مجله علوم و فنون شیلات
دوره ۱۱ شماره ۲، بهار ۱۴۰۱، صفحات ۱۲۲-۱۰۶

ارزیابی ویژگی‌های زیست‌فعالی فراکسیون‌های پپتیدی حاصل از هیدرولیز آنزیمی ماهی پنجزاری باله نارنجی (*Leiognathus bindus*)

لیلا رمضان زاده[۱]، سید فخرالدین حسینی[۱]*، بهروز اکبری آدرگانی[۲]، رضا حسن ساجدی[۳]، آنان یامور[۴]

۱- گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.

۲- مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.

۳- گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.

۴- دانشکده داروسازی، دانشگاه کپنهاگ، کپنهاگ، دانمارک.

چکـــیده

در این تحقیق، در ابتدا ماهی پنجزاری باله نارنجی (*Leiognathus bindus*) توسط آنزیم آلکالاز با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱:۱۰۰ به مدت ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز و درجه هیدرولیز طی ۵ ساعت اندازه‌گیری شد. هم‌چنین نمونه هیدرولیز شده در زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز توسط غشاهای الترافیلتر با وزن‌های ۳، ۱۰ و ۳۰ کیلودالتون جداسازی شد و ۴ جزء پپتیدی به‌دست آمد. در ادامه، خاصیت ضداکسیدانی (مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS) پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز و هم‌چنین فراکسیون‌های پپتیدی اندازه‌گیری شد. درجه هیدرولیز در زمان ۲۴۰ دقیقه پس از هیدرولیز بالاترین میزان را به خود اختصاص داد (۲/۱۱± ۵۵/۴۳٪). پروتئین هیدرولیز شده ماهی دارای مقدار بالایی از اسیدهای آمینه آب‌گریز بود (۵۰/۶٪) که عامل ایجاد خاصیت ضداکسیدانی می‌باشند. نتایج مهار رادیکال DPPH نیز نشان داد که بالاترین میزان مهارکنندگی در زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز مشاهده شد (۱/۴۶± ۷۵/۵۹٪). هم‌چنین، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰-۳ کیلودالتون دارای خاصیت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها بود (۲/۹۶± ۸۰/۵۸٪ در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). بر اساس میزان مهار رادیکال آزاد ABTS، بالاترین میزان مهارکنندگی در زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز با میزان ۰/۶۳± ۵۰/۵۴٪ گزارش شد. هم‌چنین در بین همه اجزای پپتیدی، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰-۳ کیلودالتون به طور معنی‌داری دارای قدرت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر اجزای پپتیدی بود (درصد مهارکنندگی ۰/۴۴± ۸۴/۵۸٪ در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). نتایج این بررسی نشان داد که پپتیدهای حاصل از هیدرولیز آنزیمی ماهی پنجزاری باله نارنجی می‌تواند به عنوان یک ضداکسیدان طبیعی در فرمولاسیون غذاداروها مورد استفاده واقع گردد.

کـــلید واژه‌ها: ماهی پنجزاری باله نارنجی، هیدرولیز آنزیمی، پپتید زیست‌فعال، خاصیت ضداکسیدانی

نوع مقـاله

مقاله پژوهشی اصیل

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۰۱/۲۲

تاریخ چاپ الکترونیکی: ۱۴۰۱/۰۲/۰۱

***نویسنده مسول:**
hosseinisf@modares.ac.ir
شماره تماس: ۰۱۱۴۴۹۹۸۱۶۲

مقدمه

امروزه، مواد غذایی نه تنها جهت رفع گرسنگی و عرضه مواد مغذی ضروری به انسان بلکه برای جلوگیری از بیماری‌های مرتبط با رژیم غذایی و افزایش سلامت جسمی و روانی مصرف‌کنندگان مصرف می‌شوند. غذاداروها (Pharmafoods) اجزای رژیم غذایی هستند که به طور طبیعی در غذاها یافت می‌شوند و دارای مزایای سلامتی و پزشکی می‌باشند [۱]. در چند دهه گذشته، استفاده از غذاداروها، مکمل‌های غذایی و غذاهای کارکردی به دلیل افزایش علاقه به محصولات طبیعی و مزایای بالقوه سلامتی آن‌ها، محبوبیت قابل توجهی را در سطح جهانی پیدا کرده است.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

علاوه بر این، محصولات طبیعی در مقایسه با محصولات با منشاء مصنوعی، عمدتاً سمیت کم‌تری را ارائه می‌دهند [۲]. غذاداروها خواص درمانی بی‌شماری از جمله فعالیت ضددیابت، ضدفشار خون و هیپوکلسترولمیک، ضداکسیدان، ضدمیکروب و موارد دیگر را ارائه می‌دهند که عمدتا به ترکیب شیمیایی آن‌ها نسبت داده می‌شود [۳]. اگرچه این ترکیبات مانند روغن‌های امگا-۳، ویتامین‌ها، ضداکسیدان‌ها و فیبرها به طور معمول در غلظت‌های پایین به غذاها اضافه می‌شوند، اما این غلظت‌ها از لحاظ فیزیولوژی موثر بوده و موجب اثرات مفید سلامتی در انسان می‌شوند. از آن‌جایی که بیش از ۷۰٪ از سطح جهان توسط اقیانوس‌ها پوشیده شده است، تنوع گسترده جانوران دریایی، منبع غنی‌ای از ترکیبات طبیعی را ارائه می‌دهد. تحقیقات در مورد مولکول‌های بر پایه دریا، ترکیبات زیست‌فعال جدیدی پیدا کرده است که برای کاربردهای مختلف مبتنی بر غذاداروها مناسب است [۴]. تا به حال بیش از ۲۰۰۰۰ ترکیب زیست‌فعال از منابع دریایی استخراج شده است، با این‌حال، تنها بخش کوچکی از آن‌ها به طور کامل مطالعه و تا حدی مورد بهره برداری قرار گرفته‌اند. در سال ۲۰۱۸، بازار جهانی ترکیبات مشتق‌شده از دریا بیش از ۱۰ میلیارد دلار آمریکا بود که انتظار می‌رود تا سال ۲۰۲۵ با نرخ رشد سالانه ۱۱/۳٪ به ۲۲ میلیارد دلار (طی سال‌های ۲۰۱۹-۲۰۲۵) برسد [۵]. از آن‌جایی که موجودات دریایی در زیستگاه‌های پیچیده زندگی می‌کنند و در معرض شرایط سخت مانند شوری، فشار، دما و نور قرار می‌گیرند، انواع مختلفی از متابولیت‌های ثانویه شامل اسیدهای چرب اشباع‌نشده، ویتامین‌ها و مواد معدنی، پلی‌ساکاریدها، آنزیم‌ها، پپتیدهای زیست‌فعال و ضداکسیدان‌ها تولید می‌کنند که در جاهای دیگر یافت نمی‌شوند [۶]. ضداکسیدان‌ها نقش مهمی در تغذیه و سلامت انسان ایفا می‌کنند زیرا از بدن در برابر گونه های اکسیژن (ROS) فعال مانند آنیون‌های سوپراکسید، رادیکال‌های هیدروکسیل و پراکسید هیدروژن محافظت می‌کنند. ROS عامل بسیاری از بیماری‌های مختلف، از جمله سرطان، دیابت، بیماری‌های قلبی‌عروقی، آب مروارید، اختلالات نورودژنراتیو و پیری می‌باشد [۷]. امروزه، علاقه رو به رشدی در جایگزینی ضداکسیدان‌های مصنوعی با ضداکسیدان‌های طبیعی با منشاء غذایی وجود دارد زیرا دارای مزایای ارائه سلامتی با عوارض جانبی کم می‌باشند، هم‌چنین ضداکسیدان‌های مصنوعی ممکن است به عنوان عوامل جهش‌زا و سرطان‌زا عمل کنند [۸]. پپتیدهایی که دارای فعالیت ضداکسیدانی هستند ممکن است به عنوان ترکیبات کاربردی برای افزایش ایمنی و ماندگاری مواد غذایی عمل کنند [۹].

گونه‌های Leiognathidae که معمولا به نام Ponyfishes یا Slipmouths شناخته می‌شوند، ماهی‌های کوچک درخشان و دارای الگوی شنای schooling می‌باشند که در نزدیکی ساحل و در آب‌های اقیانوس آرام و هند مشاهده می‌شوند [۱۰]. این خانواده شامل ۱۰ جنس و ۵۱ گونه است که در آب‌های دریایی مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری پراکنده می‌باشند. آن‌ها دارای ابعاد کوچک تا متوسط (به ندرت بیشتر از ۱۶ سانتی‌متر) و فرم دهان کشیده می‌باشند [۱۱]. ماهی پنجزاری باله‌نارنجی (*Leiognathus bindus*) جزو خانواده کوچک Leiognathidae و راسته سوف ماهی‌شکلان می‌باشد. این گونه در خلیج فارس و قسمت غربی دریای عمان یافت می‌شود و ۵۵٪ از صید جانبی در خلیج فارس را به خود اختصاص می‌دهد [۱۲]. اکثر گونه‌های Ponyfish در خلیج فارس دارای اندازه‌های کوچک هستند و معمولا به عنوان صید ضمنی در تور ترال به دام افتاده و اکثراً برای تولید آرد ماهی استفاده می‌شوند [۱۰]. تولید ترکیبات بـا ارزش افزوده مانند پروتئین هیدرولیز شده و نیز پپتیدهای زیست‌فعال از این گونه به دلیل کوچک بودن و فقدان ارزش تجاری، می‌تواند راه را برای استفاده کامل از این گونه هموار سازد [۱۳]. اخیراً توجه زیادی جهت به‌دست آوردن پروتئین‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال از موجودات مختلف دریایی از جمله ماهی، جلبک، سخت‌پوستان و اسفنج‌ها برای کاربردهای آرایشی بهداشتی و غذادارویی شده است [۱۴]. به تازگی پپتیدهای دریایی چشم‌انداز جدیدی را برای پیشرفت‌های دارویی جدید و کارآمد باز کرده‌اند [۱۵]. پپتیدهای زیست‌فعال (حاوی۲۰-۲ اسیدآمینه) دارای عملکردهای ضداکسیدانی، ضدمیکروبی، تنظیم‌کننده سیستم ایمنی، ضدسرطانی، ضددیابت و ضدفشار خون می‌باشند [۱۶]. فعالیت‌های زیستی آن‌ها بر اساس توالی و ترکیب اسیدهای آمینه تعیین می‌شود [۱۷]. در سال‌های اخیر، مطالعات متعددی درمورد استفاده از گونه‌هایی با ارزش اقتصادی پایین، جهت بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال و هم‌چنین بررسی خاصیت ضداکسیدانی آن‌ها انجام شده است. در مطالعه ای توسط Yarnpakdee و همکاران [۱۸]، فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیلاپیای نیل (*Oreochromis niloticus*) طی ۲ مرحله هیدرولیز ارزیابی شد. پروتئین هیدرولیز شده توسط پروتئازهای آلکالاز، فلاورزیم، پروتامکس و پاپائین هیدرولیز شد. با افزایش درجه هیدرولیز تا ۴۰ درصد، فعالیت ضداکسیدانی نیز افزایش یافت. در بین تمام ترکیبات هیدرولیز

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

شده، نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز با میزان درجه هیدرولیز ۴۰ درصد بالاترین فعالیت ضداکسیدانی را نشان داد. زمانی که این نمونه توسط پاپائین هیدرولیز شد، ترکیب هیدرولیز شده حاصل بالاترین فعالیت ضداکسیدانی (رادیکال آزاد ABTS و فعالیت چلاته‌کنندگی فلزات) را برای تمام سنجش‌های آزمایش شده نشان داد. پروفایل اسید آمینه پروتئین هیدرولیز شده حاوی مقدار زیادی اسید آمینه‌های آب‌گریز بود و اسیدهای آمینه گلوتامیک/ گلوتامین، لیزین و اسید آسپارتیک/ آسپاراژین به عنوان اسیدهای آمینه غالب حضور داشتند. Bordbar و همکاران [۱۹]، گوشت سنگ ماهی (*Actinopyga lecanora*) را توسط آنزیم آلکالاز طی ۸ ساعت هیدرولیز کرده و خواص ضداکسیدانی آن را تعیین کردند. ترکیب به دست آمده دارای میزان IC_{50} به ترتیب ۰/۵ و ۰/۳۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر جهت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) و ABTS ((2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) بود. در مطالعه‌ای توسط Vázquez و همکاران [۲۰]، ضایعات کفشک ماهی (*Scophthalmus maximus*) تحت هیدرولیز آنزیمی با آلکالاز قرار گرفته و خاصیت ضداکسیدانی آن بررسی شد. تمام نمونه‌ها عملکرد بالایی از لحاظ هضم‌پذیری (بالاتر از ۸۳٪) درجه هیدرولیز قابل توجه (۳۰–۳۷٪)، محتوای بالای پروتئین محلول (بالاتر از ۶۲ گرم در لیتر) و پروفایل عالی اسید آمینه را از خود به نمایش گذاشتند. فعالیت‌های ضداکسیدانی در همه موارد مورد بررسی قرار گرفت و در میان همه نمونه‌ها، نمونه هیدرولیز امعا و احشا بالاترین میزان را دارا بود (مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS به ترتیب ۶۵/۱۵٪ و ۸۱/ ۱۲ µg BHT/mL). توزیع اندازه پپتید نشان داد که نمونه هیدرولیز امعا و احشا دارای بالاترین محتوای پپتیدهای بالای ۱۰۰۰ دالتون و زیر ۲۰۰ دالتون است. Ramezanzade و همکاران [۲۱]، اجزای پپتیدی را از ژلاتین پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تخلیص کرده و خواص ضداکسیدانی آن (شامل مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS) را سنجش کردند. ۴ جزء پپتیدی توسط لوله‌های الترافیلتر با وزن‌های کمتر از ۳، ۱۰–۳ ۳۰–۱۰ و ۳۰ کیلودالتون به‌دست آمد. اسیدهای آمینه آزاد غالب در جزء ۳۰–۱۰کیلودالتون Gly، Pro، Ala، Hyp بوده و میزان کل اسید آمینه آب‌گریز ۶۱/۵٪ بود. همه اجزای پپتیدی و پروتئین هیدرولیز شده فعالیت ضداکسیدانی بالایی را نشان دادند. علاوه بر این، فراکسیون ۳۰–۱۰ کیلودالتون بالاترین فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS را نشان داد (۶۷/۷٪ و ۷۴/۷٪ ،غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). هرچند ماهی پنجزای باله نارنجی، بخش بزرگی از صید ضمنی را شامل می‌شود (۵۵٪ از کل صید جانبی آب‌های خلیج فارس)، اما به دلیل فقدان ارزش تجاری می‌تواند به عنوان گزینه‌ای مناسب برای استخراج پپتیدهای ضداکسیدانی در نظر گرفته شود. در این راستا هدف این مقاله ابتدا هیدرولیز پروتئین ماهی پنجزاری باله نارنجی به عنوان گونه با ارزش اقتصادی پایین و سپس بررسی خواص ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده و فراکسیون‌های پپتیدی حاصل از آن شامل مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS می‌باشد.

مواد و روش‌ها

دریافت نمونه‌های ماهی و مواد اولیه

ماهی پنجزاری باله نارنجی تازه صیدشده از آب‌های خلیج فارس در استان خوزستان با طول تقریبی ۱۰ سانتی‌متر خریداری شده و در جعبه‌های حاوی یخ با نسبت ماهی به یخ ۲:۱ به آزمایشگاه علوم دریایی واقع در دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور) منتقل شد. سپس نمونه‌ها با آب سرد شستشو و در بسته‌بندی‌های پلی اتیلنی قرار داده شده و جهت ارزیابی‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره‌سازی شدند. جهت هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آلکالاز استخراج شده از باکتری*Bacillus licheniformis* تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا (فعالیت آنزیمی ۲/۴ واحد آنسون به ازای ۱ میلی‌لیتر آنزیم) استفاده گردید. سایر ترکیبات شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق نیز از شرکت‌های Merck، Sigma-aldrich و Applichem تهیه شدند.

تولید پروتئین هیدرولیزشده ماهی

پروتئین هیدرولیز شده به روش Hosseini و همکاران [۲۳] با اندکی تغییر تهیه شد. نمونه‌های منجمد ماهی پنجزاری باله نارنجی به مدت ۲۴ ساعت داخل یخچال قرار داده شد تا عمل انجمادزدائی صورت گیرد. نمونه‌ها پس از چرخ‌شدن، در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آبی قرار

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

گرفته تا آنزیم‌های درونی آن غیرفعال شد. سپس ۵۰ گرم نمونه چرخ‌شده با نسبت ۲:۱ (نمونه: آب‌مقطر) ترکیب شده و با استفاده از NaOH، pH مخلوط به ۸/۵ که فعالیت بهینه آنزیم آلکالاز می‌باشد، رسانده شد. بعد از آن، ظروف حاوی نمونه‌ها در انکوباتور (دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد) قرار داده شد. آنزیم آلکالاز بـه نسبت ۱٪ وزن مخلوط به نمونه اضافه شده و نمونه‌ها به مدت ۴ ساعت هم‌زده شدند؛ به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. نمونه‌ها بعد از خنک‌شدن، سانتریفیوژ شده و سپس مایع روماند جمع‌آوری و در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا ارزیابی‌های بعدی نگهداری شد.

سنجش پروتئین محلول و اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

مقدار پروتئین محلول در نمونه بر اساس روش Lowry و همکاران [۲۴] تعیین شد. هم‌چنین از آلبومین سرم گاوی (BSA) به عنوان پروتئین استاندارد برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد (غلظت‌های بین ۰ تا ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). درجه هیدرولیز (DH) با استفاده از تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰٪ (حجمی/حجمی) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش، اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در TCA به کل پروتئین های موجود در نمونه می‌باشد. ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی جدا شده با ۵۰۰ میکرولیتر محلول TCA مخلوط شده و سپس در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ (۸۰۰۰× g) شد. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش Lowry و همکاران [۲۴] اندازه‌گیری و میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله زیر محاسبه گردید:

$$\mathbf{DH} = \frac{\mathbf{10\%\ TCA-soluble\ N\ in\ sample}}{\mathbf{Total\ N\ in\ in\ sample}} \times \mathbf{100}$$

رابطه (۱)

$$\text{Free radical scavenging (\%)} = (A_{\text{blank}} - A_{\text{sample}})/ A_{\text{blank}} \times 100$$

رابطه (۳)

A_{sample} = جذب نمونه به همراه محلول ABTS

با استفاده از نرم‌افزار SPSS و آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و هم‌چنین آزمون دانکن درسطح معنی‌داری$p\leq05$ ، تفاوت معنی‌دار بین متغیرها تعیین شد. آزمون‌ها در ۳ تکرار انجام شده و نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شد. هم‌چنین به منظور رسم نمودارها، از نرم افزار Excel استفاده شد.

نتایج

تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به تعیین ترکیب تقریبی ماده خام اولیه بر اساس وزن خشک نمونه در جدول ۱ ارائه شده است. بر این اساس، ترکیب تقریبی از نظر فراوانی به ترتیب شامل رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر بود. رطوبت با میزان ۷۰/۹۱٪ بیش‌ترین ترکیب بدن ماهی پنجزاری باله نارنجی را به خود اختصاص داده بود. به طور کلی بدن ماهی پنجزاری باله نارنجی دارای رطوبت بالا (۷۰/۹۱٪) و پروتئین (۱۵/۴۴٪) با محتوای خاکستر کم (۳/۵٪) و چربی (۱۰٪) بود.

جدول۱. ترکیب تقریبی ماهی پنجزاری باله نارنجی؛ داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار ارائه شده‌اند (n=۳)

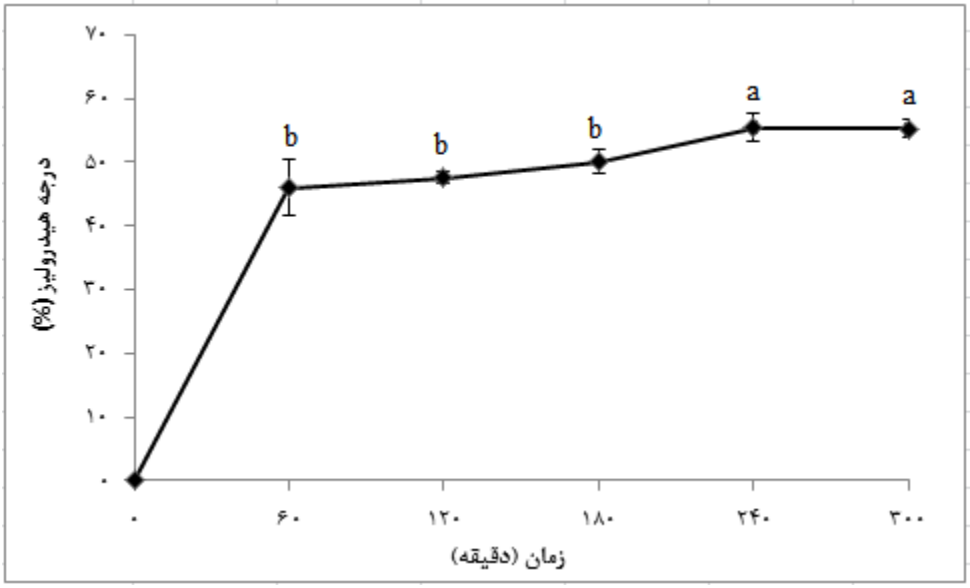
ماده	رطوبت (٪)	چربی (٪)	خاکستر (٪)	پروتئین (٪)
کل بدن	۷۰/۹۱ ±۰/۹۵	۱۰±۰/۱۸	۳/۵±۰/۰۴	۱۵/۴۴±۰/۲۲

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

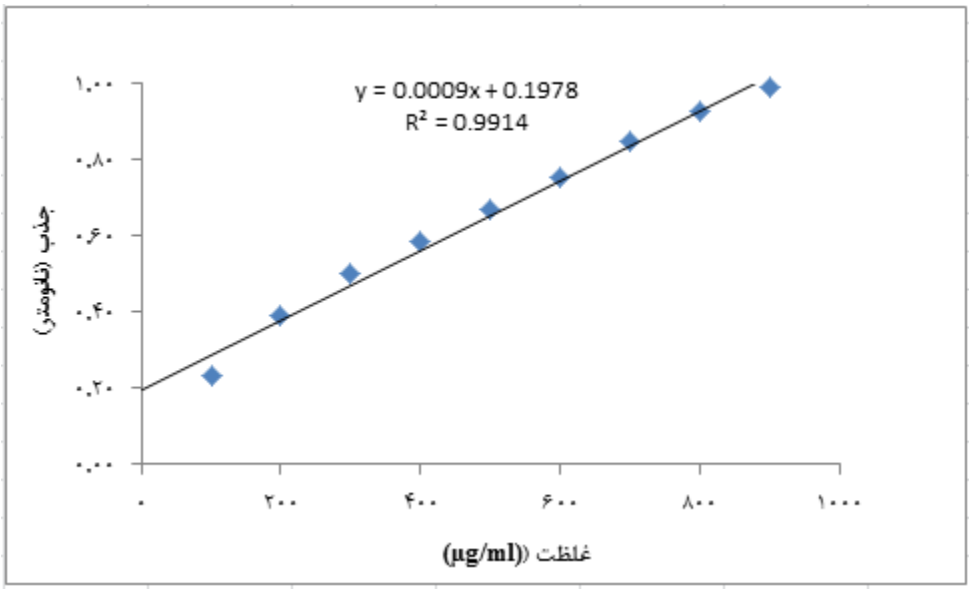
[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

نتایج مربوط به اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

روند تغییرات درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز (۰، ۶۰، ۱۲۰، ۱۸۰، ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج حاصل از آن در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱. روند تغییرات درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف (میانگین±SD). حروف انگلیسی متفاوت نشان دهنده اختلاف معنی‌دار در درجه‌های هیدرولیز می‌باشند.



شکل ۲. منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA)

بر اساس نتایج، میزان درجه هیدرولیز با افزایش مدت زمان هیدرولیز، افزایش یافت و سپس به میزان ثابتی رسید، به گونه‌ای که پس از گذشت ۶۰ دقیقه از آغاز فرآیند هیدرولیز، ۴/۴۶±۴۵/۹۷٪ و در پایان فرآیند هیدرولیز ۱/۵۲±۵۵/۲۶٪ به‌دست آمد. با وجود روند افزایشی، درجه هیدرولیز

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

بین زمان‌های ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه معنی‌دار نبود ($p>0/05$). اما با زمان‌های ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه اختلاف معنی‌دار داشتند ($p\leq0/05$). بین زمان‌های ۲۴۰ و ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز دارای بالاترین میزان درجه هیدرولیز بود (۲/۱۱± ۵۵/۴۳٪).

ترکیب اسیدهای آمینه

نتایج مربوط به تعیین ترکیب اسیدآمینه‌ها بر حسب میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم در جدول ۲ آورده شده است. کل اسید آمینه‌های بازیابی شده از هیدرولیز آنزیمی ۹۷/۷ میلی‌گرم/ ۱۰۰ گرم بود. اسیدهای آمینه‌های اصلی پروتئین هیدرولیز شده شامل گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، گلایسین، والین و لوسین بودند. مطابق با نتایج به‌دست آمده، پروتئین هیدرولیز شده غنی از اسید آمینه گلایسین بود (۱۷/۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم). هیستیدین کم‌ترین مقدار را به خود اختصاص داده بود (۰/۸ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم). همان طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، پروتئین ماهی پنجزاری باله نارنجی دارای مقدار بالایی از اسیدهای آمینه آب‌گریز (۵۰/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) بود. علاوه بر این، پروتئین هیدرولیز دارای اسید آمینه‌های آروماتیک، مانند فنیل آلانین (۳/۳ میلی‌گرم/۱۰۰گرم) و تیروزین (۴/۹ میلی‌گرم/۱۰۰ گرم) بود.

جدول ۲. ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده ماهی پنجزاری باله نارنجی

اسید آمینه	میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه
آسپارتیک اسید	۱۱/۸
گلوتامیک اسید	۱۷/۸
سرین	۷/۳
هیستیدین	۰/۸
گلایسین	۱۱/۱
ترئونین	۵/۱
آرژنین	۳/۲
آلانین	۳/۳
پرولین	۳/۴
تیروزین	۴/۹
متیونین	۲/۴
والین	۹/۲
فنیل آلانین	۳/۳
ایزولوسین	۴/۲
لوسین	۸/۸
لایزین	۱/۱
اسیدآمینه‌های آب‌گریز	۵۰/۶
اسید آمینه های آروماتیک	۸/۲
اسید آمینه های ضروری	۳۴/۹
کل اسیدهای آمینه	۹۷/۷

کل اسید آمینه‌های آب‌گریز شامل: آلانین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، فنیل آلانین، پرولین، متیونین، گلایسین؛ اسید آمینه‌های آروماتیک شامل: فنیل آلانین، تیروزین؛ اسید آمینه‌های ضروری شامل: هیستیدین، ایزولوسین، لوسین، لیزین، متیونین، فنیل آلانین، ترئونین، والین

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH

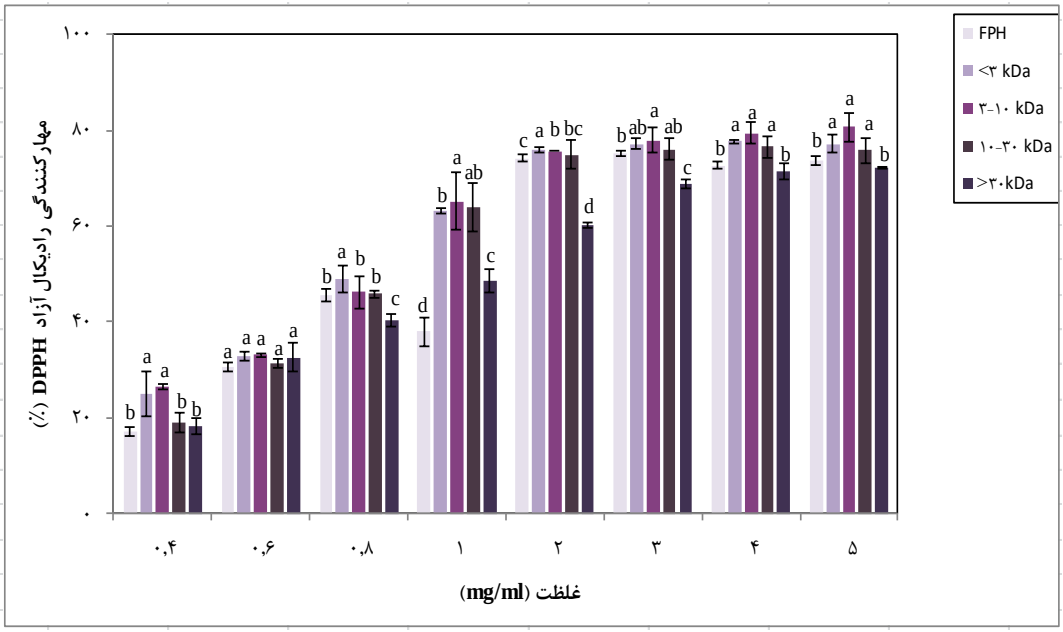
نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی ترکیب هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز نشان داد که ترکیب هیدرولیز شده دارای خاصیت ضداکسیدانی بالایی در تمامی زمان‌ها بوده و با افزایش زمان هیدرولیز، خاصیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد اما در زمان ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز اندکی کاهش یافت که معنی‌دار نبود ($p>0/05$) (جدول ۳). بالاترین میزان مهارکنندگی در زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز مشاهده شد (۱/۴۶± ۷۵/۵۹). هم‌چنین در مقایسه با نمونه کنترل (هیدرولیز نشده)، نمونه‌های هیدرولیز شده دارای خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بالاتری بودند ($p\leq0/05$). نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی اجزای پپتیدی نشان داد که همه اجزای پپتیدی (۳>، ۱۰-۳، ۳۰-۱۰ و ۳۰< کیلودالتون)، توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند و با افزایش غلظت، مهارکنندگی نیز افزایش یافت. نتایج مربوط به مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده و اجزای پپتیدی دارای وزن‌های مولکولی مختلف در غلظت‌های یکسان در شکل ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که فعالیت‌های مهار رادیکال DPPH اجزای مختلف پپتیدی به طور قابل‌توجهی تحت‌تاثیر فرآیند الترافیلتراسیون قرار دارند. فرآیند الترافیلتراسیون فعالیت مهار رادیکال DPPH را بهبود بخشید. در بین همه اجزاء، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰-۳ کیلودالتون در اکثر غلظت‌ها دارای خاصیت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها بود اما این تفاوت معنی‌دار نبود. هم‌چنین در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بالاترین توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH مشاهده شد (۲/۹۶± ۸۰/۵۸٪). از آسکوربیک اسید (ویتامین c) در غلظت‌های ۰/۱-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان یک ضداکسیدان شاهد و کنترل‌مثبت استفاده شد و فعالیت ضداکسیدانی آن در غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۸۶/۳۴٪ محاسبه شد (شکل ۴).

جدول ۳. خاصیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز آنزیمی

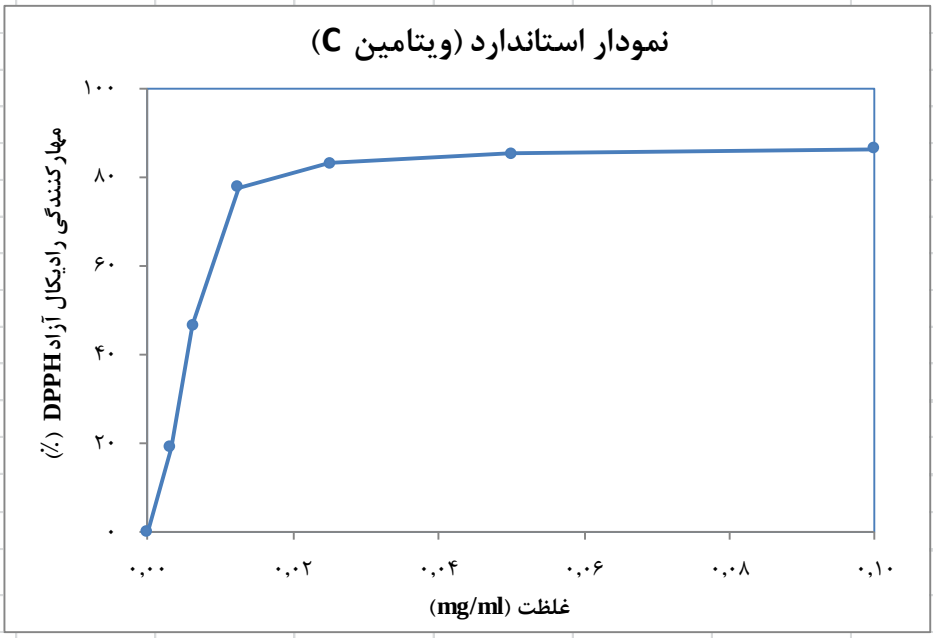
زمان (دقیقه)	مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (٪)	مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS (٪)
کنترل	۳۲/۸۸±۰/۹۹^{c}	۱۰/۶۰ ± ۰/۴^{f}
۶۰	۷۰/۲۱ ± ۰/۶۲^{b}	۲۰/۷۳ ± ۰/۶۹^{e}
۱۲۰	۷۲/۳۸ ± ۱/۶۴^{b}	۲۶/۶۷ ± ۰/۶۹^{d}
۱۸۰	۷۴/۳۵ ± ۰/۳۵^{a}	۳۲/۱۵ ± ۰/۷۱^{c}
۲۴۰	۷۵/۵۹ ± ۱/۴۶^{a}	۵۰/۵۴ ± ۰/۶۳^{a}
۳۰۰	۷۵/۳۸ ± ۰/۱۷^{a}	۴۰/۲۶ ± ۰/۲۳^{b}

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]



شکل ۳. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH اجزای مختلف پپتیدی. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد



شکل ۴. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH آسکوربیک اسید

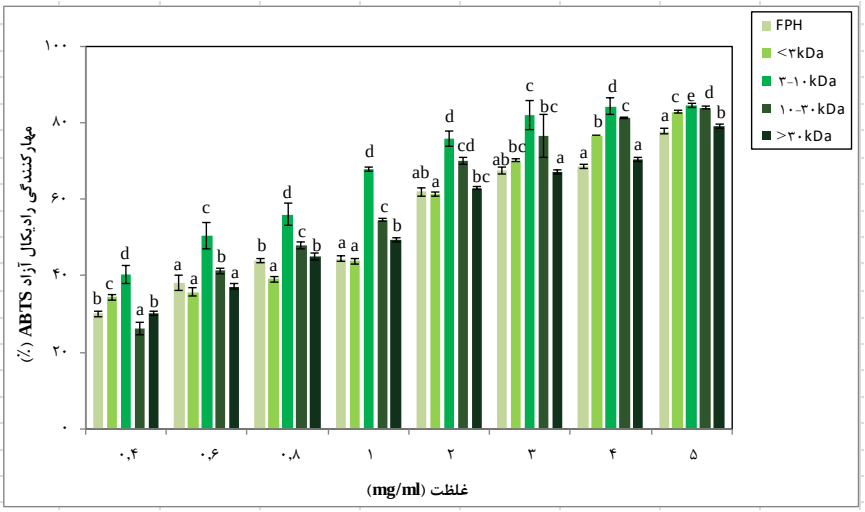
ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS

نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی در زمان‌های مختلف هیدرولیز نشان داد که ترکیب هیدرولیز شده دارای خاصیت مهارکنندگی ABTS در تمامی زمان‌های هیدرولیز بوده و با پیشرفت زمان هیدرولیز خاصیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد، اما در زمان ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز به طور

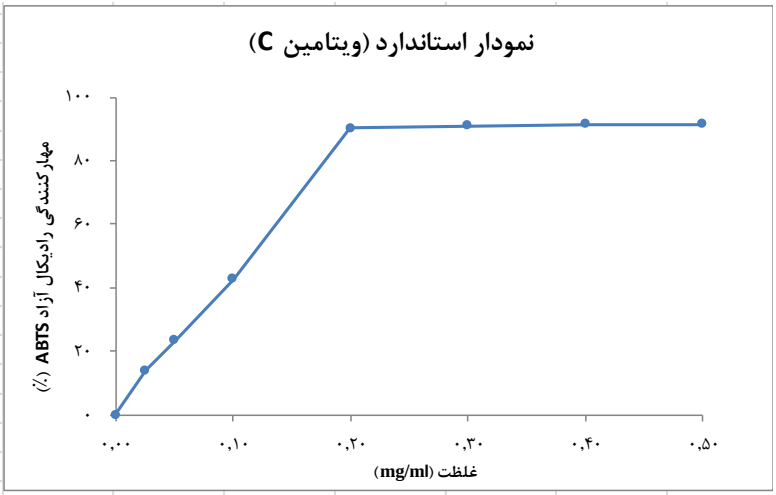
[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$) (جدول ۳). بالاترین میزان مهارکنندگی در زمان ۲۴۰ دقیقه هیدرولیز با میزان ۰/۶۳± ۵۰/۵۴٪ گزارش شد. هم‌چنین نمونه‌های هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز دارای خاصیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS بالاتری نسبت به نمونه کنترل (هیدرولیز نشده) بودند ($p\leq۰/۰۵$). نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی اجزای پپتیدی نشان داد که هر ۴ جزء پپتیدی توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS را دارا بودند (شکل ۵). در بین همه اجزا، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰-۳ کیلودالتون در تمامی غلظت‌ها به طور معنی‌داری دارای قدرت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر اجزای پپتیدی بود (به جز غلظت‌های ۲ و ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)؛ هم‌چنین در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با درصد مهارکنندگی ۰/۴۴± ۸۴/۵۸٪ بالاترین توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS را نشان داد. هم‌چنین جهت مقایسه، از آسکوربیک اسید به عنوان یک ضداکسیدان متداول استفاده شد (غلظت‌های ۰/۵-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). فعالیت ضداکسیدانی آن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۹۱/۴۳٪ به‌دست آمد (شکل ۶).



شکل ۵. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS اجزای مختلف پپتیدی. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنادار بین تیمارها در سطح (P<۰/۰۵) می‌باشد



شکل ۶. فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS آسکوربیک اسید

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

بحث

امروزه تقاضای فزآینده‌ای از جانب مصرف‌کنندگان برای مواد غذایی طبیعی‌تر که دارای مزایای سلامتی بالقوه می‌باشند، وجود دارد. موجودات دریایی ذخیره‌گاه‌های متعددی از اجزای کارکردی زیست‌فعال مانند پروتئین‌ها، پپتیدها، اسیدهای چرب امگا-۳، رنگدانه‌های فوتوسینتتیک، ترکیبات فنولیک، ضداکسیدان‌ها و ضدمیکروب‌ها می‌باشند. به‌ویژه در سال‌های اخیر مطالعات متعددی در زمینه تولید پپتیدهای زیست‌فعال مشتق‌شده از ماهی جهت به حداکثر رساندن کارایی منابع دریایی کم‌تر بهره‌برداری شده متمرکز شده‌اند، از آنجایی‌که این پپتیدها دارای پتانسیل قابل توجهی به منظور توسعه فرآورده‌های غذایی فراسودمند و یا غذاداروها می‌باشند. پیش‌بینی می‌شود تجارت اجزای غذایی ویژه تا سال ۲۰۲۰ به ۹۱/۲ میلیارد دلار با نرخ رشد سالانه ۵/۵٪ برسد، که در این میان مواد غذایی کارکردی دارای بزرگ‌ترین سهم تجارت می‌باشند [۲۸]. ترکیبات شیمیایی مواد غذایی با فراهم کردن مواد مغذی ضروری، نقش مهمی را در سلامت بدن ایفا می‌کنند. نسبت بین ترکیبات پوست ماهی با توجه به سن و جنس ماهی متفاوت می‌باشد. در این راستا، مطالعات زیادی انجام شده و هم‌راستا با نتایج این مطالعه می‌باشد. میزان رطوبت به دست آمده در این ارزیابی مشابه با مقدار اندازه‌گیری شده توسط Kim و همکاران [۲۹] (۷۱/۱۶٪)، میزان خاکستر به‌دست آمده مشابه با میزان محاسبه شده در امعا و احشای ماهی سالمون [۳۰] (۳/۲۴٪)، میزان چربی مشابه با میزان چربی ماهیچه ماهی مرکب (۱۰/۰۳٪) [۳۱] و میزان پروتئین گزارش شده با میزان پروتئین ضایعات ماهی تیلاپیا ۱۴/۶۰٪) [۳۲] مشابه بود. با توجه به ماهیت پروتئینی ماده مورد استفاده در این تحقیق، تعیین ترکیب تقریبی این گونه، اطلاعاتی را در مورد محتوای پروتئینی منشاء اولیه استخراج آن می‌دهد. درجه هیدرولیز تغییر محتوای پپتید را در یک واکنش هیدرولیتیک تخمین می‌زند. این شاخص در واقع میزان تجزیه پروتئین توسط آنزیم مربوطه را در نسبت‌های مختلف با پروتئین هیدرولیزشده بازیافت شده اندازه‌گیری می‌کند و هرچه بالاتر باشد، تعداد بیش‌تری از پپتید در محلول تولید می‌شود. افزایش تولید پپتیدها در طی واکنش هیدرولیتیک منجر به افزایش حلالیت پروتئین می‌شود و امکان استفاده از پروتئین بازیافتی را به عنوان افزودنی دارای درجه غذایی افزایش می‌دهد [۳۳]. بر اساس نتایج، درجه هیدرولیز در ساعات اولیه میزان بالایی داشت که این نشان می‌دهد که حداکثر شکافت پیوندهای پپتیدی در ساعت اول هیدرولیز رخ داده است و در ادامه سرعت واکنش کاهش یافت، تا اینکه تقریبا ثابت شد که نشان‌دهنده این بود که هیدرولیز به فاز پایدار رسیده است. این نتیجه مطابق با نتایج بسیاری از تحقیقات از جمله Ktari و همکاران [۳۴]، Nasri و همکاران [۳۵]، García-Moreno و همکاران [۳۶]، Noman و همکاران [۳۷] و Camargo و همکاران [۳۸] بود. به طور کلی، آنزیم به سرعت ذرات نامحلول در پروتئین را جذب می‌کند و سپس زنجیره های پلی‌پپتیدی متصل به سطح تجزیه می‌شوند و توده پروتئین داخلی کندتر هیدرولیز می‌شود. سرعت هیدرولیز آنزیمی پیوندهای پپتیدی، سرعت هیدرولیز عمومی را کنترل می‌کند. با این وجود، با افزایش زمان واکنش، در دسترس بودن بستر کاهش می‌یابد [۳۹]. نتایج این تحقیق نشان دهنده درجه هیدرولیز بالای پروتئین هیدرولیز شده در پایان ۵ ساعت فرآیند هیدرولیز است که نشان دهنده کارایی بالای آنزیم آلکالاز جهت هیدرولیز می‌باشد. انتخاب آنزیم نقش بسیار مهمی در تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی و ضایعات آن دارد، زیرا هر آنزیم دارای الگوی متفاوتی در شکستن باندهای پپتیدی می‌باشد که بر ترکیب اسید آمینه‌ها، وزن ملکولی و فعالیت زیستی پپتیدهای تولید شده اثر خواهد گذاشت [۴۰]. بر طبق گزارش‌ها، آنزیم آلکالاز یکی از کارآمدترین آنزیم‌ها برای استخراج پپتید از آبزیان می‌باشد [۳۱؛ ۴۱ و ۴۲]. درجه هیدرولیز یکی از ویژگی‌های مهم پروتئین هیدرولیز شده است که بر خواص کارکردی و زیستی محصول تولید شده اثر می‌گذارد [۴۳]. پارامترهای مختلفی از جمله نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، pH، زمان هیدرولیز و درجه هیدرولیز بر زیست‌فعالی پروتئین هیدرولیز شده اثرگذارند [۴۴]. پروفایل اسید آمینه، مربوط به ویژگی‌های عملکردی و ارزش غذایی پروتئین هیدولیز شده بوده و برای درک خواص تغذیه‌ای اهمیت زیادی دارد [۴۵]. هم‌چنین خواص کارکردی پروتئین هیدورلیز شده مربوط به محتوای اسید آمینه آن می‌باشد [۴۶]. مشخص شده است که پروتئین هیدرولیز شده ماهی حاوی مقادیر مناسب اسیدهای آمینه می‌تواند نامزد بالقوه‌ای برای استفاده جهت ایجاد خواص ضدفشار خون وضداکسیدان قوی باشد [۴۷]. یک اسید آمینه یا یک مولکول پپتید به عنوان یک ضداکسیدان عمل می‌کند، مشروط بر اینکه این توانایی حیاتی را داشته باشد که قبل از اکسیداسیون ماکرومولکول‌هایی مانند لیپید یا پروتئین، اکسید شود و در نتیجه آن‌ها را از تخریب حفظ کند [۴۸]. در این مطالعه، اسید آمینه گلایسین بالاترین میزان را به خود اختصاص داده بود. تعیین

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

گلایسین به عنوان رایج‌ترین اسید آمینه در پروتئین هیدرولیز شده ماهی در برخی از تحقیقات قبلی مورد توجه قرار گرفته است [۴۵]. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، پروتئین ماهی پنجزاری باله نارنجی دارای مقدار بالایی از اسیدهای آمینه آب‌گریز (۵۰/۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) بود که ویژگی‌های ساختاری را ارائه می‌دهد و برهمکنش با غذاهای لیپیدی را افزایش می‌دهد. ماهیت آب‌گریز پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به افزایش ورود پپتید به اندام‌های هدف از طریق فعل و انفعالات آب‌گریز با دو لایه‌های لیپیدی غشا کمک کند. اعتقاد بر این است که این فرآیند اثرات ضداکسیدانی *in vivo* را افزایش می‌دهد [۴۹]. وجود اسیدهای آمینه آب‌گریز و یک یا چند باقیمانده هیستیدین، پرولین، متیونین، سیستئین، تیروزین، تریپتوفان و فنیل‌آلانین می‌تواند فعالیت ضداکسیدانی پپتیدهای موجود در پروتئین هیدرولیز شده را بهبود بخشد. علاوه بر این پروتئین هیدرولیز شده جاوی اسیدهای آمینه آروماتیک از جمله فنیل‌آلانین و تیروزین بود. اسید آمینه‌های آروماتیک توانایی حذف رادیکال‌های آزاد را دارند و بنابراین از انتشار محصولات فرعی لیپیدی اکسیده شده جلوگیری می‌کنند [۵۱]. گزارش شده است که تریپتوفان و تیروزین به عنوان اسیدهای آمینه آروماتیک مسئول ایجاد خواص ضداکسیدانی هستند، به ویژه در جلوگیری از کوری ناشی از تشکیل آب مروارید نقش دارند [۵۰].

DPPH یک رادیکال نسبتا پایدار از نیتروژن آلی است که دارای رنگ بنفش تیره بوده و زمانی که در اتانول یا متانول حل می‌شود دارای جذب در محدوده ۵۱۵–۵۲۸ نانومتر می‌باشد و با ترکیبات اهداکننده هیدروژن واکنش نشان می‌دهد. هنگامی که رادیکال‌های DPPH با یک سوبسترای اهداکننده پروتون، مانند یک ضداکسیدان مواجه می‌شوند، رادیکال‌ها از بین می‌روند [۵۱]. پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی پپتیدهایی هستند که الکترون‌دهنده بوده و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند و آن‌ها را به ترکیبات پایدارتر تبدیل کنند. نتیجه این عملکرد متوقف کردن واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون خواهد بود [۵۲]. نتایج این بررسی نشان داد که با افزایش زمان هیدرولیز خاصیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد اما در زمان ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز اندکی کاهش یافت که معنی‌دار نبود. این نتیجه مشابه با نتایج Wang و همکاران [۵۳] و Jang و همکاران [۵۴] بود. هیدرولیز گسترده پروتئین‌ها موجب تولید اسید آمینه‌های آزاد زیادی می‌شود، بنابراین فعالیت ضداکسیدانی کاهش می‌یابد [۱۹]. لازم به ذکر است که درجه هیدرولیز (DH) تأثیر متفاوتی بر فعالیت مهار DPPH ترکیب هیدرولیز شده داشته و به مواد خام هیدرولیز شده و تیمار آنزیمی مورد استفاده بستگی دارد [۳۶]. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی اجزای پپتیدی نشان داد که همه اجزای پپتیدی توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند. فرآیند الترافیلتراسیون فعالیت مهار رادیکال DPPH را بهبود بخشید. این نتیجه مطابق با نتیجه تحقیق Zhong و همکاران [۵۵] می‌باشد. فرآیند اولترافیلتراسیون می‌تواند پپتیدهای ضداکسیدانی را که اهداکننده الکترون هستند تخلیص کند و پپتیدهای حاصل می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهند تا آن‌ها را به محصولات پایدارتر تبدیل کنند و واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌ها را خاتمه دهند [۵۵]. در بین همه اجزا، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰–۳ کیلودالتون در اکثر غلظت‌ها دارای خاصیت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر اجزای پپتیدی بود. پپتیدهای با زنجیره کوتاه ظرفیت ضداکسیدانی بالاتری نسبت به پپتیدهای با زنجیره بلند دارند [۱۹]. نتایج حاصل نشان دهنده حضور پپتیدهای ضداکسیدانی دارای اسید آمینه‌های آب‌گریز در همه اجزای پپتیدی می‌باشد [۵۶]. اعتقاد بر این است که تعداد اسیدهای آمینه آب‌گریز بر شدت فعالیت مهار پپتید تأثیر می‌گذارد. گزارش شده است که بسیاری از پپتیدهای طبیعی بسیار آب‌گریز مشتق شده از منابع پروتئینی دارای اثرات ضداکسیدانی قوی هستند. اسیدهای آمینه آب‌گریز با ضداکسیدان‌های غیرپپتیدی واکنش می‌دهند و به عنوان جاذب‌های موثر گونه‌های مختلف رادیکال‌های آزاد عمل می‌کنند [۵۷]. آزمون ABTS یک روش رنگ‌سنجی است که توانایی یک ضداکسیدان برای مهار تشکیل یک رادیکال رنگی ABTS، یک کروموفور سبز–آبی با جذب مشخص در طول موج ۷۳۴ نانومتر را ارزیابی می‌کند [۱۸]. مونوکاسیون رادیکال از پیش ساخته شده $ABTS^{+}$ توسط اکسیداسیون ABTS با پتاسیم پرسولفات تولید می‌شود و در حضور ضد اکسیدان‌های اهداکننده هیدروژن و ضداکسیدان‌های شکننده زنجیره کاهش می‌یابد [۵۸]. سنجش فعالیت مهار رادیکال ABTS را می‌توان هم برای ترکیبات چربی‌دوست و هم برای ترکیبات آب‌دوست استفاده کرد و به طور گسترده به عنوان یک شاخص فعالیت ضداکسیدانی استفاده شده است [۵۹]. نتایج حاصل از بررسی خاصیت ضداکسیدانی در زمان‌های مختلف هیدرولیز نشان داد که با پیشرفت زمان هیدرولیز خاصیت مهارکنندگی افزایش می‌یابد، اما در زمان ۳۰۰ دقیقه هیدرولیز به طور معنی‌داری کاهش یافت. کاهش میزان مهارکنندگی با افزایش زمان هیدرولیز مطابق با یافته‌های Klomklao و

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

Benjakul [۵۸]، Shahi و همکاران [۶۰] و Chel-Guerrero و همکاران [۶۱] بود. هم‌چنین نتایج حاصل از بررسی خاصیت مهارکنندگی اجزای پپتیدی نشان داد که هر ۴ جزء پپتیدی توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS را دارا بودند و در بین همه اجزا، جزء پپتیدی با وزن مولکولی ۱۰-۳ کیلودالتون به طور معنی‌داری دارای قدرت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر اجزای پپتیدی بود. توانایی پپتیدها برای مهار رادیکال ABTS منعکس‌کننده ظرفیت آن‌ها برای اهدای الکترون یا اتم هیدروژن برای غیرفعال کردن این گونه رادیکال است [۲۱]. وجود باقی مانده‌های آب‌گریز و آروماتیک خاص می‌توانند فعالیت ضداکسیدانی پپتیدها را افزایش دهند [۶۲]. گزارش شده است که پپتیدهای حاوی بقایای اسیدهای آمینه مانند Asp، Pro، Trp، Tyr، Met، Cys، Leu، Arg، Ala و His فعالیت ضداکسیدانی بالاتری نشان می‌دهند [۶۳].

نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از این تحقیق گویای این مسئله است که ماهی پنجزاری باله نارنجی به عنوان یک گونه صید ضمنی با ارزش تجاری پایین، منبع غنی‌ای از پپتیدهای آب‌گریز می‌باشد که توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشند. فعالیت نسبتا بالا در ارائه خاصیت ضداکسیدانی امکان جایگزینی این ترکیب را با ضداکسیدان های مصنوعی می‌دهد. زیرا علاوه بر قیمت پایین‌تر و خاصیت ضداکسیدانی بالا، سمیت کمتری را نشان می‌دهند. در این راستا لازم است تا مطالعات بیشتری در زمینه بررسی انواع خواص زیست‌فعالی و هم‌چنین استفاده از پپتیدها در بستر مواد غذایی یا به شکل مکمل‌های تغذیه‌ای انجام شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر با حمایت معاونت پژوهشی دانشگاه تربیت مدرس و نیز صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (Iran National Science Foundation: INSF) تحت قرارداد طرح پژوهشی شماره ۹۸۰۲۸۸۴۶ انجام پذیرفته است.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Souyoul SA, Saussy KP, Lupo MP. Nutraceuticals: a review. Dermatology and Therapy. 2018 Mar; 8(1): 5-16.
2- Kotha RR, Luthria DL. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. Molecules. 2019 Jan; 24(16): 2930.
3- Manzoor M, Singh J, Bandral JD, Gani A, Shams R. Food hydrocolloids: Functional, nutraceutical and novel applications for delivery of bioactive compounds. International Journal of Biological Macromolecules. 2020 Dec 15; 165: 554-67.
4- Joshi R, Garud N, Akram W. Marine Nutraceuticals. In Marine Niche: Applications in Pharmaceutical Sciences 2020 (pp. 53-69). Springer, Singapore.
5- Šimat V, Elabed N, Kulawik P, Ceylan Z, Jamroz E, Yazgan H, Čagalj M, Regenstein JM, Özogul F. Recent advances in marine-based nutraceuticals and their health benefits. Marine drugs. 2020 Dec; 18(12): 627.
6- Wang X, Yu H, Xing R, Li P. Characterization, preparation, and purification of marine bioactive peptides. BioMed research international. 2017 Jul 6;2017.
7- Pezeshk S, Ojagh SM, Rezaei M, Shabanpour B. Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: investigation of antibacterial and antioxidant activities. Probiotics and antimicrobial proteins. 2019 Sep; 11(3): 1015-22.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

8- Ramezanzadeh L, Nikkhah M. Enzymatic hydrolysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin and evaluation of its antioxidant properties. Fisheries Science and Technology. 2016 Sep 10; 5(2): 29-44.
9- Najafian L, Babji AS. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from fermented fish (pekasam). Journal of Food Measurement and Characterization. 2018 Sep; 12(3): 2174-83.
10- Deyrestani A, Alavi-Yeganeh MS, Sadeghizadeh M. Length–weight and length–length relationships of six ponyfish species from the Persian gulf. Croatian Journal of Fisheries: Ribarstvo. 2015 May 14; 73(2): 67-9.
11- Ibrahim A, Hussein C, Alshawy F, Alcheikh Ahmad A. First Record of Pope's ponyfish Equulites popei (Whitley, 1932),(Osteichthyes: Leiognathidae) in the Syrian Marine Waters (Eastern Mediterranean). Journal of Wildlife and Biodiversity. 2020 Nov 1; 4(Special issue):1-5.
12- Ramezani Z, Rajabzadeh Ghatarmi E, Hosseini SF, Regenstein JM. Functional properties and antioxidant activities of protein hydrolysates from orangefin ponyfish (*Photopectoralis bindus*). Iranian Journal of Fisheries Sciences. 2020 Nov 10; 19(6): 3001-17.
13- Ramezani Z, Rajabzadeh Ghatarmi E, Hosseini SF. Effect of hydrolysis intensity on the functional properties of protein hydrolysed of orangefin ponyfish (*Leiognathus bindus*). Journal of Food Processing and Preservation. 2018 Dec 22; 10 (2): 137-49.
14- Venkatesan J, Anil S, Kim SK, Shim MS. Marine fish proteins and peptides for cosmeceuticals: A review. Marine drugs. 2017 May; 15(5): 143.
15- Arumugam V, Venkatesan M, Ramachandran S, Sundaresan U. Bioactive peptides from marine ascidians and future drug development–a review. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2018 Mar; 24(1): 13-8.
16- Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M. Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. Food Chemistry. 2017 Nov 1; 234: 220-9.
17- Arumugam V, Venkatesan M, Ramachandran S, Sundaresan U. Bioactive peptides from marine ascidians and future drug development–a review. International Journal of Peptide Research and Therapeutics. 2018 Mar; 24(1): 13-8.
18- Yarnpakdee S, Benjakul S, Kristinsson HG, Kishimura H. Antioxidant and sensory properties of protein hydrolysate derived from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by one-and two-step hydrolysis. Journal of Food Science and Technology. 2015 Jun; 52(6): 3336-49.
19- Bordbar S, Ebrahimpour A, Zarei M, Abdul Hamid A, Saari N. Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. International Journal of Food Properties. 2018 Jan 1; 21(1): 1541-59.
20- Vázquez JA, Rodríguez-Amado I, Sotelo CG, Sanz N, Pérez-Martín RI, Valcárcel J. Production, characterization, and bioactivity of fish protein hydrolysates from aquaculture turbot (*Scophthalmus maximus*) wastes. Biomolecules. 2020 Feb; 10(2): 310.
21- Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M, Arab-Tehrany E. Recovery of bioactive peptide fractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing waste hydrolysate. Ecopersia. 2018 Apr 10; 6(1): 31-40.
22- AOAC. (2002). Official method of analysis. (17thed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
23- Hosseini SF, Soleimani MR, Nikkhah M. Chitosan/sodium tripolyphosphate nanoparticles as efficient vehicles for antioxidant peptidic fraction from common kilka. International journal of Biological Macromolecules. 2018 May 1; 111: 730-7.
24- Lowry O, Rosebrough N, Farr AL, Randall R. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry. 1951 Nov 1; 193(1): 265-75.
25- Antoine FR, Wei CI, Littell RC, Marshall MR. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-phthaldialdehyde precolumn derivatization. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 1999 Dec 20; 47(12): 5100-7.
26- You L, Zhao M, Regenstein JM, Ren J. Changes in the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates during a simulated gastrointestinal digestion. Food Chemistry. 2010 Jun 1; 120(3): 810-6.
27- 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 Research International. 2011 May 1; 44(4): 1044-51.
28- Temelli F. Perspectives on the use of supercritical particle formation technologies for food ingredients. The Journal of Supercritical Fluids. 2018 Apr 1; 134: 244-51.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]
[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

29- Kim SR, Byun HG. The novel angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from rainbow trout muscle hydrolysate. Fisheries and Aquatic Sciences. 2012; 15(3): 183-90.
30- Lapeña D, Vuoristo KS, Kosa G, Horn SJ, Eijsink VG. Comparative assessment of enzymatic hydrolysis for valorization of different protein-rich industrial byproducts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2018 Aug 24; 66(37): 9738-49.
31- Raftani Amiri Z, Safari R, Bakhshandeh T. Functional properties of fish protein hydrolysates from Cuttlefish (*Sepia pharaonis*) muscle produced by two commercial enzymes.
32- Roslan J, Yunos KF, Abdullah N, Kamal SM. Characterization of fish protein hydrolysate from tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-product. Agriculture and Agricultural Science Procedia. 2014 Jan 1; 2: 312-9.
33- Sheriff SA, Sundaram B, Ramamoorthy B, Ponnusamy P. Synthesis and *in vitro* antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger kanagurta* by proteolytic enzymes. Saudi Journal of Biological Sciences. 2014 Jan 1; 21(1): 19-26.
34- Ktari N, Fakhfakh N, Balti R, Ben Khaled H, Nasri M, Bougatef A. Effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*Sepia officinalis*) by-products. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2013 Sep 3; 22(5): 436-48.
35- Nasri R, Younes I, Jridi M, Trigui M, Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Dhulster P, Nasri M, Karra-Châabouni M. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterissessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. Food Research International. 2013 Nov 1; 54(1): 552-61.
36- García-Moreno PJ, Batista I, Pires C, Bandarra NM, Espejo-Carpio FJ, Guadix A, Guadix EM. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. Food Research International. 2014 Nov 1; 65: 469-76.
37- Noman A, Qixing J, Xu Y, Ali AH, Al-Bukhaiti WQ, Abed SM, Xia W. Influence of degree of hydrolysis on chemical composition, functional properties, and antioxidant activities of chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) hydrolysates obtained by using alcalase 2.4 L. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2019 Jul 3; 28(6): 583-97.
38- Camargo TR, Khelissa S, Chihib NE, Dumas E, Wang J, Valenti WC, Gharsallaoui A. Preparation and Characterization of Microcapsules Containing Antioxidant Fish Protein Hydrolysates: a New Use of Bycatch in Brazil. Marine Biotechnology. 2021 Apr; 23(2): 321-30.
39- Pagán J, Ibarz A, Falguera V, Benítez R. Enzymatic hydrolysis kinetics and nitrogen recovery in the protein hydrolysate production from pig bones. Journal of Food Engineering. 2013 Dec 1; 119(3): 655-9.
40- Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology. 2013 Feb 1; 52: 113-20.
41- Bao ZJ, Zhao Y, Wang XY, Chi YJ. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alcalase. Journal of Food Science and Technology. 2017 Mar; 54(3): 669-78.
42- Alavi F, Jamshidian M, Rezaei K. Applying native proteases from melon to hydrolyze kilka fish proteins (*Clupeonella cultriventris caspia*) compared to commercial enzyme Alcalase. Food chemistry. 2019 Mar 30; 277: 314-22.
43- Jang HL, Liceaga AM, Yoon KY. Purification, characterisation and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicus*) protein hydrolysates. Journal of Functional Foods. 2016 Jan 1; 20: 433-42.
44- Zhang Y, Duan X, Zhuang Y. Purification and characterization of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of tilapia (*Oreochromis niloticus*) skin gelatin. Peptides. 2012 Nov 1; 38(1): 13-21.
45- Tejpal CS, Vijayagopal P, Elavarasan K, Linga Prabu D, Lekshmi RG, Asha KK, Anandan R, Chatterjee NS, Mathew S. Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. Journal of Food Science and Technology. 2017 Dec; 54(13): 4257-67.
46- Ngo DH, Kang KH, Ryu B, Vo TS, Jung WK, Byun HG, Kim SK. Angiotensin-I converting enzyme inhibitory peptides from antihypertensive skate (*Okamejei kenojei*) skin gelatin hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. Food Chemistry. 2015 May 1; 174: 37-43.
47- Paiva L, Lima E, Neto AI, Baptista J. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of *Fucus spiralis L.* protein hydrolysate fractions. Marine drugs. 2017 Oct; 15(10): 311.
48- Dhanabalan V, Xavier M, Kannuchamy N, Asha KK, Singh CB, Balange A. Effect of processing conditions on degree of hydrolysis, ACE inhibition, and antioxidant activities of protein hydrolysate from *Acetes indicus*. Environmental Science and Pollution Research. 2017 Sep; 24(26): 21222-32.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

49- Girgih AT, He R, Hasan FM, Udenigwe CC, Gill TA, Aluko RE. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. Food Chemistry. 2015 Apr 15; 173: 652-9.

50- Rathore MS, Gupta VB. Functional characterization of amino acid transport system for transport of phenylalanine on mammalian cornea for better ocular drug delivery. J. Pharm. Sci. Res. 2010 Jun 1; 2: 329-37.

51- Jiang H, Tong T, Sun J, Xu Y, Zhao Z, Liao D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. Food Chemistry. 2014 Jul 1; 154: 158-63.

52- Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology. 2008 Dec 1; 151(4): 410-9.

53- Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY, Xu YF. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food Chemistry. 2013 Jun 1; 138(2-3): 1713-9.

54- Jang HL, Shin SR, Yoon KY. Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*). Food Science and Biotechnology. 2017 Oct; 26(5): 1191-7.

55- 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 Chemistry. 2011 Jun 15; 126(4): 1636-42.

56- Guillén G, López Caballero ME, Alemán A, Lacey AL, Giménez B, Montero García P. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin.

57- Bashir KM, Sohn JH, Kim JS, Choi JS. Identification and characterization of novel antioxidant peptides from mackerel (*Scomber japonicus*) muscle protein hydrolysates. Food Chemistry. 2020 Sep 1; 323: 126809.

58- Klomklao S, Benjakul S. Protein hydrolysates prepared from the viscera of skipjack tuna (*Katsuwonus pelmamis*): antioxidative activity and functional properties. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2018 Jan 1; 18(1): 69-79.

59- Senphan T, Benjakul S. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Functional Foods. 2014 Jan 1; 6: 147-56.

60- Shahi Z, Sayyed-Alangi SZ, Najafian L. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. Heliyon. 2020 Feb 1; 6(2): e03365.

61- Chel-Guerrero L, Cua-Aguayo D, Betancur-Ancona D, Chuc-Koyoc A, Aranda-González I, Gallegos-Tintoré S. Antioxidant and chelating activities from Lion fish (*Pterois volitans L.*) muscle protein hydrolysates produced by *in vitro* digestion using pepsin and pancreatin. Emirates Journal of Food and Agriculture. 2020 Jan 23: 62-72.

62- Gao R, Shu W, Shen Y, Sun Q, Jin W, Li D, Li Y, Yuan L. Peptide fraction from Sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via MAPK and NF-κB pathways. Food Science and Human Wellness. 2021 Jan 1; 10(1): 103-11.

63- Yan QJ, Huang LH, Sun Q, Jiang ZQ, Wu X. Isolation, identification and synthesis of four novel antioxidant peptides from rice residue protein hydrolyzed by multiple proteases. Food Chemistry. 2015 Jul 15; 179: 290-5.

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]

Journal of Fisheries Science and Technology
Volume11, Issue 2, Spring 2022
Pages: 106-122

Evaluation of bioactive properties of peptide fractions from enzymatic hydrolysis of orangefin ponyfish (*Leiognathus bindus*)

Leila Ramezanzade [1], Seyed Fakhreddin Hosseini [1]*, Behrouz Akbari-Adergani[2], Reza Hasan Sajedi[3], Anan Yaghmur[4]

1- Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2- Food & Drug Laboratory Research Center, Food & Drug Department, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran.
3- Department of Biochemistry, Faculty of biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
4- Department of Pharmacy, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark.

A B S T R A C T

In this study, the orangefin ponyfish (*Leiognathus bindus*) was hydrolyzed by alcalase in an enzyme to substrate ratio of 1: 100 for 300 minutes, and the degree of hydrolysis was measured for 5 hours. Also, the hydrolysate was fractionated by centrifugal having molecular mass cutoffs of 3, 10, and 30 kDa, and four peptide fractions were obtained. Then, the antioxidant activity (DPPH and ABTS free radicals scavenging activity) of peptide fractions, as well as hydrolysate, were measured at different hydrolysis times. The degree of hydrolysis was the highest (55.43 ± 2.11%) at a hydrolysis time of 240 minutes. The hydrolysate had a high amount of hydrophobic amino acids (50.6%) which cause antioxidant properties. The results of DPPH radical scavenging activity showed that the highest scavenging activity was obtained at a hydrolysis time of 240 minutes (75.59 ± 1.46). Also, among all the fractions, the 3-10 kDa fraction exhibited the highest scavenging activity compared to other fractions (80.58 ± 2.96% at a concentration of 5mg /ml). Based on the result of ABTS radical scavenging, the highest activity was reported at 240 minutes after hydrolysis (50.54 ± 0.63). Also, among all peptide fractions, the 3-10 kDa fraction had significantly higher scavenging activity than other fractions (84.58 ± 0.44 at a concentration of 5 mg /ml). The results of this study showed that the peptides obtained by enzymatic hydrolysis of orangefin ponyfish are a good candidate for providing antioxidant properties.

KEYWORDS: Orangefin ponyfish, Enzymatic hydrolysis, Bioactive peptide, Antioxidant properties.

ARTICLE TYPE

Original Research

ARTICLE HISTORY

Received: 21 Jan 2022
Accepted: 11 Apr 2022
ePublished: 21 Apr 2022

* Corresponding Author:
Email address: hosseinisf@modares.ac.ir
Tel: +(98) 1144998162
© Published by Tarbiat Modares University
eISSN:2476-6887 pISSN:2322-5513

[Downloaded from jfst.modares.ac.ir on 2024-04-26]

[DOR: 20.1001.1.23225513.1401.11.2.5.4]