Archive of SID

مجله دانشگاه علوم پزشکی قم
دوره نهم، شماره یازدهم، بهمن ۹۴
صفحه ۶۰ الی ۶۸

مقاله پژوهشی
(Original Article)

بررسی خصوصیت آنتی‌اکسیدانی دو نوع پروتئین آبکافت حاصل از صدف اویستر

علی طاهری[1*]، امین اوجی‌فرد[2]، سمیرا جلالی‌نژاد[3]، بهنام (ع) مظفری[4]

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، استرس اکسیداتیو که منجر به تغییر کیفیت ماده غذایی و بروز بیماری‌های مختلف مانند سرطان یا گستره‌ای از بیماری‌های دیگر در بدن انسان می‌شود مورد توجه است. در این مطالعه خواص آنتی‌اکسیدانی و پروفیل اسیدآمینه محصولات تولیدی بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه، پروتئین آبکافت صدف اویستر(*Saccostrea cucullata*) با استفاده از آنزیم‌های پاپائین و تریپسین تولید شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی محصول با آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH)، فعالیت کلاته‌کنندگی و فعالیت کاهندگی آهن در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین بررسی گردید. همچنین ترکیب اسیدآمینه محصولات با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع فاز بالا، سنجش و شاخص شیمیایی محاسبه شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH، فعالیت کلاته‌کنندگی و فعالیت کاهندگی آهن برای محصول پاپایین به ترتیب ۰/۳۱±۶۷/۶۶٪، ۰/۱۲±۸۸/۳۴٪ و ۰/۱۲±۰/۹۹ و برای محصول آنزیم تریپسین به ترتیب ۰/۲۲±۵۲/۱۷٪، ۰/۰۹±۷۷/۱۱ ٪ و ۰/۰۲±۰/۶۵برآورد شد. بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر دیده شد ($p<0/05$). بیشترین میزان اسیدهای آمینه ضروری شامل: هیستیدین، لیزین، لوسین و متیونین بود. شاخص شیمیایی برای اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین، بالاتر از ۱ و بقیه اسیدهای آمینه ضروری، کمتر از یک تعیین گردید.

نتیجه‌گیری: پروتئین آبکافت تولیدشده از صدف اویستر با آنزیم پاپائین، سپس تریپسین، قدرت آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان می‌دهد که ترکیب اسیدهای آمینه آبگریز مناسب در این مسئله دخیل است. محصولات تولیدی در صورت کارآزمایی بالینی می‌تواند جهت صادرات دارویی به کار رود.

کلید واژه‌ها:پروتئین آبکافت؛ آنتی‌اکسیدان؛ پاپائین؛ تریپسین؛ آمینواسیدها.

[1]دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

[2]دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران.

[3]دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

[4]دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

[*]نویسنده مسئول مکاتبات:
علی طاهری، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:
taheri@cmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵

لطفاً به این مقاله به‌صورت زیر استناد نمایید:

Taheri A, Ojifard A, Jalalinezhad S, Mozaffari B. A study of antioxidant properties of two types of protein hydrolysate produced by oyster. Qom Univ Med Sci J 2016;9(11):60-68. [Full Text in Persian]

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

مقدمه

در دهه اخیر، بحث استرس اکسیداتیو که منجر به تغییر کیفیت ماده غذایی و بروز بیماری‌های مختلف مانند سرطان یا گستره‌ای از بیماری‌های دیگر در بدن انسان می‌شود بسیار مطرح بوده است (۱). در شرایط نرمال فیزیولوژیک،یک تعادل هموستاتیک بین تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال و برداشتن آنها به‌وسیله ترکیبات آنتی‌اکسیدان درونی برقرار است (۲). استرس اکسیداتیو زمانی‌که این تعادل به هم بخورد با تولید کنترل‌نشده گونه‌های اکسیژن فعال شامل سوپراکسیدها، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل یا توسط دفاع ناکافی ترکیبات آنتی‌اکسیدان اتفاق می‌افتد. آنتی‌اکسیدان‌های کلیدی می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهند (۳).

بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های صناعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول، بوتیل هیدروکسی تولوئن، بوتیل هیدروکوئینون و پروپیل گالات برای جلوگیری از ایجاد اکسیداسیون به غذا اضافه می‌شوند. اما مسائل مربوط به سلامت و نگرانی مصرف‌کنندگان از مصرف محصولات سنتزی مصنوعی، محدودیت‌هایی را برای استفاده از این مواد به‌وجود آورده است (۴). بنابراین، علاقه و توجه زیادی برای شناسایی منابع جدید و طبیعی آنتی‌اکسیدان از صنایع لبنی، گیاهان و جانوران به‌وجود آمده که تحقیقات گسترده‌ای را در سالهای اخیر به خود اختصاص داده است (۵).

مطالعات و بررسی‌های زیادی مبنی بر توانایی پروتئین‌ها در جلوگیری از اکسایش لیپید در غذاها موجود است. براساس گزارشها، پپتیدهای زیست‌فعال تهیه‌شده از منابع مختلف غذایی دارای خواص ضدفشار خون (۵)، آنتی‌اکسیدان، ضدسرطان (۶) و ضدمیکروبی می‌باشند.

پروتئین‌های آبکافت و پپتیدها از منابع غذایی مختلف، به‌عنوان ترکیبات فعال یا زیست‌فعال فیزیولوژیکی شناخته می‌شوند. پپتیدهای غذایی، خواص زیست‌فعال متعددی چون خواص ضدمیکروبی، کاهش اثر فشار خون، توانایی کاهش کلسترول و خواص آنتی‌اکسیدانی دارند (۷). پروتئین آبکافت و پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آن، که پپتیدهای کوتاه زنجیر با خواص زیست‌فعال ویژه هستند؛ در توالی پروتئین مادری غیرفعال بوده و پس از آبکافت آنزیمی، فعالیت آن آزاد می‌شود.

این پپتیدها شامل ۲۰-۳ اسیدآمینه هستند و فعالیت آنها وابسته به ترکیب اسیدهای آمینه و توالی آنها می‌باشد (۸). در مطالعات، گزارشهایی مبنی بر استفاده از ضایعات صنایع شیلاتی برای بازیافت این ترکیبات ارزشمند آمده است. اخیراً خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت از منابع مختلف دریایی مثل ساردین، اویستر، صدف کِلَم و فلاندر گزارش شده است (۱۲-۹). افزودن آنزیم‌های خارجی می‌تواند روند آبکافت را قابل‌کنترل کرده و آن را تکرارپذیر کند. آنزیم‌های میکروبی و گیاهی به‌دلیل تولید پروتئین آبکافت در کوتاه‌ترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم‌های خنثی یا اسیدی به‌طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳). مطالعات گسترده‌ای روی آبکافت آنزیمی ماهیان مختلف و احشای آنها توسط آنزیم‌هایی چون آلکالاز، پروتامکس و فلاوورزایم انجام شده است. در این خصوص، استفاده از آنزیم‌های گیاهی کمتر مطرح شده و آنزیم‌هایی چون پاپائین می‌تواند بدین منظور مفید باشد.

در بین منابع مختلف زیست‌دریایی موجود در جنوب ایران، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای حاصل از آبکافت صدف اویستر که پراکنش وسیعی در آبهای سواحل چابهار دارد بررسی و مطالعه نشده است. بنابراین، در این مطالعه به شناسایی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف دریایی اویستر سواحل چابهار پرداخته شد.

روش بررسی

صدف اویستر(*Saccostrea cucullata*) در فصل پاییز از ساحل صخره‌ای بندر تیس در چابهار تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. آنزیم پاپائین نیز از شرکت سینوفارم تهیه و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. آنزیم تریپسین از شرکت مرک تهیه گردید. تمامی مواد مورد استفاده با خصوصیات آزمایشگاهی تهیه شدند.

صدف‌ها با دیلم و چکش خرد شده و گوشت آنها خارج و پس از چرخ شدن به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی‌لیتری اضافه گردید. ارلن‌ها برای ۲۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد برای غیرفعال کردن آنزیم‌های درونی، گرمادهی شدند (۱۴). نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شده و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه در

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

۶۰۰۰ دور جهت جداکردن اضافات گوشت و چربی سانتریفوژ شدند. هر نمونه حاوی نسبت ۱:۱ از ۲۰ گرم گوشت چرخ‌شده و تیمارشده دمایی با آب مقطر بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم در دما و زمان مشخص، انکوباسیون صورت گرفت. پس از تیمار در مدت زمان مورد نیاز، مخلوط در حمام آبی ۸۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و آنزیم‌ها غیرفعال شدند. پروتئین آبکافت اویستر به‌وسیله دستگاه فریز درایر خشک و به پودر تبدیل گردید و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به‌منظور بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد، طبق روش Amit و همکاران (سال ۲۰۱۱)، محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH به میزان ۰/۱۶ میلی‌مولار (۲ میلی‌لیتر) با نمونه مخلوط شد. جذب در ۵۱۷ نانومتر پس از نیم ساعت در دمای اتاق سنجیده شد. برای کنترل از محلول اتانول استفاده گردید و بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. فعالیت حذف رادیکال آزاد براساس فرمول ۱ سنجیده شد (۱۵).

فرمول ۱:

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

از روش Benjakul و همکاران (سال ۲۰۰۵) جهت سنجش فعالیت کلاته‌کردن یون آهن (II) استفاده گردید. محلول ۲ میلی‌مولار یون آهن فرو به نمونه اضافه و واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرولیتر فروزین ۵ میلی‌مولار متوقف گردید. مخلوط پس از تکان‌دادن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و از یک شاهد بدون نمونه نیز استفاده گردید. اتیلن دی‌آمین ترا آمینو استیک اسید، به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ظرفیت کلاته‌کردن با فرمول ۲ ارزیابی گردید (۱۶):

فرمول ۲:

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

از روش Yildirim و همکاران (سال ۲۰۰۱)،جهت سنجش قدرت کاهندگی استفاده شد. ۱ میلی‌لیتر نمونه، فسفات بافر (۶/۶pH) و پتاسیم فری سیانید ۱٪ با هم ترکیب شدند. مخلوط، ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس ۲/۵ میلی‌لیتر مخلوط تری‌کلرو استیک اسید ۱۰٪ به آن افزوده شد. قسمتی از مخلوط با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شده و بعد از افزودن کلرید فریک ۰/۱٪ و ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر، سنجیده شد. از آسکوربیک اسید نیز به‌عنوان استاندارد استفاده گردید (۱۷).

پس از هضم در اسید کلریدریک ۶ مولار (دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد برای ۲۲ ساعت)، از کروماتوگرافی مایع فاز بالا (مدل کنوئر آلمان)، ستون و دتکتور فلوئورسنس استفاده شد (۱۸). شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت‌شده براساس نسبت اسیدهای آمینه ضروری نمونه به اسیدهای آمینه ضروری استاندارد براساس فرمول ۳ سنجیده شد (۱۹،۲۰).

فرمول ۳:

$$\text{شاخص شیمیایی} = \frac{\text{اسید آمینه ضروری نمونه}}{\text{اسید آمینه ضروری استاندارد}}$$

داده‌ها با استفاده ازنرم‌افزار SPSS نسخه ۲۱، آزمون واریانس یک‌طرفه و دانکن آنالیز آماری شدند.

یافته‌ها

درخصوص فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH؛ غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر فعالیت، حذف بالاتری نسبت به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد و هر دو مورد اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند ($p<0/05$). همچنین نتایج فعالیت کلاته‌کردن یون فلزی مشابه فعالیت حذف رادیکال آزاد بود ($p<0/05$). اما در مورد قدرت کاهشی بین دو غلظت متفاوت پروتئینی، تفاوت معنی‌داری دیده نشد و هر دو با شاهد، اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<0/05$). در تمامی اندازه‌گیری‌ها، شاهد بالاترین اثر را نشان داد (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف اویستر حاصل از آنزیم پاپائین

غلظت پروتئین محلول	فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH	فعالیت کلاته کردن یون آهن	قدرت کاهشی
۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۴۵/۳۳±۰/۵۱ ^{c}	۶۹/۱۹±۰/۰۵ ^{c}	۰/۷۸±۰/۱۱ ^{b}
۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۶۷/۶۶±۰/۳۱ ^{b}	۸۸/۳۴±۰/۱۲ ^{b}	۰/۹۹±۰/۱۲ ^{b}
شاهد	۸۰/۳۲±۱ ^{a}	۹۹/۲۳±۰/۱ ^{a}	۲/۲±۰/۰۲ ^{a}

مقادیر براساس انحراف معیار±میانگین بیان شده‌اند و حروف غیرهمنام در هر ستون نشان از اختلاف معنی‌دارمی‌باشد

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

درخصوص فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH؛ غلظت یک میلی‌گرم در میلی‌لیتر فعالیت، حذف بالاتری نسبت به غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد و هر دو مورد اختلاف معنی‌داری با شاهد داشتند ($p<۰/۰۵$). همچنین درخصوص فعالیت کلاته‌کردن یون فلزی، بالاترین فعالیت مربوط به شاهد بود که با دو غلظت متفاوت پروتئینی، اختلاف معنی‌داری داشت. غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، قدرت کلاته‌کنندگی به مراتب بالاتری از ۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر نشان داد ($p<۰/۰۵$). درمورد قدرت کاهشی نیز بین دو غلظت متفاوت پروتئینی، تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و هر دو با شاهد، اختلاف معنی‌دار داشتند ($p<۰/۰۵$). در تمامی‌اندازه‌گیری‌ها، شاهد بالاترین اثر را نشان داد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۲: درصد فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف اویستر حاصل از آنزیم تریپسین

غلظت پروتئین محلول	فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH	فعالیت کلاته کردن یون آهن	قدرت کاهشی
۰/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۳۵/۲۴±۰/۱۴^{c}	۶۰/۰۸±۰/۰۲^{c}	۰/۴۴±۰/۰۱^{c}
۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر	۵۲/۱۷±۰/۲۲^{b}	۷۷/۱۱±۰/۰۹^{b}	۰/۶۵±۰/۰۲^{b}
شاهد	۸۰/۳۲±۱^{a}	۹۹/۲۳±۰/۱^{a}	۲/۲±۰/۰۲^{a}

مقادیر براساس انحراف معیار±میانگین بیان شده‌اند و حروف غیرهمنام در هر ستون نشان از اختلاف معنی‌دارمی‌باشد.

در مورد محصول آنزیم پاپائین، بیشترین میزان مربوط به اسیدهای آمینه ضروری هیستیدین، لیزین، لوسین و متیونین بود و بیشترین اسیدهای آمینه غیرضروری شامل سیستئین، گلوتامیک اسید و گلیسین بود. شاخص شیمیایی در مورد اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین، بالاتر از ۱ و بقیه اسیدهای آمینه ضروری، کمر از یک گزارش شد. در مورد محصول آبکافت حاصل از آنزیم تریپسین نیز همین نتایج مشاهده گردید، اما سطح اسیدهای آمینه ضروری نسبت به محصول پاپائین کمتر بود و شاخص شیمیایی ضعیف‌تری را نشان داد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت صدف اویستر به‌وسیله آنزیم‌های پاپائین، تریپسین و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با پروتئین رفرنس FAO/WHO

اسید آمینه	درصد اسیدآمینه در محصول		پروتئین رفرنس[1]	شاخص شیمیایی	
	محصول پاپائین (الف)	محصول تریپسین (ب)		الف	ب
هیستیدین	۸/۹	۷/۴۵	۲	۴/۴۵	۳/۷۲
ایزولوسین	۲/۴۴	۲/۳۱	۴	۰/۶۱	۰/۵۷
لوسین	۴/۱۲	۴	۷	۰/۵۹	۰/۵۷
لیزین	۶/۰۲	۵/۵	۵/۵	۱/۰۹	۱
متیونین	۴/۳۶	۴/۴	۳/۵	۱/۲۴	۱/۲۶
فنیل‌آلانین	۲/۲	۲	۴/۲۹	۰/۹۶	۰/۸۷
تیروزین	۱/۹۱	۱/۷۲	-		
ترئونین	۲/۳۵	۲	۴	۰/۵۹	۰/۵
آرژینین	۲/۱۲	۲/۲	۵	۰/۴۲	۰/۴۴
والین	۱/۲۳	۱/۱۱	۵/۴۲	۰/۲۲	۰/۲
آسپارتیک اسید	۶/۶۶	۶/۶۸	–	–	–
گلوتامیک اسید	۱۲/۵۶	۱۲/۶۶	–	–	–
سرین	۱/۱۲	۱/۱۲	–	–	–
گلایسین	۱۱/۱۱	۱۱/۱	–	–	–
آلانین	۰/۹	۱	–	–	–
سیستئین	۱۳/۵	۱۳	–	–	–
پرولین	۸/۴	۷/۸	–	–	–

[1] **میزان مورد نیاز اسیدآمینه براساس رفرنس FAO/WHO**

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد هر دو نوع پروتئین آبکافت، خواص آنتی‌اکسیدان خوبی دارند و غلظت پروتئین بر خواص مختلف تأثیرگذار است؛ به‌طوری‌که غلظت بالاتر، خواص بهتری را نشان داد. در کل، پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم پاپائین، خواص آنتی‌اکسیدانی بیشتری نسبت به محصول تریپسین داشت. مکانیسم دقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها، ناشناخته است، اما مطالعات متعدد نشان می‌دهد این پپتیدها پراکسیداسیون لیپیدها را محدود و رادیکال‌های آزاد را جمع می‌کنند (۲۱)، همچنین کلاته‌کننده یا انتقال‌دهنده یون‌های فلزی هستند (۱۳). به‌علاوه، گزارش شده است پپتیدهای آنتی‌اکسیدان، سلول‌ها را از آسیب به‌وسیله گونه‌های فعال اکسیژن با تحریک ژن‌ها حفظ می‌کنند.

در تحقیق حاضر، فعالیت حذف رادیکال آزاد برای محصول آبکافت پاپائین و تریپسین به ترتیب ۰/۳۱±۶۷/۶۶ و ۰/۲۲±۵۲/۱۷٪ بود. حذف رادیکال آزاد، مکانیسم اولیه‌ای است که به‌وسیله آن مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال‌های آزادی است که در دمای اتاق پایدار است (۲۲). اثر آنتی‌اکسید آنها روی حذف رادیکال آزاد DPPH به دلیل فعالیت هیدروژن‌دهندگی بوده و لذامی‌توانند واکنش زنجیره‌ای اکسیداسیون را مهار کنند.

مطالعه روی پروتئین آبکافت اویستر (*S. cucullata*) نیز نشان داد این پروتئین در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، فعالیت حذف رادیکال آزاد بالایی دارد (۰/۳۷±۸۵/۷٪). همچنین گزارش شده است پروتئین آبکافت اویستر احتمالاً حاوی پپتیدهایی است که الکترون‌دهنده بوده و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد برای تبدیل آنها به محصولات پایدار و خنثی نمودن واکنش زنجیره‌ای رادیکال واکنش نشان دهند (۲۳).

در مطالعه حاضر فعالیت کلاته‌کنندگی یون فلزی برای محصول آبکافت پاپایین و تریپسین به ترتیب ۰/۱۲±۸۸/۳۴ و ۰/۰۹±۷۷/۱۱ ٪ به دست آمد. آهن به دلیل داشتن توانایی در تولید رادیکال آزاد از واکنش فنتون، حایز اهمیت است. واکنش فنتون، واکنشی بین نمک آهن فرو و پراکسیدها بوده که رادیکال هیدروکسیل تولید می‌کند.

حمله رادیکال‌های هیدروکسیل نیز می‌تواند منجر به آغاز پراکسیداسیون لیپیدها در بدن انسان شود. همچنین به حداقل رساندن یون فرو در واکنش فنتون می‌تواند جلوی خسارت‌های اکسیداسیونی را بگیرد (۲۴). Alemán و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز گزارش کردند بیشترین فعالیت حذف یون آهن، در ژلاتین آبکافت پوست اسکوئید تولیدشده با آلکالاز و در ژلاتین آبکافت پوست ماهی تُن تولیدشده با تریپسین اتفاق می‌افتد (۲۵).

در تحقیق حاضر میزان قدرت کاهشی نسبت به شاهد، اختلاف معنی‌داری داشت و کمتر بود، اما با افزایش غلظت پروتئین، قدرت کاهشی نیز افزایش یافت. در تحقیقی گزارش شده است قدرت کاهشی پروتئین آبکافت اویستر (*S. cucullata*) با افزایش غلظت افزایش می‌یابد، که این یافته با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت (۲۳). در مطالعات متعددی نیز آمده است ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهشی ترکیبات زیست‌فعال وجود دارد.

در مطالعات دیگر،پروتئین آبکافت کاتالیزشده با آنزیم‌های مختلف، سطوح متفاوتی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داده است. مکانیسم زیست‌فعال چنین پپتیدهایی، به‌خوبی شناسایی‌نشده و فقط تعداد کمی‌از مطالعات به ارتباط بین فعالیت و ساختار درونی پرداخته است (۲۶). به‌علاوه، بیشتر محققین با حضور اسیدهای آمینه متفاوت که در پپتیدها نقش مهمی‌در خصوصیات آنتی‌اکسیدان بازی می‌کنند توافق دارند. بنابراین، مکانیسم منفرد آنتی‌اکسیدانی نمی‌تواند برای توجیه فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل به کار رود. خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب، ساختار و آبگریزی می‌باشد (۲۷). در این میان، ترکیب اسیدهای آمینه، نقش اساسی ایفا می‌کند. مطالعات متعدد نشان می‌دهد سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها، خواص آنتی‌اکسیدان پروتئین آبکافت را تعیین می‌کند. همچنین توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز در این امر مهم است. برای مثال اسیدهای آمینه آبگریز اسیدی از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کرده و به‌عنوان دهنده پروتون به رادیکال‌های پروکسیل هیدروفوبیک، همچنین کلاته‌کننده یون فلزی عمل می‌کنند. به‌علاوه پپتیدهای حاوی هیستیدین نیز به‌عنوان کلاته‌کننده

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

یون فلزی عمل کرده که شاید به دلیل ساختار حلقه‌ای آن باشد (۲۵). در تحقیق حاضر میزان اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین، متیونین، لوسین، سیستئین و پرولین در هر دو نوع پروتئین آبکافت، بالا بود. گزارش شده است اسیدهای آمینه عطرزا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین (۱۳) و اسیدهای آمینه آبگریز مانند والین، لوسین، آلانین و متیونین، نقش حیاتی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند (۲۸). Suetsuna و همکاران (سال ۲۰۰۰) نشان دادند گروه‌های فنولیک هیدروکسیل در اسیدهای آمینه آروماتیک، عامل مهار رادیکال آزاد (به‌عنوان دهنده الکترون) می‌باشند و اسیدهای آمینه هیستیدین، پرولین، آلانین و لوسین نیز در این امر دخیل هستند (۲۹). محققین گزارش کردند بین اسیدهای آمینه؛ تیروزین، تریپتوفان و متیونین، بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و سپس هیستیدین، سیستئین و فنیل‌آلانین قرار دارند. البته باید توجه داشت در کنار ترکیب اسیدهای آمینه، توالی قرار گرفتن اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز مهم است. در تحقیقی، Rajapakse و همکاران (سال ۲۰۰۵) نشان دادند فعالیت بالای حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت یا پپتیدهای مشتق از ماهیچه اسکوبید غول‌پیکر، عموماً در ارتباط با ترکیب بالای اسیدهای آمینه هیدروفوبیک و یا آبگریزی بالای این پپتیدها می‌باشد. نتایج اثبات کرده است کارآیی هیدروژن‌دهندگی پپتیدها در محصول آبکافت، وابسته به نوع آنزیم به‌کار رفته است (۱۳). همچنین Suetsuna و همکاران (سال ۲۰۰۰) دریافتند تغییر در اندازه، سطح و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد پپتیدها روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد (۲۹). پروتئاز در انواع مختلف، پیوندهای پپتیدی را در جایگاه‌های مختلف می‌شکند و محصولات متفاوتی با خواص آنتی‌اکسیدانی متفاوت ایجاد می‌کند. پاپایین خواص نسبتاً گسترده‌ای دارد. این آنزیم برای سوبسترا، اختصاصی عمل کرده و ابتدا روی پیوندهای اسیدهای آمینه آبگریز یا عطرزا می‌نشیند (۳۰). در تحقیق حاضر شاید چنین خصوصیاتی در مقایسه با تریپسین منجر به بروز خواص آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به محصول پاپائین شده است.

از سوی دیگر، ارزش غذایی مواد غذایی به نوع و مقدار اسیدهای آمینه موجود مورد نیاز برای بدن بستگی دارد. در مطالعه حاضر از شاخص شیمیایی جهت تعیین ارزش غذایی این پروتئین آبکافت استفاده گردید. نتایج نشان داد شاخص شیمیایی محصولات تولیدی بجز در اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و فنیل‌آلانین در بقیه اسیدهای آمینه ضروری، از حد استاندارد کمتر است، لذا این محصولات در صورت تأیید نهایی، از ارزش غذایی بالایی برخوردار نبوده و تنها از نظر داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی مهم می‌باشند. بنابراین،نمی‌توان برای این محصولات، توصیه غذایی کرد و کارآزمایی بالینی توجیه‌پذیر است. در جمع‌بندی می‌توان گفت پروتئین آبکافت تولیدشده از صدف اویستر با آنزیم پاپایین و پس از آن تریپسین، قدرت آنتی‌اکسیدانی خوبی نشان می‌دهد و ترکیب اسیدهای آمینه مناسب در این مسئله دخیل است.

نتیجه‌گیری

صدف اویستر منبع بسیار خوبی برای تهیه محصولات با ارزش افزوده می‌باشد و درصورتی‌که از این منبع پروتئین آبکافت تولید شود پپتیدها و اسیدهای آمینه تولیدی، توانایی بسیار خوبی در حفاظت از اکسیداسیون خواهند داشت و می‌توانند سیستم‌های بیولوژیک و غذایی را از خطر این رادیکال‌های آزاد و اکسیداسیون حفظ کنند. لذا استفاده از این پروتئین آبکافت در صنایع دارویی به‌عنوان مکمل می‌تواند اثر سلامتی‌بخش داشته باشد و در صورت برنامه‌ریزی، تولید صنعتی نیز می‌تواند زمینه‌سازی برای صادرات این محصول محسوب گردد. در این خصوص، مطالعات تکمیلی در سیستم‌های مدل و درون موجود زنده برای توصیه غذایی این فرآورده ضروری است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شده است و نویسندگان مقاله، از این دانشگاه به جهت حمایت از تحقیق، کمال تشکر را دارند.

www.SID.ir

Archive of SID

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

References:

1. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. J Nutr 2001;131(3s):1010-15.

2. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. Br Med Bull 1999;55(1):49-75.

3. Nazeer RA, Deeptha R, Jaiganesh R, Sampatkumar NS, Yousef-Naghsh S. Radical scavenging activity of Seela (Sphyraena barracuda) and Ribbon fish (Lepturacanthus savala) backbone protein hydrolysates. Int J Peptide Res Ther 2011;17(3):209-16.

4. Hettiarachchy NS, Glenn KC, Gnanasambandam R, Johnson MG. Natural antioxidant extracts from fenugreek (Trigonella foenumgraecum) for ground beef patties. J Food Sci 1996;61(3):516-19.

5. Suetsuna K, Maekawa K, Chen J. Antihypertensive effects of Undaria pinnatifida (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. J Nutr Biochem 2004;15(5):267-72.

6. Picot L, Bordenave S, Didelot FAI, Fruitier-Arnaudin I, Sannier F, Thorkelsson G, et al. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Process Biochem 2006;41(5):1217–22.

7. Hartmann R, Meisel H. Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. Curr Opin Biotechnol 2007;18(2):163–69.

8. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. Trends Food Sci Technol 2001;11(9-10):347–56.

9. Bougatef A, Arroume NN, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (Sardinella aurita) by-products proteins. Food Chem 2010;118(3):559-65.

10. Qian ZJ, Jung WK, Byun HG, Kim SK. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster (Crassastrea gigas) against free radical induced DNA damage. Bioresour Technol 2008;99(9):3365–71.

11. Nazeer RA, Divya Prabha KR, Sampath Kumar NS, Jai Ganesh R. Isolation of antioxidant peptides from clam, Meretrixcasta (Chemnitz). J Food Sci Technol 2013;50(4):777–83.

12. Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (Paralichthys olivaceus) using proteases. Food Chem Toxicol 2013;52:113–20.

13. Rajapakse N, Mendis E, Jung WK, Je JY, Kim SK. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Res Int 2005;38(2),175–82.

14. Taheri A, Abedian Kenari A, Motamedzadegan A, Habibi Rezaie M. Optimization of gold stripe sardine (Sardinellagibossa) protein hydrolysate using Alcalase® 2.4L by RSM. CyTA J Food 2011;9(2):114–20.

15. Amit KR, Jini R, Swapna HC, Sachindra NM, Bhaskar N, Baskaran V. Application of native lactic acid bacteria (LAB) for fermentative recovery of lipids and proteins from fish processing wastes: Bioactivities of fermentation products. J Aquatic Food Product Technol 2011;20(1):32–44.

16. Benjakul S, Visessanguan W, Phongkanpai V, Tanaka M. Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince. Food Chem 2005;90(1-2):231–9.

17. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of Rumex crispus L. extracts. J Agric Food Chem 2001;49(8):4083–9.

18. Flynn KJ. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. Chem Ecol1988;3(4):269–93.

www.SID.ir

Archive of SID

19. Cheison SC, Wang Z, Xu SY. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. J Food Eng 2007;80(4):1134-45.

20. FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. Geneva: FAO/WHO and United Nations University, Series No. 724; 1985. p. 116-29.

21. Qian ZJ, Jung WK, Kim SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Ranacates beiana Shaw. Bioresource Technology 2008;99(6):1690–8.

22. Zhong S, Ma C, 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.

23. Umayaparvathi S, Arumugam M, Meenakshi S, Dräger G, Kirschning A, Balasubramanian T. Purification and characterization of antioxidant peptides from oyster (Saccostrea cucullata) hydrolysate and the anticancer activity of hydrolysate on human colon cancer cell lines. Int J Peptide Res Ther 2014;20(2):231-43.

24. Borah A, Yadav RNS, Unni BG. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of Alternanthera sessilis. Int J Res Pharm Sci 2011;2(6):1502–6.

25. Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudin I, Gómez-Guillén MC, Montero P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Res Int 2011;44(4):1044–51.

26. Hernández-Ledesma B, Contreras MM, Recio I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. Adv Colloid Interface Sci 2011;165(1):23–5.

27. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. J Agric Food Chem 1998;46(1):49–53.

28. Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. J Agric Food Chem 2005;53(3):581–7.

29. Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. J Nutr Biochem 2000;11(3):128–31.

30. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. J Mol Catal B Enzym 2013;90:1–11.

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

www.SID.ir

Archive of SID

A Study of Antioxidant Properties of Two Types of Protein Hydrolysate Produced by Oyster

Ali Taheri[1], Amin Ojifard[2], Samira Jalalinezhad[3], Behnam Mozaffari[4]*

[1]*Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.*

[2]*Faculty of Agriculture & Natural Resources, Persian Gulf University Bushehr, Bushehr, Iran.*

[3]*Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran.*

[4]*Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran.*

[*]***Corresponding Author:***
Ali Taheri, Faculty of Marine Sciences, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.

Email: taheri@cmu.ac.ir

Received: 9 Oct, 2014

Accepted: 5 May, 2015

Downloaded from journal.muq.ac.ir at 10:40 IRST on Saturday March 5th 2016

Abstract

Background and Objectives: Todays, oxidative stress that leads to change in the quality of food and incidence of various diseases, such as cancer and other diseases in the human body, has drawn attention. In this study, antioxidant effects and profile of amino acid composition of products were investigated.

Methods: In this study, protein hydrolysate was produced from oyster (*Saccostrea cucullata*) by papain and trypsin enzymes. The antioxidant activity of the product was measured using free radical scavenging activity (DPPH), chelating activity, and iron reduction activity in two different concentrations of 0.5 and 1 mg/ml protein. Also, the amino acid composition of the products was assessed by high-performance liquid chromatography, and the chemical score was calculated.

Results: The highest DPPH free radical scavenging activity, chelating activity, and iron reduction power for papain products were respectively determined to be 67.66±0.31%, 88.34±0.12%, and 0.99±0.12 and for trypsin products were estimated 52.17±0.22%, 77.11±0.09%, and 0.65±0.02, respectively. The highest antioxidant activity was seen in the concentration of 1mg/ml ($p<0.05$). The highest percentage of the essential amino acids was for histidine, lysine, leucine, and methionine. The chemical index for histidine, lysine, and methionine was above 1 and for the other essential amino acids was determined below one.

Conclusion: According to the findings of this study, the protein hydrolysate produced from oyster by the papain and then trypsin enzymes, showed a good antioxidant activity, in which the appropriate hydrophobic amino acid composition involves. The products could be used for pharmaceutical exports after clinical trial.

Keywords Protein hydrolysates; Antioxidants; Papain; Trypsin; Amino acids.

www.SID.ir