فصلنامه علمی ـ پژوهشی

دورهٔ ۵، شمارهٔ ۳، پاییز ۱۳۹۵، صفحه ۹۵- ۱۰۸

ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*)

محمدرضا سلیمانی [۱]، سید فخرالدین حسینی [۲*]، مریم نیکخواه [۳]

۱ – دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۲– استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور

۳– استادیار، گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

دریافت: ۹٤/۱۰/۱۳ پذیرش: ۹٤/۱۱/۲٦

* نویسنده مسئول مقاله: hosseinisf@modares.ac.ir

چکیده

پروتئین هیدرولیزشده کیلکای‌معمولی با استفاده از آنزیم آلکالاز (با نسبت ۱:۱۰۰) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸/۵ در مدت ٤ ساعت تهیه شد و درجه هیدرولیز و فعالیت ضداکسیدانی آن ارزیابی گردید. نتایج درجه هیدرولیز اندازه‌گیری شده در فواصل زمانی ۱، ۲، ۳ و ٤ ساعت بیانگر افزایش درجه هیدرولیز با افزایش زمان بود. هم‌چنین، ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی FPH به‌وسیله آزمون‌های DPPH، ABTS و قدرت کاهندگی در ۳ غلظت ۱، ۲ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، بیانگر بالاترین خاصیت مهارکنندگی در غلظت ۵ میلی‌گرم به ترتیب شامل ۷٤/٤٪، ۷۲/۳٪ و ۱/۸ جذب در ۷۰۰ نانومتر برای آزمون‌های DPPH، ABTS و آزمون قدرت کاهندگی بوده است. بطور کلی، یافته‌های این تحقیق پتانسیل کیلکا ماهیان را به عنوان منبعی از ضداکسیدان‌های طبیعی برای کاربردهای غذایی مورد تاکید قرار می‌دهد.

کلید واژگان: کیلکای معمولی، آنزیم آلکالاز، فعالیت ضداکسیدانی، DPPH، ABTS، تست قدرت کاهندگی.

مقدمه

با توجه به افزایش روزافزون جمعیت جهان و با درنظر گرفتن میزان صید جهانی (در حدود ۱۰۰ میلیون تن در سال)، بدیهی است برای رفع نیازهای پروتئینی، باید از منابع دریایی به‌طور کاملاً هوشمندانه استفاده شود (Kristinsson and Rasco, 2000; Ovissipour et al.,

(2013. مصرف ماهی تأثیر مثبتی بر سلامت فردی می‌گذارد که شامل تندرستی جسمی و حالت روانی است؛ ماهی همچنین حاوی ترکیبات ارتقادهندهٔ سلامتی می باشد که فراتر از ترکیبات مغذی سنتی از بروز بیماری پیشگیری می‌کند (Šližytė et al., 2005). ماهیان منبع غنی از پروتئین های قابل هضم، اسیدهای چرب چند غیراشباع، ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشند که برای سلامتی، حفظ و مراقبت از ماهیچه‌ها و بافت‌های بدن ضروری هستند، از این رو ماهی منبعی برای استفاده به‌عنوان غذاهای کارکردی و غذاداروها پیشنهاد می‌شود (Khora, 2013). برخی از گونه‌های دریایی به‌علت اندازه کوچک، بافت، طعم و رنگ غیرجذاب و محتوای چربی زیاد از سوی انسان مصرف نمی‌شوند. بسیاری از این ماهیان کم‌مصرف متعلق به گونه‌های سطح زی (Pelagic) می‌باشند که به میزان زیادی به‌عنوان صید ضمنی، صید می‌شوند (Venugopal., 1995). حجم فراوانی از این ماهیان کم‌ارزش، سالانه در سراسر جهان صید و دور ریخته می‌شوند، و یا به علت اندازه کوچک و ارزش خوراکی کم، به عنوان کودهای گیاهی و غذای دام استفاده می‌شوند (Kim et al., 2013). هرچند برخی از محققان با استفاده از فناوری‌های جدید این گونه‌ها را به محصولات بازسازی شده فراوری می‌کنند، با این حال برای بازیابی مواد مغذی ضروری از این ماهیان تلاش زیادی صورت نگرفته است. هیدرولیز آنزیمی فناوری مؤثر و عملی است که پروتئین های با ارزش را از ماهیان کمتر بهره‌برداری شده بدون از دست رفتن خواص تغذیه‌ای‌شان بازیابی می‌کند (Lin et al., 2014).

در این باره، ماهی کیلکا از خانواده شگ ماهیان (*Clupeidae*) از جنس *Clupeonella* است که غالب‌ترین جنس ماهی در دریای خزر می‌باشد و شامل دو گونهٔ کیلکای آنچوی *C. engrauliformis* (Borodin, 1904) و کیلکای چشم درشت *C. grimmi* (Kessler, 1877) و زیر گونه کیلکای معمولی *C. cultriventris caspia* (Svetovidov, 1941) است (Ovissipour et al., 2013). کیلکای معمولی که زیرگونه‌ای از گونه شگ ماهی دریای سیاه-آزوف به‌نام *C. Cultriventris* (Nordmann, 1840) است، ساکن مناطق کم‌عمق و نزدیک به ساحل دریای خزر می‌باشد. تغییر صیدگاه‌ها موجب افزایش برداشت این ذخیره نسبت به سال‌های گذشته شده است (Motalehi and Perafkandeh, 2009؛ Pourqolam et al., 1996). ذخیره این گونه در دریای خزر ٤٩/٦ هزار تن براورد شده است که بیش از ٧٦ درصد از ذخایر کیلکا ماهیان را شامل می‌شود (Perafkandeh and Keymaram, 2012). این گونه ۹۷ درصد از میزان صید کیلکا ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر را شامل شده و به‌عنوان گونه غالب صید شناخته می‌شود (Fazli, 2011). همچنین میزان صید کیلکا ماهیان در سواحل جنوبی دریای خزر در سال ۱۳۹۱، بیش از ٢٤ هزار تن بوده است (Iran Fisheries Organization, 2013). متأسفانه، به‌دلیل اندازه کوچک، فسادپذیری بالا و عدم تخلیه شکمی تنها بخش کوچکی از کیلکا ماهیان صید شده (٤ درصد) به مصرف انسانی رسیده و مابقی آن برای تولید پودر ماهی استفاده می‌شود (Shabanpour et al., 2006; Khoshkhoo et al., 2010). بنابراین، تبدیل این ماهیان به محصولات کم‌ارزشی مانند سیلاژ و غذای ماهی به‌دلیل حداقل سود برای صنایع شیلاتی توجیه اقتصادی نخواهد داشت (Rustad et al., 2011). در نتیجه، به‌منظور دستیابی به بیشترین کارایی می‌توان از کیلکا ماهیان در صنایع تبدیلی و استخراج ترکیبات زیست‌فعال استفاده کرد.

اکسیداسیون لیپیدها با بیماری‌های قلبی عروقی، سرطان و اختلالات عصبی و همچنین فرایند پیری مرتبط است. اکسیداسیون لیپید یکی از فرایندهای مخرب در بسیاری از غذاها می‌باشد که منجر به تغییر در کیفیت غذا و ارزش تغذیه‌ای می‌شود و عمر ماندگاری را نیز به‌ویژه در ماهیان چرب که به‌علت سطح بالای اسیدهای چرب چند غیراشباع آنها می‌باشد، کاهش می‌دهد (Bougatef et al., 2010; Chen et al., 2012; Ovissipour et al., 2013). اکسیداسیون چربی های غیراشباع نه تنها موجب تولید بو و طعم نامطلوب می شود، بلکه کیفیت و امنیت مواد تغذیه‌ای را نیز می‌تواند به‌وسیله تولید ترکیبات ثانویه در حین پختن غذا و فراوری کاهش دهد. بنابراین، ضداکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی می‌توانند شروع اکسیداسیون را به تأخیر اندازند (Khantaphant et al., 2011).

از ضداکسیدان های مصنوعی مانند BHT[1]، BHA[2] و TBHQ[3] برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در غذا استفاده می‌شود (Gómez-Ruiz et al., 2008) ، با این حال استفاده از ضداکسیدان های مصنوعی به‌علت سمیت و به خطر افتادن سلامت، تحت مقررات سخت قرار دارد (Wang et al., 2012). علاوه براین مصرف‌کنندگان به‌طور فزاینده‌ای از مصرف غذاهای تهیه شده با مواد نگهدارنده با منشأ شیمیایی پرهیز می کنند؛ بنابراین اهمیت بهره‌برداری از ضداکسیدان‌های طبیعی از منابع مختلف و جایگزینی ضداکسیدان های مصنوعی با مواد طبیعی به میزان زیادی مورد توجه قرار گرفته است (Farvin et al., 2014).

در طول دهه‌های اخیر آشکار شده است که پروتئین‌ها منبع اصلی تغذیه می‌باشند. به‌علاوه، پروتئین‌های گیاهی و جانوری می توانند به‌عنوان منبعی برای تولید پپتیدهایی با فعالیت زیستی استفاده شوند.

تاکنون مطالعات زیادی دربارهٔ فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گونه‌های مختلف مانند تیلاپیا (Raghavan et al., 2008)، آلاسکا پولاک (Je et al., 2005)، ماکرل (Wu et al., 2003)، تون زردباله (Jun et al., 2004) و پروتئین کاپلین (Amarowicz and shahidi, 1997) انجام شده است.

بنابراین در تحقیق حاضر، هیدرولیز آنزیمی برای تولید ترکیبات زیست‌فعال از ماهی کیلکای معمولی به‌کار گرفته شده است. در این راستا، فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا با استفاده از آزمون‌های DPPH، ABTS و آزمون قدرت کاهندگی ارزیابی شد.

مواد و روش کار

تهیه نمونه ماهی و مواد آزمایشگاهی

نمونه‌های ماهی کیلکای معمولی پس از صید با وزن متوسط ۵۱±۰/۵ گرم و با نسبت ۲:۱ (ماهی:یخ)، یخ‌گذاری و به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس انتقال داده شد. پس از شستشو با آب سرد، در پلاستیک‌های درب‌دار بسته‌بندی و به‌منظور انجام آزمایش‌ها در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنزیم مورد استفاده، آلکالاز استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا بود و تا زمان استفاده در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سایر مواد شیمیایی استفاده شده در این پژوهش نیز از شرکت‌های Merck، Sigma-aldrich و Applichem تهیه شدند.

1. Butylated hydroxytoluene
2. Butylated hydroxyanisole
3. tert-Butylhydroquinone

سنجش تقریبی نمونه‌ها

آنالیز تقریبی نمونه‌ها طبق روش استاندارد AOAC (۲۰۰۲) تعیین گردید. برای اندازه‌گیری رطوبت از آون (Germany Memmert,) (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد) برای ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه خشک در بوته چینی ریخته و در کوره (Nabertherm, Germany) با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین با روش کجلدال (Foss Kjeltec 2300, Sweden) به‌دست آمد. چربی کل نیز با سوکسله (Sweden Foss Soxtec 2050,) استخراج شد.

تولید پروتئین هیدرولیز شده (FPH)[1]

نمونه‌های منجمد ماهی کیلکای معمولی به‌مدت ٢٤ ساعت در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا عمل انجمادزدایی صورت گیرد. نمونه‌ها پس از چرخ شدن به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد در حمام آبی قرار گرفتند تا آنزیم‌های درونی آن غیرفعال شود. به‌منظور تولید FPH، ابتدا ۵۰ گرم از نمونه‌های چرخ شده در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. سپس با نسبت ۲:۱ (نمونه: آب مقطر) با آب مقطر (۱۰۰ میلی‌لیتر) ترکیب شد و با استفاده از NaOH ۰/۲مولار، PH مخلوط به ۸/۵ که فعالیت بهینه آنزیم آلکالاز بود، رسانده شد. پس از آن، ظروف حاوی نمونه‌ها در انکوباتور متحرک (Comecta, Spain) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد با دور ثابت (۲۰۰ دور در دقیقه) قرار داده شد. آنزیم آلکالاز (٢/٤ واحد آنسون به‌ازای ۱ میلی‌لیتر آنزیم) به نسبت ۱ درصد وزن مخلوط به نمونه اضافه گردید و نمونه‌ها به‌مدت ٤ ساعت در انکوباتور متحرک هم زده شدند. به‌منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا رسیدن به دمای معمولی اتاق، با استفاده از سانتریفیوژ (Universal 320 R, Germany) در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد، به‌مدت ۲۰ دقیقه (۸۰۰۰ ×g)، سانتریفیوژ شده و مایع رومانده[2] جمع‌آوری شد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی[3] (۸۰- درجه سانتی‌گراد)، خشک شدند (Ovissipour et al., 2013).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز (DH)[4] به کمک تری‌کلرو استیک اسید (TCA)[5] ۲۰ درصد (حجمی/حجمی) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های محلول در TCA به کل پروتئین‌های موجود در نمونه حاصل از سانتریفیوژ پس از هیدرولیز است. بدین منظور حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شد و پس از هم‌زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۵ دقیقه (٦٧٠٠×g) سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری و برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی (BSA[6]) استفاده گردید و میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله زیر محاسبه شد (Kristinsson and Rasco, 2000):

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

برای تعیین خواص ضداکسیدانی، نمونه‌ها در ۳ غلظت، ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (KPH[7] 1)، ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (KPH 2) و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (KPH 5)

1. Fish protein hydrolysate

2. Supernatant
3. Freeze-dryer
4. Degree of hydrolysis
5. Trichloroacetic acid
6. Bovine serum albumin
2. Kilka Protein Hydrolysate

بررسی شدند. از ویتامین C نیز به‌عنوان ضداکسیدان طبیعی برای مقایسه فعالیت ضداکسیدانی استفاده گردید.

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH[1]

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال DPPH براساس روش You و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. حجم مساوی از نمونه با محلول DPPH ۰/۱۶ میلی‌مولار که در اتانول ۹۵ درصد حل شده مخلوط گردید. محلول به‌دست آمده به‌مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و سپس در دمای اتاق به‌مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (Biotek, USA) خوانده شد. قدرت مهارکنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

A_{sample}: نمونه با DPPH

A_{blank}: اتانول با DPPH

قدرت حذف رادیکال ABTS

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال ABTS با روش Wang و همکاران (۲۰۱۲) اندازه‌گیری شد. ابتدا محلول ABTS (۷ میلی مولار) با پتاسیم پرسولفات (۲/۴۵ میلی مولار) مخلوط شده و به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگهداری شد. محلول رادیکال ABTS در بافرفسفات پتاسیم نمکی (pH= ۷/۴) رقیق‌سازی شد تا محلول مورد نظر برای انجام آزمایش به میزان جذب ۰/۷ ±۰/۰۲ در ۷۳۴ نانومتر رسید. در ادامه، ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS با ۲۰ میکرولیتر از غلظت‌های مختلف نمونه مخلوط شد و پس از ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. قدرت حذف‌کنندگی رادیکال ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید:

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

محلول ABTS به‌همراه آب به‌عنوان، کنترل می‌باشد.

آزمون قدرت کاهندگی[2]

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱ درصد (Ferricyanide potassium) ترکیب گردید. ترکیب حاصل شده به‌مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت، سپس ۲/۵ میلی‌لیتر TCA ۱۰ درصد (حجمی/حجمی) به آن اضافه شد. در ادامه محلول حاصل با دور g×۱۶۵۰ به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. در نهایت به ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز بالایی، ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن III ۰/۱ درصد اضافه و سپس محلول در دمای ثابت به‌مدت۳۰ دقیقه نگهداری شد تا به رنگ سبز تغییر یابد. میزان جذب محلول نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری گردید (Bougatef et al., 2009).

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

تجزیه و تحلیل آماری

طبیعی بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویک انجام شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه[3] انجام پذیرفت. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار آماری SPSS (16) برای آنالیز داده‌ها و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید. تمام آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد.

1. DPPH radical scavenging activity

2. reducing power assay

3 . One – Way ANOVA

نتایج

سنجش تقریبی نمونه‌ها

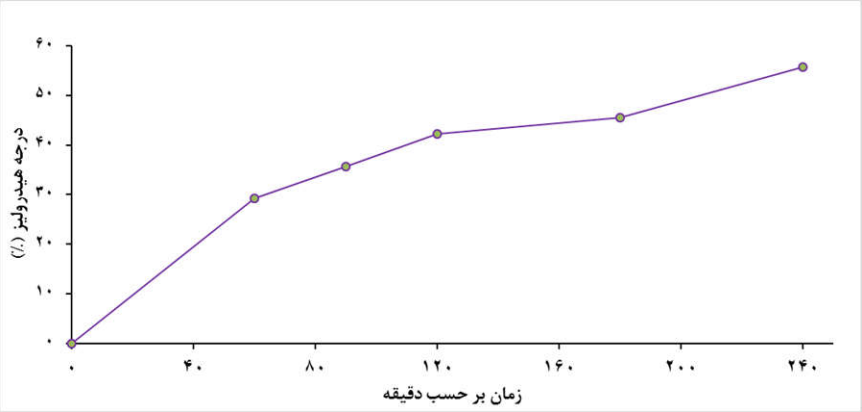
براساس ترکیب شیمیایی ماده خام اولیه که در جدول ۱ ارائه شده است، میزان رطوبت، پروتئین، چربی و خاکستر ماهی کیلکا نیز به‌ترتیب ۷٦/٤۸، ۱۷/۰۳، ۵/۰۲ و ۱/٤٦ درصد بوده است.

جدول ۱ ترکیبات تقریبی ماهی کیلکای معمولی

ماده	درصد رطوبت	درصد خاکستر	درصد پروتئین	درصد چربی
ماهی کیلکا معمولی	۷٦/٤۸ ± ۰/۳۷	۱/٤٦ ± ۱/۰٤	۱۷/۰۳ ± ۰/٦	۵/۰۲ ± ۰/۱٦

درجه هیدرولیز

نتایج سنجش درجه هیدرولیز به‌وسیله آنزیم آلکالاز در نمودار ۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که میزان هیدرولیز به‌طور معناداری تحت تأثیر زمان هیدرولیز قرار دارد، به‌طوری که بالاترین میزان درجه هیدرولیز در دقیقه ۲٤۰ و مقدار آن ۵۵/۸ درصد است.

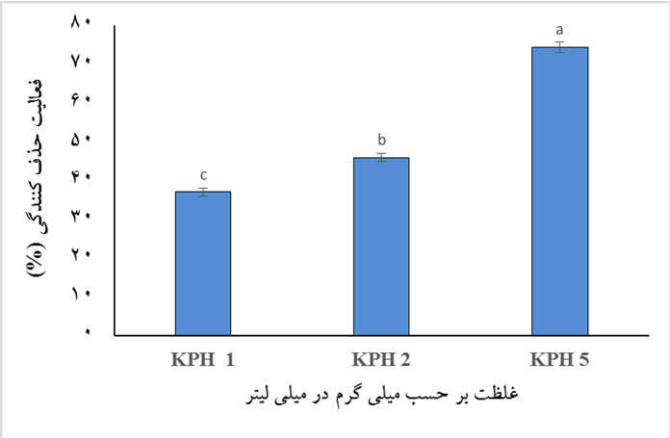


شکل ۱ مقادیر درجه هیدرولیز به‌وسیله آنزیم آلکالاز در زمان‌های مختلف.

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال DPPH

نتایج مربوط به درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در نمودار ۲ نشان داده شده است. همان‌طور که در نمودار دیده می‌شود، همه غلظت‌های به‌کار برده شده دارای قدرت حذف رادیکال DPPH بودند. با افزایش غلظت، فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد افزایش یافت، به‌طوری که در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش چشمگیر (۷٤/٤ درصد) فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH مشاهده شد. نتایج نشان می‌دهد فعالیت حذف رادیکال با IC_{50}[1] در حدود ۳/۳٦ میلی‌گرم در میلی‌لیتر است.

1. Inhibitory concentrate

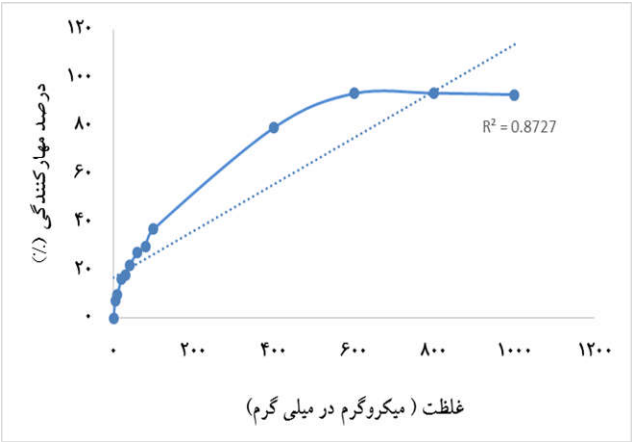


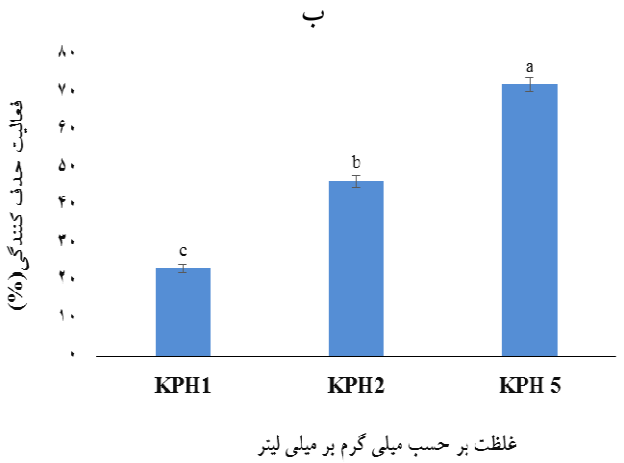
شکل ۲ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی C.cultiventris caspia. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است. حروف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار می‌باشند ($p < ۰/۰۵$).

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال ABTS

در مطالعه حاضر اثر حفاظتی پروتئین هیدرولیز شده دربرابر رادیکال‌های آزاد ABTS ارزیابی شد که در نمودار ۳ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد همه غلظت‌ها دارای قدرت حذف رادیکال ABTS بودند و بالاترین قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد ABTS در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (۷۲/۳۵ درصد) مشاهده شد؛ البته در غلظت ۳/٤٥ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، ۵۰ درصد از رادیکال‌ها حذف شدند. با افزایش غلظت اثر حذف‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بر رادیکال آزاد ABTS افزایش یافت.

الف

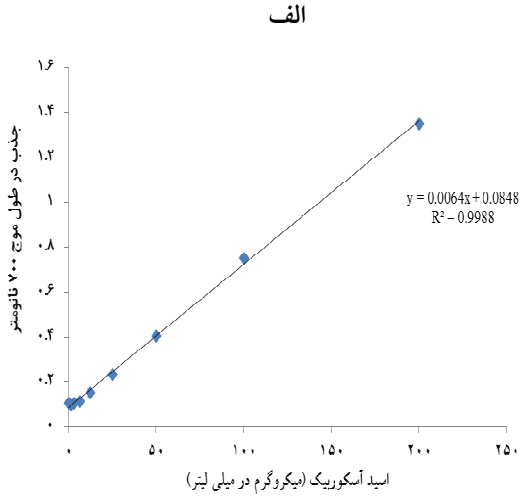




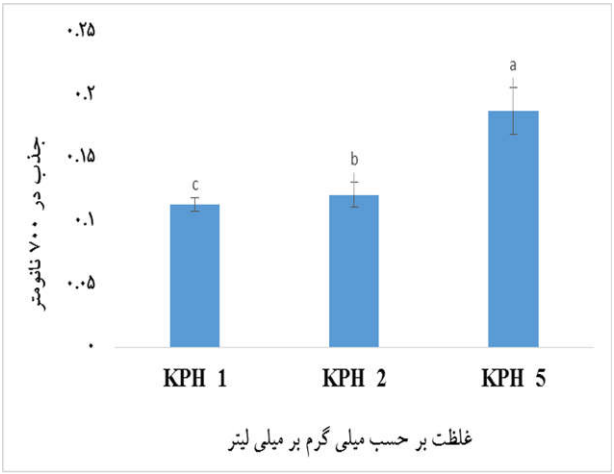
شکل ۳ درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS اسید آسکوربیک (الف) و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS پروتئین هیدرولیز شده کیلکا (ب). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است. حروف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار می‌باشند ($p < ۰/۰۵$).

قدرت کاهندگی آهن III

قدرت کاهندگی آهن ترکیب هیدرولیز شده کیلکا با آنزیم آلکالاز به‌صورت جذب بر روی غلظت در نمودار ٤ نمایش داده شده است. هرچند قدرت کاهندگی آهن در تمامی غلظت‌ها مشاهده شد، اما بالاترین میزان جذب در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ثبت گردید.



ب



نمودار ٤ منحنی استاندارد آسکوربیک اسید (الف) و میزان جذب پروتئین هیدرولیز شده کیلکا بر حسب غلظت به‌دست آمده از آزمون FRAP (ب). داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار است. حروف نشان‌دهندهٔ اختلاف معنادار می‌باشند($p < ۰/۰۵$).

بحث

پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی فعالیت ضداکسیدانی خوبی در برابر آزمون‌های حذف رادیکال و قدرت کاهندگی از خود نشان داد. با توجه به نتایج درجه هیدرولیز، فعالیت حذف رادیکال و قدرت کاهندگی ممکن است مربوط به اندازه کوچک پلی‌پپتیدهای شکل گرفته باشد و به احتمال زیاد این مولکول‌های ضداکسیدانی کوچک به‌طور مؤثری با رادیکال‌های آزاد واکنش نشان داده و از چرخه شکل‌گیری پراکسیداسیون چربی‌ها جلوگیری می‌کند (Saito et al., 2003; Kitts and Weiler, 2003). بالاترین میزان درجه هیدرولیز در دقیقه ۲٤۰ و به مقدار ۵۵/۸ درصد است. نتایج مربوط به درجه هیدرولیز با نتایج Ovissipour و همکاران (۲۰۱۳) که تقریباً در حدود ٥٦ درصد بود، مطابقت دارد. نتایج درجه هیدرولیز نشان‌دهندهٔ این است که میزان هیدرولیز به‌طور معناداری تحت تأثیر زمان هیدرولیز قرار دارد که در تطابق با نتایج سایر محققان است (Sheriff et al., 2014; Ovissipour et al., 2009).

Wang و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که فعالیت ضداکسیدانی ترکیبات هیدرولیز شده مربوط به بعضی از اسیدهای آمینه مانند تیروزین، متیونین، هیستیدین، لیزین، گلایسین و تریپتوفان می‌باشد. همچنین با توجه به اختلاف معناداری که بین غلظت‌ها وجود دارد می‌توان نتیجه گرفت که با افزایش غلظت، ویژگی ضداکسیدانی افزایش می‌یابد که با نتایج Khaled et al., (2012) Ktari et al., (2012)، Nasri et al., (2013) و Taheri et al., (2014) مطابقت دارد.

پایداری نسبی رادیکال DPPH موجب شده تا به‌طورگسترده برای آزمایش‌هایی که ترکیبات آنها توانایی حذف رادیکال آزاد را دارند و یا دهندهٔ هیدروژن می‌باشند، استفاده شود (Jao and Ko, 2002). از این‌رو DPPH، با پذیرفتن یک الکترون یا هیدروژن به 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine، که یک مولکول پایدار است، تبدیل می‌شود و جذب به‌تدریج کاهش و در حضور پروتون ماده اهداکننده رنگ محلول از بنفش به زرد تغییر می یابد

(Yamaguchi et al., 1998; Xie et al., 2008). اهـدای هیدروژن از ضداکسیدان‌ها به رادیکال‌هـای آزاد منجـر بـه غیرسمی شدن رادیکال‌ها مـی‌شـود و از شـکل‌گیـری فـاز انتشـار در اکسیداسـیون لیپیـدها و واکـنش زنجیـره‌ای رادیکال‌ها ممانعـت مـی‌کنـد (Li et al., 2008). بـه همـین علت، DPPH اغلب بـه‌عنـوان سوبسـترایی بـرای ارزیـابی فعالیت ضداکسیدانی استفاده می‌شود.

ABTS یک رادیکال کاتیونی رنگـی اسـت کـه جـذب قوی در ۷۳٤ نانومتر نشـان مـی‌دهـد. وقتـی یـک ترکیـب ضداکسـیدانی یـا نمونـه بـه ایـن محلـول اضـافه شـود، اکسیداسیون ABTS به تعویق مـی‌افتـد و واکـنش، مقـدار بیشتری از جریان الکتریکی را که مربوط به میـزان فعالیـت ضداکسیدانی نمونه اضـافه شـده اسـت، مصـرف مـی‌کنـد (Wang et al., 2012). نتـایج فعالیـت حـذف رادیکـال DPPH و ABTS بـا نتـایجی کـه از سـوی Cheng et al., (2006)، Xie et al., (2008)، Zhang et al., (2008) و Wang et al., (2012) گزارش شـده اسـت، مطابقـت دارد. این نتایج نشان داد پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی حاوی اسیدآمینه/پپتیدهایی است که بـه‌عنـوان اهـدا کننـده هیدروژن عمل کرده و از ایـن طریـق رادیکـال آزاد را بـه مولکول‌های پایدار تبدیل می‌کنند.

آزمون قدرت کاهندگی اغلـب بـرای ارزیـابی توانـایی مـواد ضداکسـیدان در اهـدای الکتـرون اسـتفاده می‌شود(Yildirim et al., 2000) . در این آزمایش بسته بـه قدرت هر غلظت، رنگ زرد محلول آزمایش به سبز و آبـی تغییر می‌یابد؛ حضور کاهنده‌هـا یـا مـواد ضداکسـیدانی در نمونـه‌هـا منجـر بـه کـاهش شـکل‌گیـری کمـپلکس Fe^{3+}/ferricyanide و تبـدیل بـه فـرم فـرو[1] مـی‌شـود (Bougatef et al., 2009). مطالعات مختلفی گزارش کردند که ارتباط مستقیمی بـین فعالیـت ضداکسـیدانی و قـدرت کاهنـدگی پـروتئین و پپتیـد هیـدولیز شـده وجـود دارد (Bougatef et al., 2009; Duh et al., 1999). توانـایی پروتئین هیدرولیز شـده در کـاهش Fe^{3+} بـه Fe^{2+}، نشـان می‌دهد که ضداکسیدان‌های موجـود در ترکیـب هیـدرولیز شده کیلکـا شـکل‌گیـری کمـپلکس Fe^{3+}/ferricyanide را کاهش مـی‌دهنـد کـه بـا نتـایج Wu و همکـاران (2003)، Klompong و همکـاران (2008)، Raghvan و همکـاران (2008)، Ovissipour و همکـاران (2013) و Taheri و همکاران (2014) مطابقت دارد.

در همـین راسـتا، Klompong و همکـاران (2008)، فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گیش خط زرد (*Selaroides leptolepis*) را بررسی کردند. در این مطالعـه درجه هیدرولیز به‌دست آمده برابر ۱۵ درصـد بـود و همـه غلظت‌ها فعالیت ضداکسیدانی در برابر آزمون‌های فعالیـت حـذف‌کننـدگی رادیکـال DPPH، قـدرت کاهنـدگی و چلاته‌کنندگی آهن را نشان دادند.

همچنـین در تحقیقـی دیگـر، García-Moreno و همکـاران (۲۰۱٤)، ویژگـی ضداکسـیدانی ۵ گونـه مـاهی کم‌ارزش دریای مدیترانه بـه نـام‌هـای سـاردین (*sardina pilchrdus*)، ماکرل (*Trachurus meditrraneus*)، سی بریم (Pagellus acarne)، بوگـو (Boops boops) و کوسـه گربه‌ای (*Scyliorhinus canicula*) را بررسی کردند. در این تحقیـق، محـدودهٔ درجـه هیـدرولیز از ۲۱-۱۳ درصـد و محتوای پروتئینـی نیـز در دامنـه ۸۹/۵-۶۰/۷ درصـد بـود. همچنین، بالاترین قدرت حذف‌کننـدگی رادیکـال DPPH، برای ترکیب هیدرولیز شـده سـاردین و مـاکرل بـا EC_{50}[2] ۱/۷۸-۰/۹۱ میلی‌گرم پروتئین در میلـی‌لیتـر بـود. ترکیـب هیدرولیز شده ساردین و بوگو، بالاترین قدرت کاهندگی را

1. ferrous form

2. Concentration of antioxidant required to quench 50% of the stable free radicals.

ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی ... ــــــ

Khoshkhoo, Z., Motalebi, A., Khanipour, A. A., Firozjaee, H. K., and Mahdabi, M. N. M. 2010. Study on Changes of Protein and Lipid of Fish Protein Concentrate (FPC) Produced form Kilkas in VP and MAP Packages at Light and Darkness condition During Six Months, *IJESD*, 1 (1): 101-106.

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(6), 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.

Ktari, N., Jridi, M., Bkhairia, I., Sayari, N., Salah, R. B., and Nasri, M. 2012. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from muscle of zebra blenny (Salaria basilisca) obtained with different crude protease extracts. *Food Research International,* 49(2), 747-756.

Li, Y., Jiang, B., Zhang, T., Mu, W., and Liu, J. 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food chemistry*, 106(2), 444-450.

Lin, H.-M., Deng, S.-G., Huang, S.-B. 2014. Antioxidant activities of ferrous-chelating peptides isolated from five types of low-value fish protein hydrolysates. *Journal of Food Biochemistry*, 38(6), 627–633.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.

Motalehi, A., Perafkandeh, F., 2009. The situation CLUPEIDAE reserves in the Caspian Sea, *Iranian Fisheries Research Organization*, 32P

Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., and Karra-Châabouni, M. 2013. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (Zosterissessor ophiocephalus) fish protein hydrolysates: effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54(1), 552-561.

Ovissipour, MR., Abedian, A. M., Motamed Zadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shayari, H.

Gómez-Ruiz, J. Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., and Recio, I. 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC-MS/MS. *European Food Research and Technology*, 227(4), 1061-1067.

Iran Fisheries Organization, 2013. Statistical Yearbook of the Iranian Fisheries Organization, Guilan Photo Publishers, 64P.

JAO, C. L., and KO, W. C. 2002. 1, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2), 430-435.

Je, J. Y., Park, P. J., and Kim, S. K. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate. *Food Research International*., 38(1), 45-50.

Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., and Kim, S. K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219(1), 20-26.

Kim, D. H., Choi, S. Y., Kim, C. S., Oh, M. J., and Jeong, H. D. 2013. Low-value fish used as feed in aquaculture were a source of furunculosis caused by atypical Aeromonas salmonicida. *Aquaculture*, 408, 113-117.

Kitts, D. D., and Weiler, K. 2003. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. *Current pharmaceutical design*, 9(16), 1309-1323.

Khaled, H. B., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M. A., and Nasri, M. 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food research international*, 45(1), 60-68.

Khantaphant, S., Benjakul, S., and Ghomi, M. R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *LWT-Food Science and Technology*, 44(4), 1139-1148.

Khora, S. S. 2013. Marine fish-derived bioactive peptides and proteins for human therapeutics. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(3), 31-37.

ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی ... ــــــ

Fisheries Science & Technology
TMU
Scientific - Research Journal Vol. 5, No. 3, Autumn 2016

Evaluation of antioxidant activity of protein hydrolysate from common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*)

Mohammad Reza Soleimani[1] , Seyed Fakhreddin Hosseini[2*] , Maryam Nikkhah[3]

1- M. Sc. Student, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2- Assistant Prof, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3- Assistant Prof, Department of Nanobiotechnology, Faculty of biology science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

Received: 03.01.2016 Accepted: 15.02.2016

*Corresponding Author: hosseinisf@modares.ac.ir

Abstract

Fish protein hydrolysates from whole kilka, using alcalase enzyme (ratio 1: 100) under optimal temperature (55°C) and pH (8.5) was evaluated for its hydrolysis degree and antioxidant activity. Results of the hydrolysis degree recorded at time intervals of 1, 2, 3 and 4 hours indicated the hydrolysis degree increased with increase in the hydrolysis time. The evaluation of FPH antioxidant activity, using DPPH, ABTS and reducing power assay tests at 3 concentrations (1, 2 and 5 mg/ml indicated the highest inhibitory effect at 5 mg/ml was 74.4%, 72.3% and 1.8 absorbance in 700 nm for DPPH, ABTS and reducing power assay, respectively. Generally, the findings of this research confirmed the potential of kilka as a source of natural antioxidants for food applications.

Keywords: Common Kilka, Alcalase, Antioxidant activity, DPPH, ABTS, Reducing power assay.