشد و فقط ٤٠٪ محصولات ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس گزارش فائو (٢٠١١) حدود ٨٤٪ تولید شیلاتی کل (١٢٨/١ میلیون تن) بطور مستقیم برای مصارف انسانی است و ١٦٪ یا ٢٢/٨ میلیون تن باقی مانده عمدتا به آرد ماهی و روغن ماهی تبدیل می‌شود (٧). رشد سریع آبزی پروری نیز منجر به افزایش مقدار محصولات جانبی با ترکیبات با کیفیت می‌شود که ممکن است برای مصارف انسانی استفاده شوند.

ضایعات (سر و دم) حاصل از فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*) دارای ترکیبات بیو اکتیو فعال و غنی از پروتئین می‌باشند که می‌توانند بوسیله‌ی بازیافت نیتروژن بوسیله‌ی آبکافت آنزیمی و دیگر فرآیندهای موجود به محصولات با ارزش افزوده بالا تبدیل شوند. یکی از ابزارهای موثر برای بازیافت ترکیبات با ارزش محصولات جانبی از قبیل پپتیدهای بیواکتیو آبکافت آنزیمی می‌باشد (٥). استفاده مناسب از ضایعات غنی از پروتئین فرآوری ماهی می‌تواند بوسیله تبدیل این مواد به پروتئین آبکافت بدست آید. تبدیل ارزان فرآوری محصولات جانبی به محصولات با ارزش علاقه زیادی از دانشمندان مواد غذایی را در سال‌های اخیر به خود جلب کرده است. در حال حاضر، پروتئین آبکافت ماهی منبع مهمی از پروتئین‌ها و پپتیدهای بیواکتیو در نظر گرفته شده است.

اطلاعات کمی در رابطه با خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات ماهی آزاد بوسیله آبکافت آنزیمی وجود دارد. بنابراین در تحقیق حاضر پروتئین آبکافت بوسیله‌ی آنزیم تریپسن تهیه و خواص آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت حاصل از ضایعات ماهی آزاد از قبیل فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH (α, α- diphenyl- β- picrylhydrazyl)، قدرت کاهندگی (Reducing power) و فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو (Fe^{+2} chelating activity) مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد

ضایعات ماهی آزاد (سر و دم) از کارخانه‌ی پروتئین آرمان جنوب (چابهار–ایران) تهیه و در جعبه‌های یونولیتی حاوی یخ به آزمایشگاه دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شد و تا زمان آزمایش در دمای ٢٠- درجه‌ی سانتی گراد نگه-داری شد. آنزیم مورد استفاده در این تحقیق تریپسین (Merk) بود. و تا شروع آزمایش در یخچال (٤ درجه‌ی سانتی گراد) نگهداری شد. تری کلرواستیک اسید، سدیم پتاسیم تارتارات، سولفات مس ٥ آبه، یدید پتاسیم، رادیکال آزاد DPPH، آهن کلراید (II)، آهن کلراید (III)، پتاسیم فری سیانید، EDTA و فروزین از شرکت سیگما تهیه گردید.

تهیه پروتئین آبکافت

آبکافت آنزیمی با استفاده از آنزیم تریپسین انجام شد. بر این اساس سر و دم ماهی آزاد به صورت جداگانه در یک چرخ گوشت چرخ گردیده و سپس به نسبت ٢ به ١ با هم مخلوط شدند و به ارلن مایرهای ٢٥٠ میلی لیتری اضافه شدند. ارلن‌ها برای ٢٠ دقیقه در دمای ٨٥ درجه‌ی سانتی گراد گرمادهی شدند تا آنزیم‌های داخلی آن غیر فعال گردند. هر کدام از ارلن‌ها حاوی ٥٠ گرم گوشت چرخ شده بود. پس از حرارت دهی به هر کدام از ارلن‌ها ١٠٠ سی سی آب مقطر اضافه شد و توسط یک هموژنایزر (Sonicator Scilab, model: SCI900D) به مدت ٢ دقیقه هموژن شدند. سپس عمل آبکافت بصورت ٣ تیمار و در دو زمان و دو غلظت آنزیم مختلف: ١ (٢٪ آنزیم، مدت زمان ١ ساعت)، ٢ (١٪ آنزیم، مدت زمان ٣ ساعت) و ٣ (٢٪ آنزیم، مدت زمان ٣ ساعت) در دمای ٥٥ درجه‌ی سانتی گراد در یک انکوباتور متحرک (Fan Azma Gostar, model: K_m55) انجام شد. پس از این زمان، مخلوط در حمام آبی ٨٥ درجه‌ی سانتی گراد قرار داده شد تا آنزیم تریپسن غیرفعال گردد (٣). نمونه‌ها به مدت ٢٠ دقیقه در ٤٥٠٠g در دمای ٤ درجه‌ی سانتی گراد سانتریفوژ (Centurion Scientific, model:

www.SID.ir

K241R, England) شده و مایع رویی برداشته و توسط دستگاه فریز درایر (Jal Teb, model: JFD21, Iran) خشک و به پودر تبدیل شد و تا زمان مصرف درون کیسه‌های نایلونی در ۲۰- درجه‌ی سانتی گراد نگه‌داری گردید.

آنالیز تقریبی

آنالیز تقریبی بر اساس روش استاندارد (AOAC, 2000) انجام گرفت (۱).

تعیین میزان و درجه آبکافت (DH)

به ۰/۵ میلی لیتر از مایع رویی حاصله بعد از آبکافت ۰/٤٤ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید اضافه شد. مخلوط برای ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه و سپس در ٤۵۰۰ دور در دقیقه (۵ دقیقه) سانتریفوژ گردید. محلول ۰/۲۲ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید حاصله برای تعیین محتوای پروتئین با روش بیورت سنجیده شد و از آلبومین سرم گوساله به عنوان استاندارد پروتئین استفاده گردید. بر این اساس ٤/۵ میلی گرم سدیم پتاسیم تارتارات، ۱/۵ میلی گرم سولفات مس ۵ آبه، ۲/۵ میلی گرم یدید پتاسیم در ۲۰۰ میلی لیتر محلول ۰/۲ مولار سود حل شد و به حجم ۵۰۰ سی سی رسانده شد. به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی ٤/۵ میلی لیتر محلول سنجش افزوده شد و پس از ۲۰ دقیقه در ۵۵۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Unicon spectrophotometer, model: S2100 SUV, USA) قرائت شد. درجه آبکافت با فرمول زیر سنجیده شد (۲۵).

$$\text{درجه‌آبکافت (٪)} = \frac{\text{پروتئین موجود در محلول ۰/۲۲ مول در لیتر تری کلرواستیک اسید}}{\text{پروتئین موجود در پروتئین آبکافت}} \times ۱۰۰$$

تعیین خواص آنتی اکسیدان

فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH

فعالیت حذف رادیکال آزاد توسط روش تغییر یافته Shimada و همکاران (۱۹۹۲) انجام گرفت (۲۳). بر این اساس محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH (۱/۵ میلی لیتر، ۰/۱ میلی مولار در اتانول ۹۵٪) با نمونه مخلوط گردید (۱/۵ میلی لیتر در غلظت-های متفاوت نمونه در اتانول ۵۰٪). مخلوط تکان داده شد و پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب در ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر (Unicon spectrophotometer, model: S2100 SUV, USA) سنجیده شد. برای نمونه کنترل محلول اتانول به جای نمونه مورد استفاده قرار گرفت. فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول زیر سنجیده شد:

$$DPPH\ radical\ scavenging\ capacity(\%) = 1 - \frac{A_{517}\ sample}{A_{517}\ control} \times 100$$

فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو

فعالیت کلاته کردن یون آهن (II) بر اساس روش تغییر یافته Dinis و همکاران (۱۹۹٤) سنجش شد (٦). بر این اساس نمونه (با غلظت‌های متفاوت) با آب مقطر به حجم ۳/۷ رسید. محلول ۲ میلی مولار یون آهن فرو (۰/۱ میلی لیتر) اضافه شد و بعد از ۳ دقیقه واکنش با افزودن فروزین ۵ میلی مولار متوقف گردید. مخلوط شدیدا تکان داده شده و برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت ماند. جذب مخلوط در ۵٦۲ نانومتر (Unicon spectrophotometer, model: S2100 SUV, USA) سنجیده شد. یک شاهد بدون نمونه به شیوه مشابه تهیه گردید. فعالیت کلاته کردن با فرمول زیر سنجش گردید:

$$Fe^{2+}Chelating\ activity(\%) = \frac{Blank - Sample}{Blank} \times 100$$

تعیین قدرت کاهندگی

قدرت کاهندگی بر اساس روش تغییر یافته Oyaizu (۱۹۸٦) سنجیده شد (۱۸). بر این اساس ۱ میلی لیتر نمونه (در غلظت-های نهایی متفاوت) با ۱ میلی لیتر فسفات بافر (pH ٦/٦) و ۱ میلی لیتر پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. مخلوط در ۵۰ درجه-ی سانتی گراد ۲۰ دقیقه انکوبه شد و سپس مخلوط تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به میزان ۱ میلی لیتر افزوده شد. قسمتی از مخلوط با ۲ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/٤ میلی لیتر کلرید فریک ۰/۱٪ اضافه گردید. بعد از ۱۰ دقیقه جذب در ۷۰۰ نانومتر سنجیده شد. افزایش میزان جذب نشان دهنده افزایش قدرت کاهندگی است.

Archive of SID

www.SID.ir

آنالیز آماری

تمام آزمایشات با ۳ تکرار انجام شد. نتایج بصورت انحراف معیار ±میانگین نمایش داده شده است. نتایج بدست آمده در این تحقیق با نرم افزار (Graphpad Software Inc., San Graphpad prism 5 (Diego, USA و با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و برای مقایسه میانگین تیمارها از آزمون توکی در سطح آلفای ۰/۰۵ استفاده شد.

نتایج

آنالیز تقریبی

ترکیب شیمیایی ضایعات ماهی آزاد و پروتئین‌های آبکافت در جدول ۱ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان نیتروژن ۰/۰±۸۹/۷٤ و کمترین میزان چربی، رطوبت و خاکستر به ترتیب ۰/۰۱±۰/٦، ۰/۲±۵/۷، ۰/۲±۳/۵ بدست آمده است. از لحاظ پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر تیمارها با ضایعات ماهی آزاد اختلاف معنی‌دار نشان دادند (p<۰/۰۵).

جدول ۱- ترکیب شیمیایی ضایعات ماهی آزاد و پروتئین‌های آبکافت (٪)

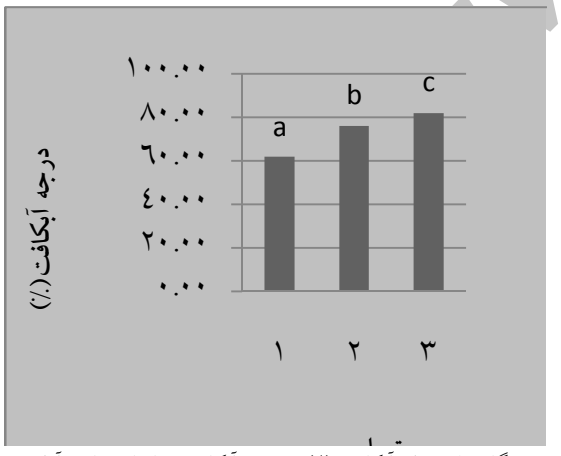
	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
ضایعات ماهی آزاد	۷۵±۱/۵ c	۱۱±۰/۹ a	۷۲±۱/۱ a	۱۳±۰/٦ a
پروتئین آبکافت (۱)	۸۳/٦۳±۰/۳ b	۰/٦±۰/۰۱ b	۵/۸±۰/۱ b	۵/۳±۰/۲ b
پروتئین آبکافت (۲)	۸۹/۷٤±۰/۰ a	۰/٦±۰/۰۲ b	۵/۸±۰/۲ b	۳/۵±۰/۲ c
پروتئین آبکافت (۳)	۸۵/۹±۰/۷ b	۰/٦±۰/۰۱ b	۵/۷±۰/۲ b	۳/٦±۰/۲ c

نتایج پروتئین، چربی و خاکستر بر اساس وزن خشک محاسبه شده است.

از حروف کوچک (a,b,c) برای نشان دادن وجود و یا عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها استفاده شده است. وجود حداقل یک حرف مشترک در هر ستون نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی دار بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).

درجه آبکافت

میزان آبکافت در نگاره ۱ آورده شده است. بیشترین میزان درجه آبکافت ۰/٤۸±۸۱/۷۸ در مدت زمان سه ساعت و کمترین آن ۰/۵۵±٦۱/۷۳ در مدت زمان یک ساعت بدست آمد.

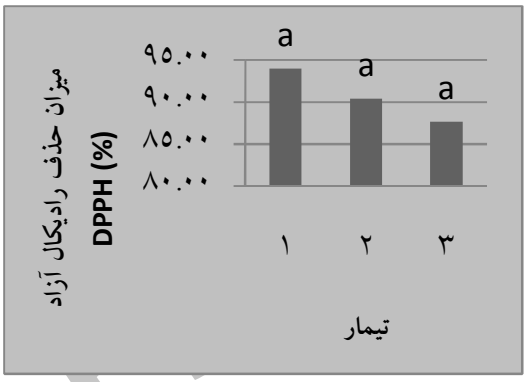


نگاره ۱- میزان آبکافت (٪) پروتئین آبکافت ضایعات ماهی آزاد از حروف کوچک (a,b,c) برای نشان دادن وجود و یا عدم وجود اختلافات معنی دار بین تیمارها استفاده شده است. ستون‌هایی که در هیستوگرام دارای حروف غیرمشترک هستند دارای اختلاف معنی دار با یکدیگر می‌باشند (p<۰/۰۵).

www.SID.ir

فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH

میزان حذف رادیکال آزاد در نگاره ۲ آورده شده است. بیشترین میزان حذف رادیکال آزاد ٤/٥٦±٩٣/٩٩ و کمترین آن ٦/٦٨±٨٧/٦١ می‌باشد.

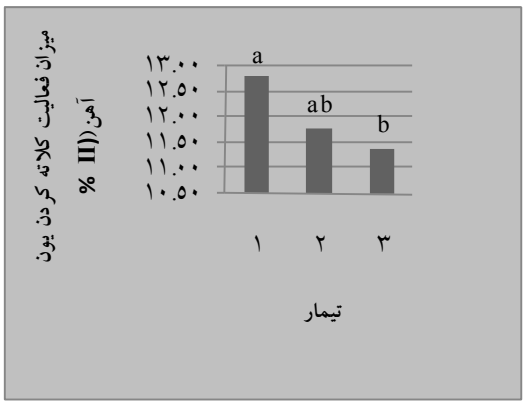


نگاره ۲- میزان حذف رادیکال آزاد DPPH (٪) پروتئین آبکافت ضایعات ماهی آزاد

حروف کوچک مشترک (a) در ستون‌های هیستوگرام نشان از عدم اختلاف معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).

فعالیت کلاته کردن یون آهن فرو

فعالیت کلاته کردن یون آهن (II) در نگاره ۳ آورده شده است. بیشترین میزان کلاته کردن یون آهن فرو ۰/٦±۱۲/۸ و کمترین آن ۰/۳±۱۱/٤ می‌باشد.

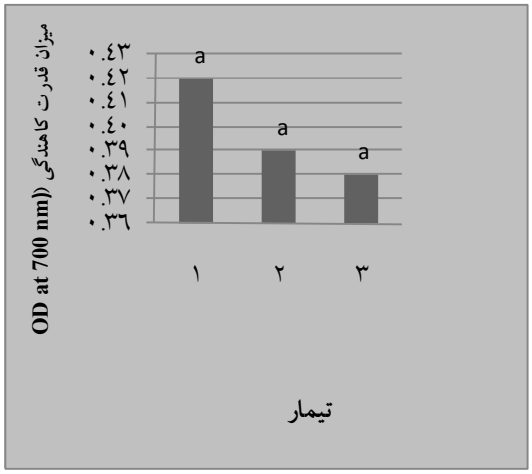


نگاره ۳- میزان کلاته کردن یون آهن (II) پروتئین آبکافت ضایعات ماهی آزاد

وجود حداقل یک حروف مشترک (a,b) در ستون‌های هیستوگرام نشان از عدم تفاوت معنی‌دار بین آن دو تیمار می‌باشد (p>۰/۰۵).

میزان کاهندگی قدرت

میزان کاهندگی قدرت پروتئین آبکافت ضایعات ماهی آزاد در نگاره ٤ آورده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود بیشترین میزان کاهندگی قدرت ۰/۰۰±۰/٤۲ و کمترین مقدار ۰/۰۰±۰/۳۸ می‌باشد.



نگاره ٤- میزان قدرت کاهندگی پروتئین آبکافت ضایعات ماهی آزاد

حروف کوچک مشترک (a) در ستون‌های هیستوگرام نشان از عدم تفاوت معنی‌دار بین تیمارها می‌باشد (p>۰/۰۵).

بحث

ترکیبات شیمیایی مواد غذایی با فراهم کردن مواد مغذی ضروری نقش مهمی را در سلامتی انسان بازی می‌کنند. ترکیبات شیمیایی پروتئین آبکافت از منظر تغذیه برای سلامتی انسان مهم می‌باشند. بر اساس جدول ۱، میزان پروتئین در پروتئین‌های آبکافت بدست آمده بالا بود که بیشترین میزان پروتئین در محصولات تولیدی ۰/۰±۸۹/۷٤ درصد دیده شد که مشابه نتایج سایر محققین می‌باشد. این میزان در اکثر گزارشات ۹۰-٦۰ درصد گزارش شده است (۲٤ و ۲۲، ۱٤). علت محتوای پروتئین بالای محصول آبکافت ماهی حل شدن پروتئین در طی آبکافت و حذف ماده جامد نامحلول بوسیله‌ی سانتریفوژ گزارش شده است (٤). میزان چربی در پروتئین‌های آبکافت پایین بود که کمترین آن ۰/۰۱±۰/٦٪ دیده شد که در چندین مطالعه میزان

Archive of SID

www.SID.ir

چربی کمتر از ۵٪ گزارش شده است (۲٤ و ۲۲). مقدار پایین چربی پروتئین آبکافت به علت حذف چربی‌های همراه با بخش‌های نامحلول پروتئین بوسیله‌ی سانتریفوژ می‌باشد.

میزان رطوبت در پروتئین‌های آبکافت پایین بود که کمترین آن ۰/۲±۵/۷ دیده شد که موافق با نتایج سایر مطالعات بود که در اکثر مطالعات میزان رطوبت کمتر از ۱۰٪ گزارش شده است (۲٤ و ۲۲). مقدار پایین رطوبت پروتئین آبکافت در ارتباط با نوع نمونه و دماهای بالاتر بکار رفته در طی فرآیند تبخیر و خشک کردن می‌باشد. در طی این فرآیندها، نمونه اغلب رطوبت خود را ازدست می‌دهد.

میزان خاکستر در پروتئین‌های آبکافت پایین بود که کمترین آن ۰/۲±۳/۵ بود که مشابه نتایج سایر مطالعات بود. در چندین مطالعه میزان خاکستر کمتر از ۷٪ گزارش شده است (۱٤ و ٤).

با افزایش مدت زمان آبکافت از ۱ ساعت به ۳ ساعت میزان آبکافت افزایش نشان داد. در چندین مطالعه گزارش شده است که با افزایش زمان آبکافت میزان آبکافت افزایش می‌یابد (۱۵ و ۱٤، ۳). در زمان آبکافت مشابه، آبکافت بیشتر در تیماری که حاوی آنزیم بیشتری بود مشاهده شد که با نتایج دیگر محققین همسو بود (۱۵ و ۲). نتایج نشان می‌دهد که باندهای پپتیدی در حضور مقدار آنزیم بیشتر دچار شکست بیشتر می‌شوند.

آنتی اکسیدان‌ها می‌توانند با مکانیسم حذف رادیکال آزاد از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می‌باشد که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر نشان می‌دهد. هنگامی که رادیکال DPPH در معرض یک ماده‌ی الکترون دهنده از قبیل آنتی اکسیدان قرار می‌گیرد، رادیکال مهار خواهد شد و جذب کاهش می‌یابد (۲۳). میزان جذب پایین‌تر نشان از مهار بیشتر رادیکال آزاد می‌باشد. با توجه به نتایج، با افزایش میزان آبکافت میزان حذف رادیکال DPPH کاهش نشان داد. همان طور که از نتایج پیداست پروتئین‌های آبکافت تولید شده فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH قابل توجهی نشان دادند که به ترتیب ۸۷/٦۱ ۹۰/٤۰ و ۹۳/۹۸٪ بودند. در چندین مطالعه میزان حذف رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های آبکافت تولید شده بیش از ۵۰٪ گزارش شده است (۲۹ و ۳).

یون آهن فرو گونه‌ی کلیدی فعال مسئول تشکیل اکسیدان‌ها در سلول‌ها می‌باشد که منجر به افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (۱۰). کلاته کردن یون فلزی بوسیله‌ی پپتیدها در پروتئین‌های آبکافت می‌تواند مانع از تشکیل اکسیدان‌ها شود و سطوح اکسیداسیون لیپید را کاهش دهد. با توجه به نتایج با افزایش میزان آبکافت فعالیت کلاته کردن یون فلزی کاهش نشان داد که بین تیمار ۱ و ۳ اختلاف معنی‌دار مشاهده شد ($p<0/05$). نتایج نشان می‌دهد که پروتئین‌های آبکافت بدست آمده از ضایعات ماهی آزاد توانایی کلاته کردن یون فلزی را دارند ولی این توانایی قابل ملاحظه نبود و مقدار آنها بترتیب ۰/٦±۱۲/۸، ۰/۵±۱۱/۸ و ۰/۳±۱۱/٤ بدست آمد. در مطالعه حاضر میزان آبکافت قابل توجه بود (٦۰٪<) که این میزان آبکافت بالا ممکن است باعث کاهش در میزان فعالیت کلاته کردن یون فلزی شده باشد. در چندین مطالعه پروتئین‌های آبکافتی که دارای میزان آبکافت کمتر از ۳۰٪ بوده‌اند میزان کلاته کردن یون فلزی بیش از ٦۰٪ گزارش شده است (۱۵ و ۹).

قدرت کاهندگی برای تعیین توانایی ترکیبات در کاهش آهن (III) به آهن (II) مورد استفاده قرار می‌گیرد و بوسیله‌ی یک واکنش رنگ سنجی redox-linked تعیین می‌شود (۱۸). حضور آنتی اکسیدان در پروتئین‌های آبکافت باعث کاهش کمپلکس آهن (III) یا فریک سیانید به شکل آهن (II) می‌شود. با توجه به نتایج با افزایش میزان آبکافت قدرت کاهندگی کاهش نشان داد ($p>0/05$). با توجه به نتایج نگاره ٤ تمام آبکافت های تولید شده از ضایعات ماهی آزاد دارای توانایی اهدای الکترون یا هیدروژن می‌باشند. که افزایش قدرت کاهندگی نشان از افزایش اهدای الکترون یا هیدروژن می‌باشد. در بین محصولات آبکافت تیمار ۱ بیشترین فعالیت را با مقدار ۰/٤۲ داشت که نزدیک به نتایج سایر محققین بود (۲٦ و ۱۵).

Archive of SID

www.SID.ir

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد، میزان آبکافت در محصولات قابل توجه بوده و با افزایش میزان آبکافت خواص آنتی اکسیدان کاهش نشان می‌دهد. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین-های آبکافت وابسته به پروتئاز (۱۳) و شرایط آبکافت بکار گرفته شده می‌باشد (۱۳ و ۱۱). در طی آبکافت طیف گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد بسته به ویژگی‌های آنزیم تولید می‌شود. تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی تاثیر می‌گذارد (۲٦). مدت زمان آبکافت ممکن است در افزایش شکست گروه‌هایی که باعث تسهیل واکنش میان پپتیدها و رادیکال‌های آزاد، گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یون‌های فلزی قابل تغییر که منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود تاثیر مستقیم داشته باشد. ولی این بدان معنا نیست که پروتئین‌های آبکافتی که دارای آبکافت بیشتر هستند همیشه دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی قوی‌تری هستند. چندین مطالعه نشان داده است که آبکافت گسترده می‌تواند باعث کاهش خواص آنتی اکسیدانی شود (۲۸ و ۲٦). آبکافت گسترده باعث تولید بیش از حد اسید آمینه‌های آزاد می‌شود. در کل پپتیدها دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به اسیدهای آمینه به علت فعالیت حذف رادیکال آزاد و فعالیت کلاته کردن یون فلزی بیشتر می‌باشند (۲۰). بنابراین، مقدار اسید آمینه آزاد بیش از حد ممکن است باعث کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی در پروتئین-های آبکافت با آبکافت گسترده شود. آبکافت گسترده نیز باعث می‌شود که اندازه‌ی پپتیدها بیش از حد کوچک شود. به خوبی پذیرفته شده است که پپتیدهای کوتاه مسئول بخش عمده‌ای از فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت می-باشند (۲٦). خصوصیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای جدا شده از پروتئین‌های ماهی مربوط به توالی آنها، ترکیب و آبگریزی‌شان می‌باشد (۱۹و ۱۳، ۱۲). گزارش شده است که پپتیدهای آنتی اکسیدانی دارای بعضی کلاته کننده‌های یون فلزی یا هیدروژن یا فعالیت الکترون دهندگی می‌باشند، که می‌تواند به آنها اجازه واکنش با رادیکال‌های آزاد و محدود کردن واکنش رنجیره رادیکال یا جلوگیری از تشکیل‌اشان را دهد (۲۷ و ۱۹). بنابراین، ترکیبات اسید آمینه و توالی پپتیدها برای فعالیت آنتی اکسیدانی‌اشان بسیار مهم می‌باشد. نشان داده شده است که اسید آمینه‌های آبگریز و اسیدهای آمینه‌ای چون هیستیدین، پرولین، متیونین، سیستئین، تیروزین و فنیل آلانین می‌توانند فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها را بهبود بخشند (۲۷ و ۱۹، ۱۲). حضور توالی‌های آبگریز در پپتیدها می‌تواند با مولکول‌های چربی واکنش دهد و می‌تواند بوسیله‌ی دادن پروتون به رادیکال‌های مشتق شده لیپید آنها را حذف کند (۱۲). کوچک شدن بیش از اندازه پپتیدها ممکن است یکی از دلائل دیگر کاهش میزان فعالیت آنتی اکسیدانی در پروتئین‌های آبکافت با میزان آبکافت گسترده باشد.

پروتئین هیدورلیز شده تولید شده از پروتئین‌های ماهی مکمل غذایی خوبی بعنوان ترکیبات بیواکتیو هستند و می‌تواند براحتی جذب شود و برای فعالیت‌های متابولیک مختلف مورد بهره‌برداری قرار گیرند (۱۷). در بسیاری از کشورها، تهیه سنتی و تجاری پروتئین هیدرولیز شده ماهی در حال حاضر بعنوان غذاهای سلامتی، کاربردی و غذاهای فراسودمند مورد استفاده قرار می‌گیرد. در چند کشور محصولاتی از قبیل Seacure (۱٦)، Amizate (۱۷)، Stabilium 200، Protizen، Nutripeptin و Liquamen (۸) از پروتئین هیدرولیز شده ماهی تولید شده و بعنوان غذاهای سلامتی، کاربردی و غذای فراسودمند مورد استفاده قرار گرفته است. در جمع بندی می‌توان گفت که پروتئین آبکافت تهیه شده از ضایعات ماهی آزاد بوسیله‌ی آنزیم تریپسین دارای خواص آنتی اکسیدانی خوبی می‌باشد و در صورتی که از نظر زیستی و ایمنی برای انسان بی ضرر باشد و مطالعات کلینیکی آن را تایید کند می‌تواند به عنوان یک افزودنی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

Archive of SID

www.SID.ir

REFERENCES

1. AOAC. (2000): Official Methods of Analysis 17 th edition. Association of Official Analytical Chemists. Maryland, USA.
2. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., Nunes, M.L. (2010): Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochem. 45: 18–24.
3. Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., Nasri, M. (2010): Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. Food Chem. 118: 559–565.
4. Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D.G., Jyothirmayi, T. (2010): Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. Food Chem. 120: 652–657.
5. Dauksas, E., Falch, E., Slizyte, R., Rustad, T. (2005): Composition of fatty acids and lipid classes in bulk products generated during enzymic hydrolysis of cod (*Gadus morhua*) by-products. Process Biochem. 40: 2659–2670
6. Dinis, T.C.P., Maderia, V.C.M., Almeida, M.L.M. (1994): Action of phenolic derivates as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Arch Biochem. Biophys. 315: 161-169.
7. FAO. (2011): Fishery and Aquaculture Statistics Yearbook. Food and Agriculture Organization. Rome, Italy, p: xvi.
8. Guerard, F., Decourcelle, N., Sabourin, C., Floch-Laizet, C., Le Grel, L., Le Floch, P., Gourlay, F., Le Delezir, R., Jaouen, P., Bourseau, P. (2010): Recent developmentsof marine ingredients for food and nutraceutical applications: A review. J. Sci . Halieu. Aqua. 2: 21–27.
9. Hmidet, N., Balti, R., Nasri, R., Sila, A., Bougatef, A., Nasri, M. (2011): Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (*Sepia officinalis*) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. Food Res. Int. 44: 2703–2711.
10. Huang, X., Dai, J., Fournier, J., Ali, A.M., Zhang, Q., Frenkel, K. (2002): Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. Free Radic. Biol. Med. 32: 84–92.
11. Jao, C.L., Ko, W.C. (2002): 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. Fisheries Sci. 68(2): 1344-1351.
12. Je, J.Y., Qian, Z., Byun, H., Kim, S. (2007): Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochem. 42: 840-846.
13. Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W.K., Kim, S.K. (2004): Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Res. Technol. 219(1): 20-26.
14. Khantaphant, S., Benjakul, S., Kishimura, H. (2011): Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. Process Biochem. 46: 318–327.
15. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F. (2007): Antioxidant activity and functional properties of protein hydrolysates of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem. 102: 1317-1327.
16. Marchbank, T., Limdi, J. K., Mahmood, A., Elia, G., Playford, R. J. (2008): Clinical trial: Protective effect of a commercial fish protein hydrolysate against indomethacin (NSAID)-induced small intestinal injury. Alimentary Pharmacol. Thera. 28: 799–804.
17. Nesse, K. O., Nagalakshmi, A. P., Marimuthu, P., & Mamta Singh. (2011). Efficacy of a fish protein hydrolysate in malnourished children. Indian. J. Clin. Biochem.
18. Oyaizu, M. (1986): Studies on products of browing reaction prepared from glucoseamine. Jpn. J. Nut. 44: 307-314.

Archive of SID

www.SID.ir

19. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y., Xue, S.J. (2008): Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Food Chem. 108: 727–736.
20. Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. (2003): Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. J. Agr. Food Chem. 51(12): 3661–3667
21. Sarmadi, B.H., Ismail, A. (2010): Antioxidant peptides from food proteins: A review. Peptides. 31: 1949-1956.
22. Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D., Prinyawiwatkul, W. (2003): Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. J. Food Sci. 68: 2196–2200
23. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T. (1992): Antioxidant properties of xanthan on the antioxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agr. Food Chem. 40: 945-948.
24. Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F. (2007): Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). Food Chem. 103: 1385–1394
25. Tsumura, K., Kugimiya, W., Bando, N., Hiemori, M., Ogawa, T. (1999): Preparation of hypoallergenic soybean protein with processing functionality by selective enzymatic hydrolysis. Food Sci. Technol. 5: 171-175.
26. Wu, C.H., Chen, H.M., Shiau, C.Y. (2003): Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Res. Int. 36(9-10): 949-957.
27. You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M., Ren, J. (2010): Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. Food Res. Int. 43: 1167–1173
28. You, L.J., Zhao, M.M., Regenstein, J.M., Ren, J.Y. (2011): In vitro antioxidant activity and in vivo anti-fatigue effect of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) peptides prepared by papain digestion. Food Chem. 124(1): 188–194.
29. Zhong, S., Ma, Ch., Lin, Y.C., Lou, Y. (2011): Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chem. 126: 1636-1642.

Archive of SID

www.SID.ir