فصلنامه علمی ـ پژوهشی دورهٔ ۵، شمارهٔ ٤، زمستان ۱۳۹۵، صفحه ٤۳- ٥٦

فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین ایزوله عضله کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) با استفاده از عصاره آنزیمی ضمائم پیلوریک

عباس زمانی*[۱]، مریم خواجوی[۲]

۱- استادیار گروه شیلات دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست دانشگاه ملایر، همدان
۲- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان

دریافت: ۹٤/۱۱/۰۳ پذیرش: ۹٥/۰۳/۲۳

*نویسنده مسئول مقاله: a.zamani@malayeru.ac.ir

چکیده:

اکسیداسیون چربی یکی از فرایندهای اصلی در کاهش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای انواع مواد غذایی محسوب می‌شود. هدف از انجام این تحقیق تعیین فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین ایزوله عضله کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) بود که با استفاده از آنزیم تریپسین موجود در عصاره استخراج شده ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی تولید شد. بررسی نشان داد دما و pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین برای هیدرولیز سوبسترای **BAPNA** (Nα- benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) به‌ترتیب ٦۰ درجه سانتی‌گراد و ۸/۰ بود. فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین ایزوله نیز نشان داد که با افزایش درجه هیدرولیز از ۲۰ تا ٤۰ درصد، میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH و ABTS و همچنین قدرت ضداکسیدانی بازدارندگی آهن (FRAP) به‌طور معناداری افزایش یافت ($p<۰/۰٥$). نتایج پیشنهاد می‌کند آنزیم تریپسین موجود در عصاره مستخرج شده ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی می‌تواند ابزار مناسبی برای تولید پپتید از پروتئین ایزوله این گونه با فعالیت ضداکسیدانی محسوب شود و جایگزین مناسبی برای آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در تولید پروتئین هیدرولیز شده مانند آنزیم میکروبی باشد.

کلید واژگان: ضداکسیدانی، پروتئین ایزوله، هیدرولیز آنزیمی، *Clupeonella cultriventris caspia*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

مقدمه

امروزه حجم زیادی از مواد غنی از پروتئین ناشی از فراوری محصولات دریایی بدون بازیابی مناسب به‌طور مستقیم به دریا تخلیه شده و یا برای تولید محصولات با ارزش افزوده پایین در نظر گرفته می‌شود. بازیابی پروتئین‌های موجود در این مواد جنبی و تبدیل آنها به فراورده‌های با ارزش افزوده بالا، مانند پپتیدهای زیست فعال، می‌تواند جایگزین مناسبی تلقی شده و به‌دلیل دارا بودن عملکردهای فیزیولوژیک مانند ضد فشار خون و فعالیت ضداکسیدانی برای کاربردهای غذایی و دارویی محصولات مناسبی به‌شمار روند (Naqash and Nazeer, 2010; Roslan et al., 2014; Zamani and Benjakul, 2015). براساس آمار ارائه شده از سوی فائو، میانگین تولید آبزیان در جهان از سال ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۲، حدود ۱٤۹ میلیون تن می‌باشد که از این میزان حدود ۹۱ میلیون تن آن متعلق به صید از منابع آبی است که ۲۹/۵ درصد آن به پودر ماهی تبدیل می‌شود (FAO, 2014). احتمالاً بیش از ۵۰ درصد باقیمانده بافت ماهیان به‌عنوان ضایعات تلقی شده و استفاده بهینه غذایی برای آنها متصور نیست (Kristinsson and Rasco,2000; Safari et al.,2012). با افزایش چشمگیر جمعیت جهان و محدودیت‌های موجود در صید آبزیان، بدیهی است که استفاده از منابع دریایی باید با پیش‌بینی هوشمندانه‌تری صورت گیرد. از متداول‌ترین روش‌ها برای بازیابی پروتئین از بقایای مواد حاصل از فراوری ماهی می‌توان به روش‌های شیمیایی و آنزیمی اشاره کرد که امکان تولید طیف گسترده‌ای از مواد غذایی یا فراورده‌های صنعتی با کاربردهای متنوع را فراهم می‌کند. یکی از این روش‌های مؤثر و کارامد، روش آنزیمی می‌باشد که دارای مزایایی از جمله شرایط ملایم واکنش، پایین بودن میزان محصولات نامطلوب و بالابودن کیفیت محصول تولیدی است و منابع استفاده شده می‌تواند مواد باقیمانده از فراوری آبزیان یا گونه‌های فاقد ارزش تجاری و خوراکی باشد. معمولاً هضم آنزیمی پروتئین‌ها از طریق شکست پیوندهای پپتیدی با استفاده از آنزیم‌های پروتئولیتیک میکروبی (مانند آلکالاز، نئوتراز، پروتامکس و....) در صنایع غذایی کاربردهای زیادی دارد (Cassia et al., 2000; Kristinsson and Rasco, 2000; Safari et al., 2012; Roslan et al., 2014). اکسیداسیون چربی یکی از فرایندهای اصلی در کاهش کیفیت و ارزش تغذیه‌ای در انواع مواد غذایی محسوب می‌شود و علاوه بر این منجر به تولید محصولات سمی می‌گردد که می‌تواند علت اصلی بروز بیماری‌های مهمی مانند قلبی عروقی، سرطان و اختلالات عصبی و همچنین پیری زودرس به‌شمار رود (Kinsella, 1987; Khantaphant et al., 2011). برای جلوگیری از بروز این مشکلات در اثر اکسیداسیون چربی از طریق تولید رادیکال آزاد، ضداکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی به‌طور گسترده استفاده می‌شوند به‌طوری‌که انواع مصنوعی به‌دلیل ایجاد سمیت در طولانی مدت، خود به نوعی مشکلاتی را برای مصرف‌کنندگان ایجاد می‌کنند. بنابراین علاقه رو به رشد برای استفاده از ضداکسیدان‌های طبیعی، به‌ویژه پپتیدهای مشتق شده از پروتئین هیدرولیزشده مواد غذایی وجود دارد (Tavano, 2013). امعا و احشای ماهیان یک منبع بالقوه آنزیمی از جمله پروتئازها است که دارای برخی خواص منحصر به‌فرد برای کاربردهای صنعتی می‌باشد (Klomklao et al., 2014).

یکی از مهم‌ترین آنزیم‌های پروتئازی موجود در امعا و احشای ماهیان به‌ویژه ضمائم پیلوریک، آنزیم تریپسین (EC 3.4.21.4) است که نقش بسیار مهمی در هیدرولیز پروتئین دارد (Khantaphant and Benjakul, 2008;

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

Klomklao et al.,2010).کیلکا ماهیان از مهم‌ترین ماهیان پلاژیک دریای خزر محسوب می‌شوند که در تهیه پودر ماهی استفاده می‌شوند و صید آن در سال ۱۳۹۲ به میزان ۲۳۲۲۱ تن بوده است (Shilat, 2013). کیلکا ماهیان دریای خزر متعلق به جنس Clupeonella بوده و شامل سه گونهٔ کیلکای معمولی (*C.cultriventris caspia*)، کیلکای آنچوی (*C.engrauliformis*) و کیلکای چشم درشت (*C.grimmi*) می‌باشند که در بین این گونه‌ها، کیلکای معمولی بیش از ۹۰ درصد صید را به خود اختصاص داده است (Karimzadeh et al., 2010). این ماهی همانند سایر ماهیان کوچک پلاژیک دارای فعالیت بالایی از پروتئازها به‌ویژه آنزیم تریپسین در امعا و احشا است و می‌تواند منبع خوبی از این آنزیم بوده و بجای آنزیم‌های با منبع میکروبی برای تهیه پروتئین هیدرولیزشده با فعالیت ضداکسیدانی استفاده شود (Kishimura et al., 2005; Castillo-Yanez et al., 2005; Zamani and Benjakul, 2015).

هدف از انجام این مطالعه تهیه عصاره ضمائم پیلوریک از کیلکای معمولی و استفاده از آن برای تهیه پروتئین هیدرولیز شده از عضله این گونه است و سپس فعالیت ضداکسیدانی پپتیدهای حاصل از پروتئین هیدرولیز شده ارزیابی می‌شود.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه ماهی

ماهی کیلکای معمولی مورد نیاز در این مطالعه از صیدگاه شهرستان بابلسر تهیه گردید. ماهیان پس از صید در داخل یک ظرف یونولیتی با نسبت ۱ به ۲ با یخ مخلوط و به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از انتقال ماهیان به آزمایشگاه، ضمائم پیلوریک به‌عنوان منبع آنزیم تریپسین از ۱۸۰ نمونه در حضور یخ جدا شده و در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمایش‌ها نگهداری شدند (Zamani and Benjakul, 2015). وزن متوسط و طول کل ماهیان به‌ترتیب ۱/۵± ۱۰/۵ گرم و ۰/۵± ۱۲/۴۵سانتی‌متر بودند.

چربی‌زدایی و آماده‌سازی نمونه‌ها

نمونه ضمائم پیلوریک برای مدت ٤ ساعت در دمای یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت تا از حالت انجماد خارج شود. سپس عمل چربی‌زدایی با استفاده از استون سرد (۲۰- درجه سانتی‌گراد) انجام شد که ابتدا نمونه تعیین حجم شده و با استون سرد با نسبت ۱ به ۳ مخلوط گردید و برای مدت ۱ دقیقه عمل یکنواخت‌سازی با دستگاه همگن‌ساز (Hand Held WT130 homogenizer, Lab Tissue & Cell Tearor, Malysia) در حضور یخ انجام شد. سپس نمونه یکنواخت شده با کمک کاغذ صافی (Whatman grade No. 2, Lawrence, Kansas, USA) فیلتر شده و مواد باقیمانده روی فیلتر چندین مرتبه با استون سرد شسته شدند و در نهایت مواد روی فیلتر برای مدت یک شبانه روز در دمای اتاق قرار گرفتند تا خشک شوند (El-Beltagy et al., 2005). سپس ماده خشک شده با کمک بافر استخراج (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM $CaCl_2$, 0.5M NaCl) با نسبت ۱ به ۵۰ ترکیب شده و برای مدت ۳ ساعت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد بر روی همزن مغناطیسی به آرامی مخلوط شدند. سپس مخلوط حاصل شده برای مدت ٤٥ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۱٤۰۰۰gسانتریفیوژ گردید (Hermle Z36HK) و سپس محلول رویی به‌عنوان عصاره خام آنزیمی در نظرگرفته شد (Khantaphant and Benjakul, 2010).

راسب‌سازی با آمونیوم سولفات

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

در این مرحله ابتدا برای حذف برخی پروتئین‌های غیرضروری، عصاره خام آنزیمی با کمک آمونیوم سولفات (Sigma, St. Louis, MO, USA) با درصد اشباعیت ۳۰-۰ درصد و ٦۰-۳۰ درصد برای راسب‌سازی آنزیم تریپسین مخلوط شد تا بهترین درصد حاوی بیشترین فعالیت آنزیم تریپسین به‌دست آید. برای این منظور ابتدا آمونیوم سولفات تا حصول اشباعیت ۳۰ درصد در حضور یخ به‌آرامی به نمونه اضافه شد تا به‌خوبی حل شود. پس از ۲ ساعت، نمونه در سانتریفیوژ، در ۱٤۰۰۰ g در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد برای مدت ٤٥ دقیقه قرار گرفت. سپس قسمت رسوب‌یافته جمع‌آوری و در ۵ ml بافر استخراج حل شد و محلول رویی نیز مجدد با آمونیوم سولفات تا حصول اشباعیت ٦۰ درصد مخلوط گردید و پس از ۲ ساعت در ۱٤۰۰۰ g در دمای٤ درجه سانتی‌گراد برای مدت ٤٥ دقیقه سانتریفیوژ شد. قسمت رسوب‌یافته جمع‌آوری و در ۵ ml بافر استخراج حل شد. نمونه حاصل از اشباعیت ۳۰-۰ درصد و ٦۰-۳۰ درصد پس از حل شدن در بافر استخراج در کیسه دیالیز (Sigma, St. Louis, MO, USA) ریخته و برای یک شبانه روز در حضور بافر استخراج عمل دیالیز در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به‌منظور حذف یون‌های آمونیوم سولفات انجام شد. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در درصدهای مورد آزمایش سنجش گردید. بیشترین فعالیت آنزیم در ٦۰-۳۰ درصد مشاهده شد. در نتیجه این درصد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده انتخاب شد.

تعیین دما و pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین

برای تعیین دما و pH بهینه به‌منظور هیدرولیز پروتئین به‌وسیلهٔ آنزیم تریپسین، دمای بهینه از طریق مخلوط شدن نمونه آنزیمی با محلول سوبسترا- بافر (۱ میلی‌مولار BAPNAدر بافر 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10mM $CaCl_2$) و انکوباسیون به‌مدت ۲۰ دقیقه در دماهای مختلف شامل ۲۵، ۳۵، ٤۵،۵۰، ۵۵،٦۰، ٦۵ و ۷۰ درجه سانتی‌گراد تعیین گردید. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ٤۱۰nm اندازه‌گیری شد (Erlanger et al., 1961; Khantaphant and Benjakul, 2010). برای تعیین pH بهینه، ابتدا محلول سوبسترا- بافر با pHهای مختلف (۱میلی‌مولار BAPNA در بافرهای ذکر شده در جدول ۱) تهیه و سپس با نمونه آنزیمی مخلوط گردید و برای ۲۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد به حالت انکوباسیون قرارگرفت. سپس فعالیت آنزیم تریپسین در طول موج ٤۱۰nm اندازه‌گیری شد (Erlanger et al., 1961; Khantaphant and Benjakul, 2010).

جدول۱ انواع بافرهای استفاده شده برای آماده‌سازی محلول بافر- سوبسترای ۱ میلی‌مولار BAPNA

بافر شماره ۱: 50 mM acetic acid–sodium acetate, pH 4.0-6.0, 10mM $CaCl_2$
بافر شماره ۲: 50 mM Tris-HCl, pH 7.0-9.0, 10mM $CaCl_2$
بافر شماره ۳: 50 mM Glycine-NaOH, pH 10.0-11.0, 10mM $CaCl_2$

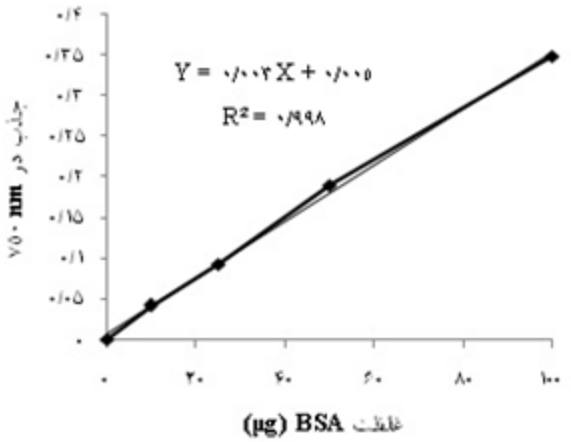
سنجش فعالیت آنزیم تریپسین و پروتئین محلول

برای سنجش فعالیت آنزیم تریپسین از روش Erlanger و همکاران (۱۹٦۱) و از سوبسترای BAPNA (Nα- benzoyl-DL-argenine-ρ-nitroanilide-HCL) در بافر 50 mM Tris-HCl ,pH 8.0, 10mM$CaCl_2$استفاده گردید و قرائت نوری در طول موج ٤۱۰nm انجام شد. برای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

سنجش میزان پروتئین محلول در نمونه‌ها از جمله نمونه هیدرولیز شده از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) استفاده گردید. در این روش از آلبومین سرم گاوی با غلظت / mg ۱ ml به‌عنوان استاندارد استفاده شد و قرائت نوری نمونه‌ها در ۷۵۰ nm انجام شد (شکل ۱).



شکل ۱ منحنی استاندارد BSA (محور X : غلظت BSA: (µl ۱۰۰ / µg)، محور Y: جذب نوری).

تولید پروتئین ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده

برای تولید پروتئین ایزوله و پروتئین هیدرولیز شده از روش Rawdkuen و همکاران (۲۰۰۹) استفاده گردید. عضله ماهی کیلکا پس از جداسازی با کمک دست، با استفاده از چاقو به قطعات کوچک تبدیل شد و با آب مقطر سرد (۱ :۹) مخلوط شده و برای مدت ۱ دقیقه با دستگاه همگن‌ساز عمل همگن‌سازی صورت گرفت. سپس مخلوط به‌دست آمده در pH ۱۱/۲ تنظیم شده و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰g سانترفیوژ گردید و محل رویی حاصل شده جمع‌آوری و در pH ۵/۵ تنظیم گردید و عمل سانترفیوژ برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۵۰۰۰g انجام شد. ماده رسوب یافته به‌عنوان «پروتئین ایزوله» در نظر گرفته شد و میزان پروتئین آن با روش کجلدل (AOAC, 2000) سنجش شد که مقدار آن معادل ۹۵/۱٤ درصد بود.

برای آماده‌سازی پروتئین هیدرولیز شده، پروتئین ایزوله با بافر 50 mM Tris-HCl ,pH 8.0 تا حصول غلظت پروتئین ۲ درصد مخلوط گردید. سپس برای مدت ۱ دقیقه با کمک دستگاه همگن‌ساز، عمل همگن‌سازی انجام شد و عمل انکوباسیون مخلوط حاصل شده برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. واکنش هیدرولیز با اضافه کردن عصاره ضمائم پیلوریک حاوی ۲/۵، ٤/۵ و٦/۵ واحد فعالیت آنزیم تریپسین(IU)، نسبت به گرم پروتئین ایزوله تا حصول تقریبی درجه هیدرولیز ۲۰، ۳۰ و ٤۰ درصد انجام شد (Benjakul and Morrissey, 1997). پس از گذشت ۱۲۰ دقیقه در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد ، ۱ میلی‌لیتر از مخلوط هیدرولیز شده با ۱ میلی‌لیتر SDS ۱ درصد (دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد) ترکیب شده و برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال کردن آنزیم تریپسین حرارت داده شد. سپس مخلوط برای مدت ۱۰ دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد در ۲۰۰۰g سانتریفیوژ گردید و مایع رویی به‌دست آمده به‌عنوان پروتئین هیدرولیز شده در نظر گرفته شد و برای تعیین فعالیت ضداکسیدانی استفاده شد.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

تعیین درجه هیدرولیز

برای تعیین درجه هیدورلیز از روش Benjakul و Morrissey (۱۹۹۷) استفاده گردید. نمونه هیدرولیز شده با بافر فسفات ۰/۲ مولار pH ۸/۲ و محلول ۰/۰۱ درصد 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) مخلوط شده و در حمام آب در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفت. برای توقف واکنش از محلول ۰/۱ مولار سولفیت سدیم استفاده گردید. سپس مخلوط واکنش برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق خنک گردید و قرائت نوری نمونه در ٤۲۰ نانومتر انجام شد و محتویات اسیدآمینه از طریق منحنی استاندارد متعلق به اسیدآمینه لوسین (غلظت ۰ تا ۵ میلی‌مولار) تعیین شد و درجه هیدرولیز نیز از فرمول زیر محاسبه گردید:

$$DH\ (\%) = [(L_t - L_0) / (L_{max} - L_0)] \times 100$$

L_t = مقدار اسید آمینه رهاسازی شده در زمان ۱۲۰ دقیقه.

L_0 = مقدار اسید آمینه در محلول پروتئین ایزوله اولیه.

L_{max} = مقدار کل اسید آمینه در محلول پروتئین ایزوله اولیه پس از هیدرولیز در ٦ HCl مولار در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد برای ۲٤ ساعت.

تعیین فعالیت ضداکسیدانی نمونه هیدرولیز شده

– فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH

برای تعیین فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH از روش Binsan و همکاران (۲۰۰۸) استفاده گردید. در این روش از DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) ۰/۱۵ میلی مولار استفاده شد و جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد.

– فعالیت بازدارندگی رادیکال ABTS

برای تعیین فعالیت بازدارندگی رادیکال ABTS از روش Binsan و همکاران (۲۰۰۸) استفاده گردید. در این روش از ABTS (2,2′-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) ۷/٤ میلی‌مولار استفاده شد و جذب نمونه در طول موج ۷۳٤ نانومتر قرائت شد.

– قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن (FRAP)

برای تعیین قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن از روش Benzie و Strain (۱۹۹٦) استفاده گردید. در این روش از TPTZ (2,4,6-tripyridyltriazine) با غلظت ۱۰ میلی‌مولار استفاده شد و جذب نمونه در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید.

برای تعیین مقدار فعالیت ضداکسیدانی ناشی از سنجش‌های فوق از منحنی استاندارد Trolox استفاده شد و مقادیر به‌صورت میکرومول Trolox درگرم پروتئین بیان گردید. غلظت پروتئین محلول برای سنجش فعالیت ضداکسیدانی ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در نظر گرفته شد.

آنالیز آماری

برای مقایسه فعالیت ضداکسیدانی بین درجات مختلف هیدرولیز پروتئین ایزوله و همچنین رسم نمودارها از نرم‌افزارهای SPSS 21 و Excel استفاده شد. برای تعیین معنادار بودن اختلاف از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) در قالب طرح کاملاً تصادفی استفاده گردید و سپس میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد مقایسه شدند. تمام ارزیابی‌ها نیز در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

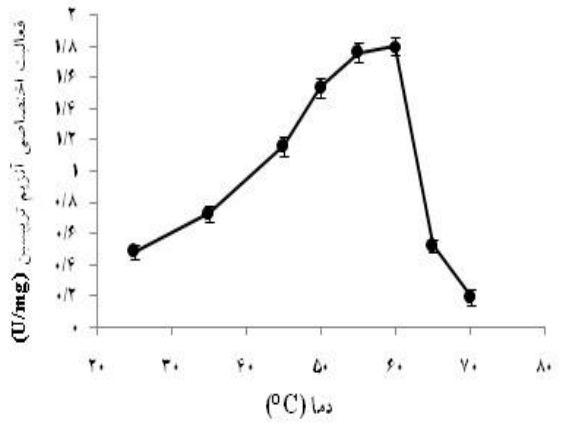
دما و pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین

نتایج حاصل از بررسی دمای بهینه آنزیم تریپسین ماهی کیلکای معمولی در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج نشان داد دمای بهینه فعالیت آنزیم تریپسین عصاره ضمائم پیلوریک برابر با ٦۰ درجه سانتی‌گراد بود، به‌طوری‌که با افزایش دما از ۲۵ تا ٦۰ درجه سانتی‌گراد، فعالیت آنزیم افزایش یافت و در ٦۰ درجه سانتی‌گراد به حداکثر خود

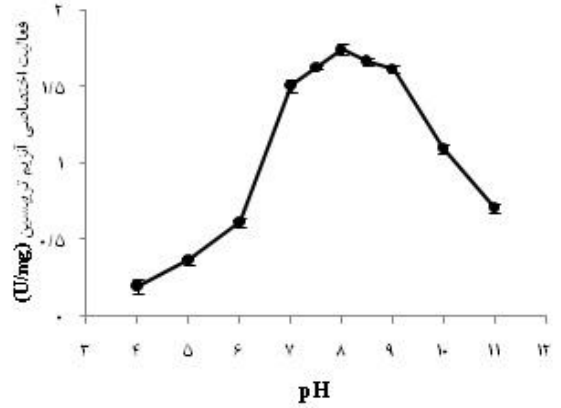
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

رسید، اما از ٦٠ تا ٧٠ درجه سانتی‌گراد یک کاهش ناگهانی در فعالیت آنزیم مشاهده شد. نتایج حاصل از بررسی pH بهینه بر فعالیت آنزیم تریپسین نیز در شکل ٣ نشان داده شده است. pH بهینه فعالیت آنزیم تریپسین برابر ٨/٠ بود و با افزایش pH از ٤/٠ تا ٨/٠ ، فعالیت آن افزایش و از pH ٨/٠ تا ١١/٠ فعالیت کاهش یافت.



شکل٢ تأثیر دما بر فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)



شکل٣ تأثیر pH بر فعالیت آنزیم تریپسین کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)

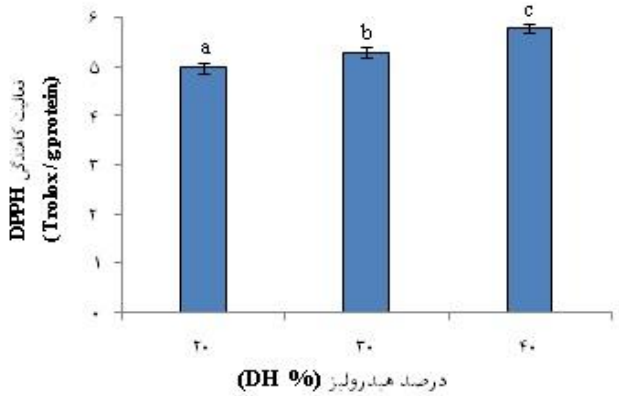
تعیین درجه هیدرولیز

نتایج حاصل از فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصل از هیدرولیز پروتئین ایزوله عضله کیلکای معمولی در شکل‌های ٤ تا ٦ نشان داده شده است. همان‌گونه که در شکل ٤ مشاهده می‌شود، با افزایش درجه هیدرولیز از ٢٠ تا ٤٠ درصد فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH افزایش یافت به‌طوری‌که درجه هیدرولیز ٤٠ درصد، نسبت به سایر درجات هیدرولیز به‌طور معناداری بالاترین فعالیت کاهندگی DPPH را داشت ($p<$ ٠/٠٥). براساس شکل ٥، نتایج حاصل از بررسی فعالیت بازدارندگی رادیکال ABTS نشان داد با افزایش درجه هیدرولیز از ٢٠ تا ٤٠ درصد، فعالیت بازدارندگی درجه هیدرولیز ٤٠ درصد نسبت به درجات هیدرولیز دیگر با افزایش معناداری همراه بود و درجه هیدرولیز ٤٠ درصد بالاترین فعالیت بازدارندگی

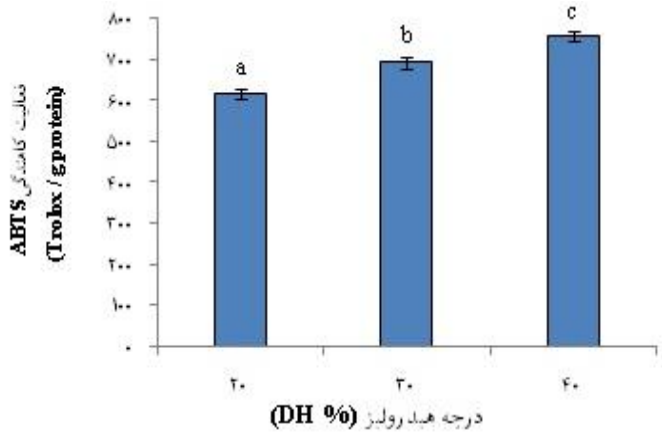
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

رادیکال ABTS را نشان داد ($p< ۰/۰۵$). قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن نیز با افزایش درجه هیدرولیز از۲۰ تا ٤۰ درصد نیز افزایش یافت و درجه هیدرولیز٤۰ درصد نسبت به ۲۰ و ۳۰ درصد به‌طور معناداری بالاترین قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن را داشت ($p<۰/۰۵$) (شکل ٦).



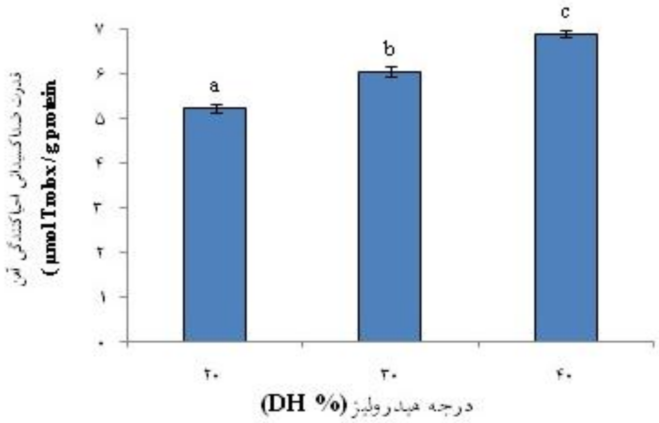
شکل٤ تأثیر درصد مختلف هیدرولیز پروتئین ایزوله حاصل از عضله کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)
بر فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH. حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار است ($\alpha = ۰/۰۵$، $n = ۳$، $Mn \pm SD$).



شکل۵ تأثیر درصد مختلف هیدرولیز پروتئین ایزوله حاصل از عضله کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)
بر فعالیت بازدارندگی رادیکال ABTS. حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار است ($\alpha = ۰/۰۵$، $n = ۳$، $Mn \pm SD$).

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]



شکل۶ تأثیر درصد مختلف هیدرولیز پروتئین ایزوله حاصل از عضله کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*)
بر میزان قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن. حروف کوچک غیرمشترک بیانگر اختلاف معنادار اسا (α = ۰/۰۵، n = ۳، Mn ± SD).

بحث

تاکنون از قسمت‌های مختلف بدن گونه‌های مختلف ماهیان، پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های میکروبی تولید شده است که دارای پپتیدهای با خواص ضداکسیدانی می‌باشند (Thiansilakul et al., 2007; Klompong et al., 2008; Khantaphant et al., 2011; Roslan et al., 2014 ; Liu et al., 2014; Silva et al., 2014; Chi et al., 2015). عضله ماهی ترکیب اسید آمینه‌ای بسیار مناسبی دارد و منبع عالی از پروتئین‌های مغذی با قابلیت هضم بالا می‌باشد. با این حال، بسیاری از گونه‌های ماهیان به‌دلیل دارا بودن قابلیت بالای فساد و دیگر مشکلات ذاتی مربوط به بوی نامطلوب، بافت و طعم کمتر استفاده می‌شوند. پروتئین‌های عضله گونه‌های مختلف ماهیان برای تولید پروتئین هیدرولیزشده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی مختلف با موفقیت بررسی شده‌اند (Bougatef et al., 2009; Hsu, 2010; Klompong et al., 2008; Nakajima et al.,2009; Nalinanon et al., 2011; Naqash and Nazeer, 2011; Raghavan and Kristinsson, 2008; Rajaram and Nazeer, 2010).

در زمینه استفاده از آنزیم‌های عصاره ضمائم پیلوریک یا امعا و احشای ماهی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهیان مطالعات بسیار اندکی انجام شده است (Khantaphant et al., 2011;Klomklao et al., 2013; Zamani and Benjakul, 2015).

فعالیت بازدارندگی رادیکال DPPH عضله ماهی کیلکای معمولی نشان داد که با افزایش درجه هیدرولیز به‌طور معناداری افزایش یافت. Nakajima و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که هیدرولیز عضله ماهی آزاد اقیانوس اطلس (*Salmo salar*) و ماهی آزاد کوهو (*Oncorhynchus kisutch*) با استفاده از آنزیم پانکرآتین باعث افزایش فعالیت کاهندگی DPPH گردید، اما اختلاف معناداری را نشان نداد. DPPH یک رادیکال به‌نسبت پایدار نیتروژن آلی است و اغلب به‌عنوان نخستین روش ارزیابی مهار رادیکال آزاد در جذب بیشینه ۵۱۷ نانومتراستفاده می‌شود. زمانی‌که DPPH با یک ماده دهنده پروتون مانند یک ضداکسیدان مواجه می‌شود، رادیکال مهار شده و جذب واکنش کاهش می‌یابد و کاهش در جذب نیز نشانه فعالیت مهارکنندگی رادیکال می‌باشد (Barkia et al., 2010). Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر عصاره امعا و احشای ماهی *Sardinella aurita* را بر فعالیت DPPH پروتئین هیدرولیز شده همین گونه بررسی کردند و نتایج آنها نشان داد که فعالیت DPPH افزایش یافت. نتایج مطالعه Nalinanon و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تأثیر آنزیم پروتئاز امعا و احشای

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

ماهی *Katsuwonus pelamis* بـر هیـدرولیز عضـله گونـه *Nemipterus hexodon* نشـان داد کـه افـزایش درجـه هیـدرولیز تـا ۲۰ درصـد افـزایش معنـاداری بـر فعالیـت بازدارندگی رادیکال DPPH داشتند. تأثیر عصـاره ضـمائم پیلوریک *Priacanthus macracanthus* بر میزان هیدرولیز ژلاتین پوست همین گونه نشان داد، افزایش هیـدرولیز تـا ۱۵ درصد باعث افزایش معناداری در فعالیت بازدارنـدگی رادیکـال DPPH گردیـد (Phanturat و همکـاران،۲۰۱۰). نتایج مطالعه Khantaphant و همکاران (۲۰۱۱) روی تأثیر عصاره ضمائم پیلوریک بر میزان هیدرولیز پروتئین عضـله مـاهی *Lutjanus vitta* نشـان داد کـه بـا افـزایش درجـه هیدرولیز، فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصل از هیـدرولیز پروتئین ایزوله افزایش می‌یابد.

فعالیـت بازدارنـدگی رادیکـال ABTS عضـله مـاهی کیلکای معمولی نشان داد که با افـزایش درجـه هیـدرولیز به‌طور معناداری افزایش یافت. نتـایج حاصـل از مطالعـه Khantaphant و همکـاران (۲۰۱۱) روی تـأثیر عصـاره ضمائم پیلوریک بر میزان هیدرولیز پروتئین عضـله مـاهی *Lutjanus vitta* نشان داد که با افزایش درجـه، هیـدرولیز فعالیت ضداکسیدانی پپتید حاصـل از هیـدرولیز پـروتئین ایزوله به‌طور معناداری افزایش می‌یابد. پروتئین هیـدرولیز شـــده حاصـــل از مـــاهی کلمـــه (*Misgurnus anguillicaudatus*) (You et al., 2009) و مـــاهی (*Selaroides leptolepis*) (Klompong et al., 2008) نیـز دارای فعالیـــت بازدارنـــدگی رادیکـــال ABTS بودنـــد. Nalinanon و همکاران (۲۰۱۱) تأثیر آنزیم پروتئاز امعـا و احشای ماهی *Katsuwonus pelamis* را بر هیدرولیز عضله گونه *Nemipterus hexodon* بررسی کردند و نتـایج آنهـا نشان داد که افزایش درجه هیدرولیز تا ۲۰ درصد افـزایش معناداری بر فعالیت بازدارندگی رادیکـال ABTS داشـتند. Phanturat و همکـاران (۲۰۱۰) تـأثیر عصـاره ضـمائم پیلوریک *Priacanthus macracanthus* بر میزان هیدرولیز ژلاتین پوست همین گونه را بررسی کردنـد و نتـایج آنهـا نشان داد افزایش هیدرولیز تـا ۱۵ درصـد باعـث افـزایش فعالیت بازدارندگی رادیکـال ABTS گردیـد امـا اخـتلاف معناداری نداشت. روش ارزیابی ABTS ابزار بسیار مناسبی برای تعیین فعالیت ضداکسیدانی بوده کـه در آن رادیکـال به‌صورت ترکیب غیرفعال رادیکال– ABTS تبدیل می‌شود. به‌طورکلی، تمام ترکیبات هیدرولیز شـده حـاوی پپتیـد یـا پروتئین که اهداکنندگان هیدروژن هسـتند، مـی‌تواننـد بـا رادیکال واکنش نشان دهنـد و آنهـا را بـه محصـولات بـا ثبات‌تر تبدیل کـرده و در نتیجـه واکـنش‌هـای زنجیـره‌ای رادیکال را حذف کنند.

قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن پپتید حاصـل از هیدرولیز عضله ماهی کیلکای معمولی نشان داد با افزایش درجه هیدرولیز از ۲۰ تا ٤۰ درصد به‌طور معناداری افزایش یافت. Phanturat و همکاران (۲۰۱۰) تأثیر عصاره ضمائم پیلوریک *Priacanthus macracanthus* بر میزان هیدرولیز ژلاتین پوست همین گونه را بررسی کردنـد و نتـایج آنهـا نشان داد افزایش هیدرولیز تـا ۱۵ درصـد باعـث افـزایش ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن گردید اما اختلاف معناداری نداشت. نتایج حاصل از مطالعه Khantaphant و همکاران (۲۰۱۱) بر روی تأثیر عصاره ضمائم پیلوریـک بـر میـزان هیدرولیز پروتئین عضله ماهی *Lutjanus vitta* نشان داد که با افزایش درجه هیدرولیز قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن پپتید حاصـل از هیـدرولیز پـروتئین ایزولـه بـه‌طـور معناداری افزایش می‌یابد. قدرت ضداکسیدانی احیاکنندگی آهن توانایی احیا شدن در برابر یـون آهـن را سـنجیده و توانایی ترکیبات هیدرولیز شده در انتقال یک الکتـرون بـه

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

رادیکال آزاد را نشان می‌دهد و از گسترش اکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند یا آن‌را به تعویق می‌اندازد.

در حال حاضر، تحقیقات زیادی در زمینه پپتیدهای ضداکسیدان مشتق شده از منابع غذایی گزارش شده و دربارهٔ رابطه بین ساختار و تأثیرگذاری پپتیدها نیز بحث شده است. پپتیدها فعالیت ضداکسیدانی مختلفی بسته به اندازه مولکولی، ترکیب اسید آمینه و توالی آن نشان می‌دهند (Samaranayaka and Li-Chan, 2011). تاکنون سازوکار دقیق عملکرد پپتیدها به‌عنوان ضداکسیدان مشخص نشده است اما بعضی از اسید آمینه‌های موجود در پپتیدها نقش مهمی در این زمینه دارند که می‌توان به هیستیدین، متیونین، سیستئین، والین، لوسین، ایزولوسین و پرولین اشاره کرد که فعالیت بالایی نسبت به اسیدهای چرب چند غیراشباع داشته و می‌توانند تأثیر مهمی در حذف رادیکاهای آزاد در مواد غذایی پرچرب داشته باشند. اسید آمینه‌های آروماتیک مانند تیروزین، فنیل آلانین و تریپتوفان به‌دلیل دارا بودن حلقه آروماتیک، توانایی اهدای پروتون به رادیکال‌های الکترونی مؤثر در ساخت گونه‌های اکسیژنی فعال و پایدار در فرایند حذف رادیکال را دارند (Sarmadi and Ismail, 2010). رادیکال‌های آزاد، به‌ویژه گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و گونه‌های نیتروژن فعال (RNS)، در بروز بیماری‌های مزمن و تحلیل‌کننده شدید مانند التهاب، بیماری‌های قلبی و عروقی، بیماری‌های عصبی، سرطان و اختلالات مربوط به پیری نقش دارند. اگرچه ROS و RNS پیامبران ثانویه در عملکردهای فیزیولوژیکی طبیعی موجودات هستند و در سازوکارهای اکسایش و کاهش مختلف شرکت دارند، تولید بیش از حد این گونه‌ها می‌تواند فعالیت آنزیم‌های محافظتی را مختل کند و باعث آثار مخرب و کشنده سلولی شود (Locatelli et al., 2009).

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند آنزیم تریپسین موجود در عصاره استخراج شده از ضمائم پیلوریک ماهی کیلکای معمولی، می‌تواند ابزار مناسبی برای تولید پپتید از پروتئین ایزوله این گونه با فعالیت ضداکسیدانی باشد، همچنین می‌تواند برای آنزیم‌های تجاری مورد استفاده در تولید پروتئین هیدرولیز شده مانند آنزیم میکروبی و پپتید حاصل شده برای ضداکسیدان‌های شیمیایی جایگزین مناسبی باشد.

منابع

AOAC, Official Methods of Analysis, 17th edition., 2000. Association of Official Analytical Chemists, Gaithersburg, MD.

Barkia, A., Bougatef, A., Khaled , H.B. and Nasri, M., 2010. Antioxidant activities of sardinelle heads and/or Viscera protein hydrolysates prepared by Enzymatic treatment. *Journal of Food Biochemistry*.34: 303–320.

Benjakul, S. and Morrissey, M., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 45:3423–3430.

Benzie, I.F.F. and Strain, J.J., 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*. 239:70–76.

Binsan, W., Benjakul, S., Visessanguan, W., Roytrakul, S., Tanaka, M. and Kishimura, H., 2008. Antioxidative activity of Mungoong, an extract paste, from the cephalothorax of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Food Chemistry.106:185–193.

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*.114:1198–1205.

Bougatef, A., Nedjar-Arroume,N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon,D. and Nasri,

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

Kinsella JE. Seafood and fish oils in human diseases. New York, USA: Marcel Dekker; 1987.

Kishimura,H., Hayashi, K., Myashita,Y. and Nonmi, Y., 2005. Characterization of two trypsin isozymes from the viscera of Japanase Anchovy (*Engraulis japonica*). *Journal of Food Biochemistry*. 29: 459-469.

Klomklao, S., Kishimura, H. and Benjakul, S., 2013. Use of viscera extract from hybrid catfish (*Clarias macrocephalus* × *Clarias gariepinus*) for the production of protein hydrolysate from toothed ponyfish (*Gazza minuta*) muscle. *Food Chemistry*. 136:1006–1012.

Klomklao, S., Kishimura, H., and Benjakul, S., 2014. Anionic trypsin from the pyloric ceca of Pacific saury (*Cololabis saira*): purification and biochemical characteristics. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 23:186–200.

Klomklao, S., Kishimura, H., Benjakul, S., Simpson, B.K., and Visessanguan, W., 2010. Cationic trypsin: A predominant protease in Pacific saury (*Cololabias saira*) pyloric caeca. *Journal of Food Biochemistry*. 34:1105–1123.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K. D., and Shahidi, F., 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*. 43: 1019-1026.

Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A., 2000. Fish protein hydrolysates:Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 40(1): 43–81.

Liu,Y., Li , X., Chen,Z., Yu, J., Wang, F., and Wang, J., 2014. Characterization of structural and functional properties of fish protein hydrolysates from surimi processing by-products. *Food Chemistry*. 151: 459–465.

Locatelli,M., Gindro,R., Travaglia,F., Coïsson,J., Rinaldi,M., Arlorio, M., 2009. Study of the DPPH-scavenging activity: Development of free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*.114: 889–897.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265–275.

M., 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*. 118: 559–565.

Cassia, R. O., Martone, C. B., and Sanchez, J. J., 2000. Characterization of fish protein hydrolysates obtained by enzymatic autolysis. *Latin American Applied Research*. 30: 241–244.

Castillo-Yanez, F., Pacheco-Aguilar, R., Garcia-Carreno, F. and Toro, M., 2005. Isolation and characterization of trypsin from pyloric caeca of Monterey sardine, *Sardinops sagax caerulea*. *Comparative Biochemistry and physiology*.140B: 91-98.

Chi, C.F.,Wang, B., Hu, F.Y., Wang, Y.M., Bin Zhang, B., Deng, S.G., and Wu, C.W., 2015. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Research International*. 73:124–129.

Erlanger, B., Kokowsky, N. and Cohen,W., 1961.The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 95: 271-278.

FAO, 2014. The state of world fisheries and aquaculture. In: FAO - Fisheries and Aquaculture Department, Food and Agriculture Organization of United Nations.

Hsu, K., 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*.122: 42–48.

Karimzadeh G., Gabrielyan B. and Fazli H., 2010. Population dynamics and biological characteristics of kilka species (Pisces: Clupeidae) in the southeastern coast of the Caspian Sea. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*. 9(3):422-433.

Khantaphant, S. and Benjakul, S., 2008. Comparative study on the protease from fish pyloric caeca and the use for production of gelatine hydrolasste with antioxidative activity, Comparative Physiology and Biochemistry. 151B: 410-419.

Khantaphant, S., Benjakul, S., and 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 Biochemistry.46 :318–327.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

Roslan, J.,Yunos, F.Md., Abdullah, N., and Kamal, S.M.M., 2014. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*. 2: 312 – 319.

Safari, R., Motamedzadegan , A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Asbjorn Gildberg, A., and Rasco, B., 2012. Use of Hydrolysates from Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Heads as a Complex Nitrogen Source for Lactic Acid Bacteria. *Food and Bioprocess Technology*. 5:73–79.

Samaranayaka, A. G. P., and Li-Chan, E. C. Y., 2011. Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods*. 3(4): 229–254.

Sarmadi, B. H., and Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*. 31(10):1949–1956.

Shilat., 2013. Iranian Fisheries Organization. Annual Report. 64 p (in Persian).

Silva, J.F.X., Ribeiro, K., Silva, J.F., Cahú, T.B., and Bezerra, R.S., 2014. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. *Animal Feed Science and Technology*. 196: 96–106.

Tavano, O. L., 2013. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 90:1–11.

Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. Journal of Food Biochemistry. 31: 266-287.

You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H., and Yang, B., 2009. Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*. 10: 235-240.

Zamani, A. and Benjakul, S., 2016. Trypsin from unicorn leatherjacket (*Aluterus monoceros*) pyloric caeca: Purification and its use for preparation of fish protein hydrolysate with antioxidative activity . Journal of the Science of Food and Agriculture.

Mullally, M. M., O'Callaghan, D. M., FitzGerald,R. J., Donnelly, W. J., and Dalton, J. P., 1994. Proteolytic and peptidolytic activities in commercial pancreatin protease preparations and their relationship to some whey protein hydrolysate characteristics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 42 (12): 2973–2981.

Nakajima, K., Yoshie-Stark, Y., and Ogushi, M., 2009. Comparison of ACE inhibitory and DPPH radical scavenging activities of fish muscle hydrolysates. *Food Chemistry*. 114: 844–851.

Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., and Shahidi, F., 2011. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*. 124: 1354–1362.

Naqash, S, Y., and Nazeer, R. A., 2010. Antioxidant Activity of Hydrolysates and Peptide Fractions of *Nemipterus japonicus* and *Exocoetus volitans* Muscle. *Journal of Aquatic Food Product Technology*. 19:180–192.

Naqash, S. Y., and Nazeer, R. A., 2013. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*. 50(5): 972-978.

Phanturat, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Roytrakul, S., 2010. Use of pyloric caeca extract from bigeye snapper (*Priacanthus macracanthus*) for the production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *LWT – Food Science and Technology*. 43:86–97.

Raghavan, S., and Kristinsson, H. G., 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated Tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56:1434–1441.

Rajaram, D., and Nazeer, R. A., 2010. Antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from marine fishes Lepturacanthus savala and Sphyraena barracuda. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. 6: 435–444.

Rawdkuen, S., Sai-Ut, S., Khamsorn, S., Chaijan, M. and Benjakul, S., 2009. Biochemical and gelling properties of tilapia surimi and protein recovered using an acid-alkaline process. *Food Chemistry*.112:112–119.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 4, Winter 2017

Antioxidative activity of peptide from protein isolate hydrolysate from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) muscle using pyloric caeca enzyme extraction

Abbas Zamani [1]*, Maryam Khajavi [2]

1- Assistant Prof., Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Malayer University, Hamedan, Iran.

2- Ph.D Student, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Golestan, Iran.

Received: 23.01.2016 Accepted: 12.06.2016

*Corresponding author: a.zamani@malayeru.ac.ir

Abstract:
Lipid oxidation is one of the major processes in deterioration of food quality and nutritional value. In this study, antioxidative activity of peptide was determined from hydrolysate of protein isolate from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) muscle using trypsin enzyme of pyloric caeca extraction. The optimum pH and temperature of trypsin enzyme for BAPNA (Nα –benzoyl -DL- argentine – ρ – nitroanilide -HCL) hydrolysis were measured 8.0 and 60 °C, respectively. The finding showed that antioxidative activities determined by DPPH, ABTS radical scavenging activities and ferric reducing antioxidant power (FRAP) increased significantly with variation of degree of hydrolysates from 20 to 40% ($p<0.05$). The results suggest that trypsin enzyme from pyloric caeca extraction could be a useful tool for peptide production from protein isolate with antioxidant activity and used as an alternative for commercial enzymes such as microbial enzymes in production of protein hydrolysates.

Keywords: Antioxidative, Protein isolate, Enzymatic hydrolysis, *Clupeonella cultriventris caspia*

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-05-20]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1395.5.4.4.5]