

هیدرولیز آنزیمی ژلاتین پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ارزیابی خاصیت ضد اکسیدانی آن

لیلا رمضان زاده^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

پذیرش: ۹۴/۱۱/۲۶

دریافت: ۹۴/۰۹/۰۷

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

چکیده:

در این تحقیق، ابتدا ژلاتین با دو تیمار بازی و اسیدی شامل محلول سود ۰/۱۹ نرمال و اسید استیک ۰/۱۲ نرمال با نسبت پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به محلول ۱ به ۷ و سپس تیمار حرارتی ۵۰ درجه سانتی گراد ساعت استخراج شد. سپس توسط آنزیم آکالاز به مدت ۴ ساعت و با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱ به ۱۰۰ هیدرولیز شده و درجه هیدرولیز در پایان ساعت چهارم اندازه‌گیری شد. فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و ارزیابی قدرت کاهندگی ژلاتین هیدرولیز شده بررسی شد. نتایج نشان داد درجه هیدرولیز پس از ۴ ساعت به میزان ۴۶۷٪ مشاهده می‌شود. همچنین بالاترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و ارزیابی قدرت کاهندگی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۰/۳۹/۸، ۰/۵۰/۷ و ۰/۱۲۳ به دست آمد. نتایج نشان داد که پپتیدهای حاصل از ژلاتین پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان می‌تواند به عنوان یک ضد اکسیدان طبیعی در نظر گرفته شود.

کلید واژگان: ژلاتین هیدرولیز شده، خاصیت ضد اکسیدانی، DPPH، ABTS، ارزیابی قدرت

کاهندگی.

مقدمه

بیشتری از چگونگی دستیابی به سلامت از طریق رژیم

تغذیه‌ای هستند (Annunziata and Vecchio, 2010).

امروزه مواد غذایی نه تنها برای رفع گرسنگی و فراهم

مصرف کنندگان مواد غذایی امروزه اهمیت بیشتری برای

سلامت اعضای بدن خود قائل هستند و خواستار اطلاعات

گونه‌های اکسیژن یگانه و یا از طریق غیر فعال کردن کاتالیست‌های فلزی خاتمه دهند، بنابراین ضد اکسیدان‌ها پایداری چربی‌های غذا را افزایش می‌دهند (Najafian and babji, 2012). امروزه، علاقه رو به رشدی در جایگزینی ضد اکسیدان‌های مصنوعی با ضد اکسیدان‌های طبیعی با منشاء غذایی وجود دارد زیرا دارای مزایای ارائه سلامتی با عوارض جانبی کم می‌باشند (Sarmadi and Ismail, 2010). هم‌چنین ضد اکسیدان‌های مصنوعی ممکن است به عنوان عوامل جهش زا و سرطان زا عمل کنند (Aubourg, 2000). در طی فرآوری ماهیان، مقادیر زیادی از ضایعات به شکل جامد و مایع تولید می‌شوند (Jayathilakan et al., 2012). حدود ۵۰٪ از وزن کل ماهیانی که فرآوری می‌شوند، به عنوان پسماند دور ریخته می‌شود (Himaya and Kim, 2014) که از میان آن‌ها پوست در حدود ۳۰٪ از مواد زائد ناشی از فیله کردن ماهی را در صنعت غذاهای دریایی تشکیل می‌دهد (Gómez-Guillén et al., 2009)، بنابراین عاقلانه‌تر است تا از ضایعات ماهی و باقی‌مانده های ماده خام^۱ برای تولید موادی با قابلیت کارکردی بالا استفاده بهتری گردد (Li, 2014).

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*O. mykiss*) یکی از گونه‌های مهم پرورشی آب شیرین در ایران می‌باشد که بر اساس آخرین آمار سازمان شیلات میزان تولید آن، ۱۳۱۰۰۰ تن بوده است (Iran Annual Fisheries Staistics, 2013)، که فرآوری آن منجر به تولید مقادیر فراوانی پوست خام می‌گردد (Tabarestani et al., 2010)، که می‌تواند ماده خام مناسبی برای تولید ژلاتین باشد (Arnesen and Gildberg, 2007; Hosseini et al., 2015). هم‌چنین اثرات مضر زیست‌محیطی ناشی از دفع

کردن مواد مغذی لازم برای انسان در نظر گرفته می‌شود بلکه جهت جلوگیری از بیماری‌های مربوط به تغذیه و بهبود سلامت جسمی و روانی مصرف کنندگان استفاده می‌شود (Menrad, 2003). در این راستا، غذاهای کارکردی نقش برجسته ای را ایفا می‌کنند (Siro et al., 2008). غذاهای کارکردی شامل یک غذای کامل یا غنی شده و بهبود یافته می‌باشند که در صورت مصرف منظم در سطوح موثر در بخشی از یک رژیم غذایی متنوع، مزایای سلامتی بیش‌تری را نسبت به مواد مغذی متعارف فراهم می‌کنند (Hasler, 2002). این نوع غذاها ممکن است شرایط عمومی بدن را بهبود بخشند، خطر ابتلا به برخی از بیماری‌ها را کاهش دهند (به عنوان مثال محصولات کاهش دهنده کلسترول خون) و حتی می‌توانند در جهت درمان برخی از بیماری‌ها استفاده شوند (Siro et al., 2008). اهمیت ماهی به عنوان منبعی از مواد زیست‌فعال جدید با سرعت نسبتاً زیادی در حال رشد است (Najafian and babji, 2012)، که با دارا بودن اسیدهای چرب چند غیر اشباع، مواد معدنی و ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال و نیز ضد اکسیدان‌ها منبعی از مواد کارکردی را ارائه می‌کند (Pomponi, 1999).

اهمیت اکسیداسیون در بدن و مواد غذایی شناخته شده است و این متابولیسم برای بقای سلول ضروری است. یکی از اثرات جانبی این واکنش تولید رادیکال‌های آزاد و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال است که باعث تغییرات اکسیداتیو می‌شود (Sharma et al., 2011). ضد اکسیدان‌ها با اهدای یک اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال تشکیل شده از چربی‌های غیر اشباع مانع اکسیداسیون می‌شوند و می‌توانند واکنش‌های زنجیره ای را با از بین بردن آغازگرها یا رادیکال‌های واسطه از محیط با مهار

1 By-product

Giménez و همکاران (۲۰۰۹) ژلاتین پوست کفشک ماهی و ماهی مرکب را به کمک آنزیم آلکالاز هیدرولیز نموده و خواص زیستی و ضداکسیدانی آن را به ترتیب در درجه هیدرولیز ۳۰ و ۵۰٪ بررسی کردند. نتایج نشان داد که ژلاتین ماهی مرکب هیدرولیز شده بالاترین ظرفیت ضداکسیدانی را با روش‌های ارزیابی قدرت کاهندگی^۴، مهار رادیکال آزاد ABTS و چلاته کردن فلزات از خود نشان می‌دهد.

Alemán و همکاران (۲۰۱۱) خاصیت ضداکسیدانی ژلاتین پوست ماهی تن (*Thunnus spp.*) و هالیبوت (*Hypoglossus spp.*) هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز را مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل از ارزیابی قدرت کاهندگی و مهار رادیکال آزاد ABTS نشان داد که هیدرولیز سبب افزایش پتانسیل ضداکسیدانی می‌شود. به علاوه هیدرولیز با آنزیم آلکالاز بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS را در مقایسه با سایر آنزیم‌ها نشان داد.

به طور کلی نتایج تحقیقات نشان داده است که ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی، فعالیت ضداکسیدانی قابل توجهی از خود نشان داده و می‌تواند به عنوان گزینه‌ای با ویژگی مشابه ضداکسیدان‌های طبیعی در نظر گرفته شود (Sukkwai et al., 2011). هرچند ماهی قزل‌آلای رنگین کمان در ایران بیشتر به صورت کامل و فیله نشده به فروش می‌رسد و پوست چندانی تولید نمی‌شود اما در مورد هیدرولیز آنزیمی ژلاتین پوست این ماهی و نیز بررسی خاصیت ضداکسیدانی آن گزارشی مشاهده نمی‌شود. بدین منظور تحقیق حاضر با هدف استفاده بهینه از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان به عنوان بخش بزرگی از ضایعات فرآوری ماهی قزل‌آلای رنگین کمان جهت تولید فرآورده با ارزش افزوده و بررسی خاصیت ضداکسیدانی آن انجام شده است.

مواد زائد را نیز به همراه ندارد (Hosseini et al., 2015). ژلاتین مخلوط ناهمگنی از پروتئین‌ها با وزن مولکولی بالای محلول در آب است که توسط تغییر ماهیت^۲ حرارتی کلاژن استخراج می‌شود و به طور گسترده‌ای در جهت بهبود کشسانی، قوام و پایداری غذاها بکار می‌رود (You et al., 2010). این ترکیب حاوی مقدار نسبتاً بالایی از اسید آمینه‌های گلیسین، پرولین و آلانین است (al., 2005). ژلاتین ماهی در حدود ۱/۵٪ از کل تولید سالانه ژلاتین جهان را دارا می‌باشد (Gómez-Guillén et al., 2009). هیدرولیز آنزیمی به طور گسترده‌ای به منظور بهبود و ارتقاء خواص عملکردی و تغذیه‌ای پروتئین‌های غذایی استفاده می‌شود و پروتئین‌های بهتری از نظر خواص تغذیه‌ای و کارکردی ایجاد می‌کند (Kristinsson and Rasco, 2000).

FPH دارای خواص تغذیه‌ای و غذادارویی (Thiansilakul et al., 2007)، ضداکسیدانی (et al., 2012) و مهار آنزیم مبدل آنژیوتانسین I (ACE)^۳ می‌باشد (Bougatef et al., 2008). آلکالاز یک پروتئاز تجاری از یک منبع میکروبی است که جز کارآمدترین آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین ماهی می‌باشد و به علت درجه هیدرولیز بالا در زمان کوتاه، به طور گسترده‌ای در هیدرولیز کلاژن و ژلاتین مورد استفاده قرار می‌گیرد (et al., 2011; Guerard al., 2001). اخیراً، مطالعات مختلفی درمورد استفاده از باقی مانده ماده خام گونه‌های مختلف ماهی با هیدرولیز آنزیمی برای بازیابی ترکیبات ارزشمند و همچنین بررسی خاصیت ضداکسیدانی آن‌ها انجام شده است.

4 Reducing power assay

2 Denaturation
3 Angiotensin-converting enzyme

مواد و روش‌ها

تهیه ماهی و مواد اولیه

۱۰ عدد ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با میانگین وزنی ۱۰۰۰ گرم و طول متوسط ۷۰ سانتی‌متر از مرکز تکثیر و پرورش ماهی در شهرستان آمل تهیه و توسط جعبه یونولیتی در مجاورت پودر یخ با نسبت ماهی به یخ ۱ به ۲ به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس نور منتقل شد. پوست ماهی پس از جداسازی از سایر قسمت‌های بدن با آب سرد شستشو داده شد و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. آنزیم مورد استفاده آلکالاز استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* تهیه شده از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا با میزان فعالیت آنزیمی ۲/۴ واحد آنسون به ازای ۱ میلی‌لیتر آنزیم بود و تا زمان استفاده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت‌های Sigma-aldrich, Merck و Applichem تهیه شدند.

تعیین ترکیب تقریبی

برای سنجش ترکیب تقریبی نمونه‌ها از روش AOAC (2000) استفاده شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از آون (Memmert, Germany) (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد) جهت ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه خشک در بوت‌چینی ریخته شده و در کوره (Nabertherm, Germany) با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین با روش کج‌لدال (Foss Kjeltac 2300, Sweden) بدست آمد. چربی کل نیز با سوکسله (Foss Soxtec 2050, Sweden) استخراج شد.

استخراج ژلاتین

در ابتدا، پوست منجمد شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجماد زدایی شده و پس از تمیز کردن، ابتدا فلس‌ها کنده

شده و ماهیچه و چربی با کارد مخصوص فیله کردن ماهی به طور کامل جدا شد. سپس به قطعات کوچک بریده شده و با آب سرد شستشو داده شد. قطعات پوست با محلول سود (NaOH) (۰/۱۹ نرمال) در دمای ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت تیمار شده و سپس با آب مقطر شستشو شد. پس از آن، نمونه‌ها در اسید استیک سرد (۰/۱۲ نرمال) با نسبت ۱ به ۷ (وزنی/حجمی) در ۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت غوطه‌ور شده و سپس با آب سرد جهت تخلیه اسید شستشو شد. استخراج ژلاتین در آب مقطر با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۶±۲ ساعت در حمام آب (Memmert, Germany) انجام شد. از فیلتر پارچه‌ای دولایه به منظور جداسازی ژلاتین حل شده از قطعات باقی‌مانده پوست استفاده شد. در پایان، ژلاتین به صورت یک فیلم نازک در یک خشک‌کن انجمادی (Operon, et al., 2010) تهیه شد (FDU-7012, South Korea) (Tabarestani).

هیدرولیز آنزیمی ژلاتین

ژلاتین به دست آمده با نسبت ۵٪ (وزنی/حجمی) در آب مقطر حل شده و با آنزیم آلکالاز در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱ به ۱۰۰ در انکوباتور شیکردار (Comecta, Spain) با دور ۲۰۰ rpm هیدرولیز شد. pH واکنش با اضافه کردن محلول سود ۱ نرمال به محیط واکنش برای دستیابی به میزان بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز (pH= ۸-۸/۵) ثابت نگه داشته شد. پس از آن، آنزیم با حرارت دادن مخلوط در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۷۰۰۰×g سانتریفیوژ (Universal 320 R, Germany) شد. مایع

روماند، جمع آوری و در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (Giménez et al, 2009).

سنجش میزان پروتئین

میزان پروتئین محلول در نمونه با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد. از آلبومین سرم گاو^۶ غلظت‌های بین ۰ تا ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد.

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

میزان درجه هیدرولیز با روش Kristinsson و Rasco (۲۰۰۰) انجام شد. درجه هیدرولیز (DH) به کمک TCA^۷ ۲۰٪ (حجمی/حجمی) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش، اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در TCA به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. بدین منظور، حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شد و پس از هم زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۶۷۰۰×g سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله زیر محاسبه شد:

فرمول (۱)

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

سنجش فعالیت ضد اکسیدانی

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH^۸

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH بر طبق روش You و همکاران (۲۰۱۰) انجام شد. ابتدا حجم مساوی از

نمونه ژلاتین هیدرولیز شده با محلول DPPH ۰/۱۶ میلی مولار که در اتانول ۹۵٪ حل شده بود، مخلوط شد. سپس محلول به‌دست آمده به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه میکروپلیت‌ریدر (Biotek, USA) خوانده شد. قدرت مهارکنندگی با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

فرمول (۲)

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

A_{sample}: نمونه با DPPH

A_{blank}: اتانول با DPPH

ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS

ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS با روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) انجام شد. در ابتدا محلول اولیه رادیکال آزاد ABTS (۷ میلی‌مولار در محلول پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد. حجمی از محلول تهیه شده با آب مقطر رقیق شد تا محلول مورد نظر برای انجام آزمایش به میزان جذب ۰/۲ ± ۰/۷ در ۷۳۴ نانومتر رسید. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه ژلاتین هیدرولیز شده با ۹۸۰ میکرولیتر از محلول ABTS مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در مکان تاریک نگهداری شد. سپس جذب آن در طول موج ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. داده‌ها به شکل درصد بازدارندگی بر اساس غلظت بیان شدند. قدرت حذف‌کنندگی با استفاده از رابطه

زیر محاسبه شد:

فرمول (۳)

- 5 Supernatant
- 6 Bovine serum albumin
- 7 Degree of hydrolysis
- 8 Trichloroacetic acid
- 9 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

منظور رسم نمودارها، از نرم افزار Excel استفاده شد. تمام آزمایشات در ۳ تکرار انجام گرفت.

نتایج

تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان در جدول ۱ نشان داده شده است. داده ها بر اساس وزن خشک نمونه تعیین شد. بر این اساس، ترکیبات تقریبی پوست از نظر فراوانی به ترتیب شامل پروتئین، رطوبت، چربی و خاکستر بود. رطوبت با میزان ۶۴/۸۸٪ بیشترین ترکیب پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان را تشکیل داده است.

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

هم چنین جهت مقایسه نمونه هیدرولیز شده با یک ضد اکسیدان طبیعی از اسید آسکوربیک استفاده شد. ارزیابی قدرت کاهندگی^{۱۰}

بدین منظور ۱ میلی لیتر از نمونه ژلاتین هیدرولیز شده با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH= ۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر فری سیانید پتاسیم^{۱۱} ۱٪ ترکیب شد. ترکیب حاصله به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفته، سپس ۲/۵ میلی لیتر محلول TCA ۱۰٪ (حجمی/حجمی) به آن اضافه شد. در ادامه، ترکیب حاصل به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۶۵۰×g سانتریفیوژ شد. در نهایت به ۲/۵ میلی لیتر از فاز بالایی، ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن III ۰/۱٪ اضافه شد. سپس این محلول در دمای ثابتی به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا تغییر رنگ در آن صورت گرفت. میزان جذب محلول نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری شد. هم چنین جهت مقایسه نمونه هیدرولیز شده با یک ضد اکسیدان طبیعی از اسید آسکوربیک استفاده شد (et al., 2008; Chew).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS انجام شد. برای این کار ابتدا با استفاده از آزمون کولموگروف-- اسمیرنف از نرمال بودن داده ها اطمینان حاصل شد و سپس از آزمون واریانس یک طرفه (One way ANOVA) استفاده شد. همچنین جهت تعیین وجود تفاوت معنادار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون حداقل تفاوت معنادار (LSD) در سطح (p ≤ ۰/۰۵) استفاده شد. هم چنین به

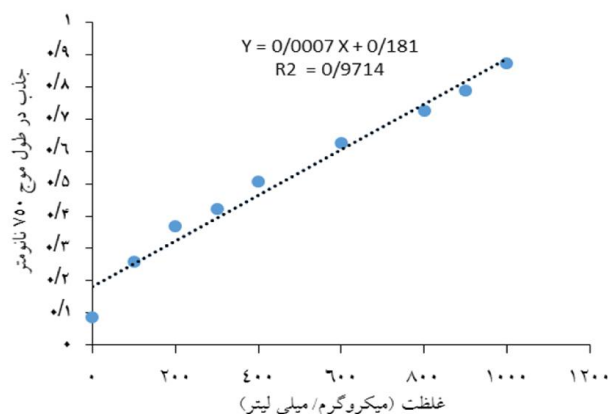
10 Reduction power assay
11 potassium Ferricyanide

جدول ۱ ترکیبات تقریبی پوست ماهی قزل‌آلای رنگین کمان.

ماده	رطوبت (%)	چربی (%)	خاکستر (%)	پروتئین (%)
پوست	۶۴/۸۸ ± ۰/۷۵	۱/۳۷ ± ۰/۲	۲/۷۱ ± ۰/۵۳	۳۱/۶۸ ± ۱/۰۱

درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز بعد از ۴ ساعت هیدرولیز ۴۶/۷٪ به دست آمد.



شکل ۱ منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی.

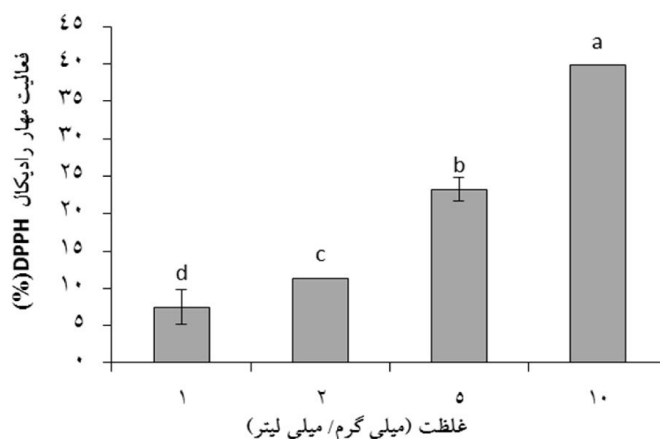
بررسی خاصیت ضد اکسیدانی

در این مطالعه از ۳ روش زیر برای ارزیابی این خاصیت استفاده شد.

قدرت حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH

نتایج مربوط به درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در شکل ۲ نشان داده شده است. نتایج حاصل نشان داد که همه غلظت‌های ژلاتین هیدرولیز شده، توانایی مهار

رادیکال آزاد DPPH را دارا می‌باشد و با افزایش غلظت، درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد. بالاترین فعالیت مهارکنندگی به میزان ۴۰٪ در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد. هم‌چنین بین غلظت‌های مختلف ژلاتین هیدرولیز شده در مهار رادیکال آزاد DPPH تفاوت معنادار مشاهده شد ($p < 0/05$).



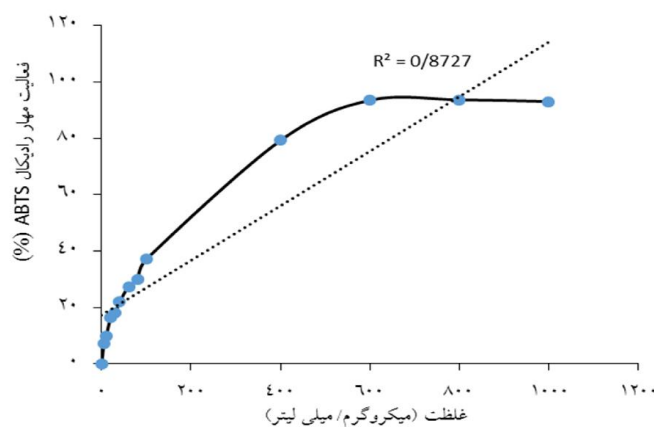
شکل ۲ فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH ژلاتین هیدرولیز شده.

داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشند ($p < 0.05$).

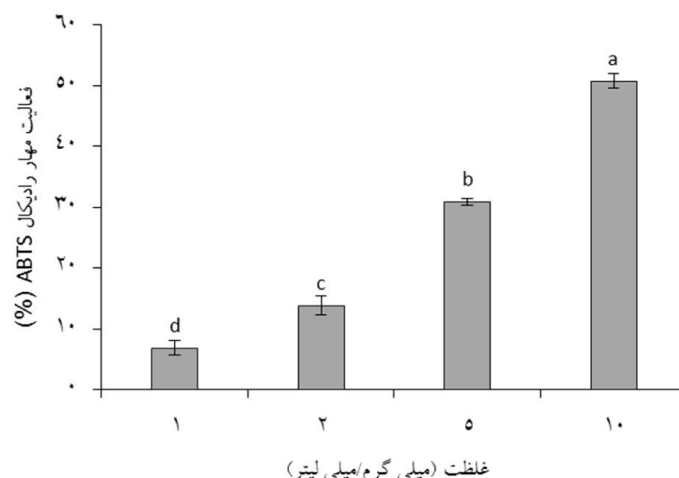
ظرفیت مهار رادیکال ABTS

نتایج مربوط به درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS توسط ژلاتین هیدرولیز شده در شکل ۳ ارائه شده است. بالاترین فعالیت مهارکنندگی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر با درصد بازدارندگی ۵۰/۷۸٪ مشاهده شد. نتایج

حاصل نشان داد که هر ۴ غلظت ژلاتین هیدرولیز شده توانایی مهار این رادیکال را دارا بوده و با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده درصد مهارکنندگی افزایش می‌یابد و بین غلظت‌های مختلف نمونه در مهار رادیکال آزاد ABTS تفاوت معنادار در سطح ۰/۰۵٪ مشاهده می‌شود.



شکل ۳ درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS اسید آسکوربیک.



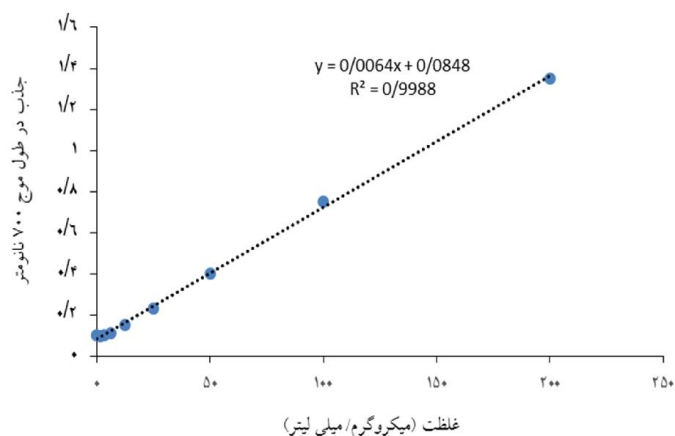
شکل ۴ درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد ABTS ژلاتین هیدرولیز شده.

داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنادار می‌باشند ($p < 0.05$).

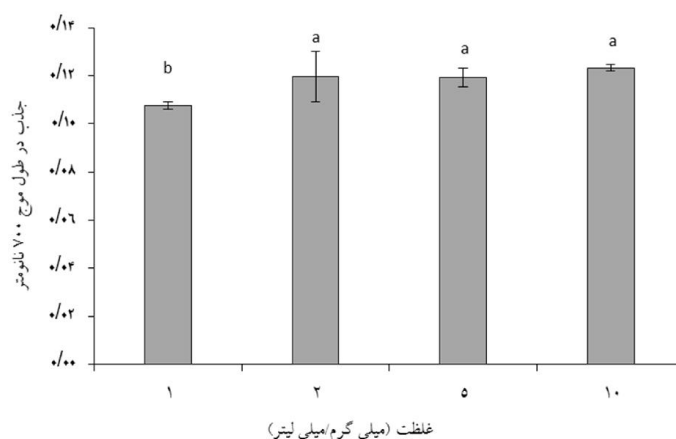
و ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر اختلاف معناداری مشاهده نشد ($p > 0.05$). در حالی که غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر با ۳ غلظت دیگر اختلاف معنادار نشان داد ($p < 0.05$). هم چنین قدرت کاهندگی به طور معناداری از اسید اسکوربیک کم تر بود.

ارزیابی قدرت کاهندگی

نتایج مربوط به ارزیابی قدرت کاهندگی نمونه هیدرولیز شده در شکل ۴ نمایش داده شده است. با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده میزان جذب و قدرت کاهندگی افزایش می‌یابد. بالاترین میزان قدرت کاهندگی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر مشاهده شد. بین غلظت‌های ۲، ۵



شکل ۵ منحنی استاندارد آسکوربیک اسید.



شکل ۶ میزان جذب ژلاتین هیدرولیز شده بر حسب غلظت.

داده‌ها بصورت میانگین $\pm$ انحراف معیار است. حروف متفاوت نشان‌دهنده‌ی اختلاف معنادار می‌باشند ($p < 0.05$).

بحث

امروزه پوست ماهی به دلیل عرضه ماهی به صورت فیله توسط برخی از کارخانه‌های شیلاتی، به یکی از مشکلات صنعت فرآوری محصولات شیلاتی تبدیل شده است. با توجه به پتانسیل بالای ژلاتین در ارائه خواص کارکردی، تولید پروتئین هیدرولیز شده از ژلاتین پوست ماهی هم از نگاه اقتصادی و هم تولید محصولی با ارزش بسیار حائز اهمیت می‌باشد.

ترکیبات شیمیایی مواد غذایی با فراهم کردن مواد مغذی ضروری، نقش مهمی را در سلامت بدن ایفا می‌کنند (Bakhshan et al., 2014). ثابت شده است که ترکیبات شیمیایی پوست ماهی با توجه به سن و جنس ماهی متفاوت می‌باشد (Songchotikunpan et al., 2008). در رابطه با ترکیبات تقریبی به‌دست آمده از آنالیز پوست ماهی، نتایج مشابهی توسط محققان گزارش شده است. Songchotikunpan و همکاران (۲۰۰۸) ترکیبات تقریبی پوست ماهی تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) را به‌دست آوردند. نتایج نشان داد که پوست این ماهی دارای میزان رطوبت ۶۷/۷٪، پروتئین ۳۰/۶٪، چربی ۱/۱٪ و

خاکستر ۲/۱٪ بود. هم‌چنین Kittiphattanabawon و همکاران (۲۰۰۵) میزان رطوبت ۶۴/۰۸٪، پروتئین ۳۲٪، چربی ۰/۹۸٪ و خاکستر ۳/۲۳٪ را در ترکیبات تقریبی پوست ماهی سرخو چشم درشت (*Priacanthus tayenus*) به‌دست آوردند که با نتایج حاصل از این پژوهش مشابه می‌باشد.

درجه هیدرولیز پروتئین وابسته به ماهیت سوبسترا، آنزیم و شرایط واکنش است (Galla et al., 2012). نتایج درجه هیدرولیز نشان داد که در پایان ساعت چهارم، درجه هیدرولیز نسبتاً بالایی مشاهده می‌شود. فعالیت بیشتر آنزیم در نتیجه مدت زمان بیشتر تماس با سوبسترا سبب هیدرولیز بیشتر و افزایش حلالیت می‌شود. این یافته در تطابق با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین بوده است (Giménez et al., 2009; Gómez-Guillén et al., 2010). هم‌چنین در تناقض با نتیجه به دست آمده در این تحقیق، یافته‌های به دست آمده توسط Rasco و Kritinsson (۲۰۰۰) درخصوص هیدرولیز ماهی آزاد نشان داد که روند هیدرولیز با افزایش زمان هیدرولیز کاهش یافته و ثابت باقی می‌ماند، که علت آن را کاهش غلظت پیوندهای

پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم، مهار آنزیم و غیر فعال شدن آن بیان کردند.

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که حداکثر جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر نشان می‌دهد. وقتی رادیکال آزاد DPPH با ماده اهدا کننده هیدروژن مواجه می‌شود رادیکال‌ها مهار شده و رنگ آن از ارغوانی به زرد تغییر می‌یابد و جذب آن کاهش می‌یابد (Nalinanon et al., 2011). نتایج مربوط به آزمون ضد اکسیدانی مهار رادیکال آزاد DPPH نشان داد که با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده، درصد مهار کنندگی رادیکال‌ها افزایش می‌یابد، بطوری که نمونه با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر دارای بیشترین خاصیت مهار کنندگی می‌باشد. نتایج مشابهی در مطالعات انجام گرفته بوسیله سایر محققان گزارش شد (Yang et al., Jridi et al., 2014; Nasri et al., 2013; Yang et al., 2009; Je et al., 2009; Yang, 2008). همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی تیلاپیا، درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH افزایش می‌یابد و در غلظت ۲۶ تا ۲۸ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین درصد مهار کنندگی مشاهده شد. همچنین Pires و همکاران (۲۰۱۳) نشان دادند که بین درصد مهار رادیکال آزاد DPPH و غلظت پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد (*Merluccius capensis*) رابطه مستقیم وجود داشته و با افزایش غلظت پروتئین درصد مهار کنندگی افزایش می‌یابد. بیشترین خاصیت مهار کنندگی نیز در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شد.

رادیکال آزاد ABTS رادیکالی نسبتاً پایدار است و به آسانی توسط ضد اکسیدان‌ها مهار می‌شود (Nalinanon et al., 2011). آزمون مهار رادیکال آزاد ABTS، روشی مناسب برای اندازه گیری فعالیت ضد اکسیدانی ترکیبات

اهدا کننده هیدروژن، مهار کننده رادیکال‌های فاز آبی و ضد اکسیدان‌های شکننده زنجیره هستند (Nalinanon et al., 2011). نتایج مربوط به مهار کنندگی رادیکال آزاد ABTS نشان داد که با افزایش غلظت نمونه هیدرولیز شده، میزان فعالیت مهار کنندگی نیز افزایش می‌یابد و غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان مقدار بهینه برای ارائه ویژگی ضد اکسیدانی این ترکیب محسوب می‌شود که در تطابق با نتایج سایر محققان می‌باشد (Pires et al., 2013; Godinho, 2013; Intarasirisawat et al., 2012). مطالعه ای که توسط Godinho و همکاران (۲۰۱۳) انجام شده است، روندی صعودی در میزان مهار رادیکال آزاد ABTS با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد مشاهده شد. نتایج حاصل از تحقیق Pires و همکاران (۲۰۱۳) نیز نشان داد افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک موجب افزایش مهار کنندگی رادیکال آزاد ABTS شده و در غلظت ۱۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین میزان مهار کنندگی مشاهده می‌شود.

روش ارزیابی قدرت کاهندگی اغلب جهت بررسی توانایی یک ضد اکسیدان برای اهدای الکترون انجام می‌شود و مکانیسمی است که برای پایداری رادیکال‌های آزاد توسط پروتئین هیدرولیز شده استفاده می‌شود (Kumar et al., 2011). این روش توانایی کاهش یون فریک (Fe^{3+}) و تبدیل آن به یون فرو (Fe^{2+}) را اندازه گیری می‌کند (Ovissipour et al., 2013; Ktari et al., 2013). در این روش رنگ زرد محلول واکنش به رنگ‌های مختلف (بین طیف سبز و آبی) وابسته به قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده تغییر می‌کند. قدرت کاهندگی یک ترکیب می‌تواند شاخصی قابل توجه برای ارائه پتانسیل ضد اکسیدانی آن ترکیب باشد. افزایش میزان جذب نمونه‌ها بیانگر افزایش قدرت احیا کنندگی آن‌ها می‌باشد. ارزیابی

قدرت کاهندگی نشان داد که با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده، جذب نمونه‌ها افزایش یافته و بین غلظت‌های بالاتر از ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تفاوت معنادار مشاهده نمی‌شود (Je et al., 2009). در این رابطه نتایج مشابهی در تحقیق سایر محققان مشاهده می‌شود (Klompong et al., 2008; Kumar et al., 2012; Pires et al., 2013; Jridi et al., 2014; García-Moreno et al., 2014; Khaled et al., 2014). نتایج مطالعات Jridi و همکاران (۲۰۱۴) بر روی خاصیت ضداکسیدانی ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی مرکب نشان داد که قدرت کاهندگی وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت نمونه هیدرولیز شده روندی صعودی دارد. هم‌چنین بالاترین میزان جذب در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش شد. به علاوه، نتایج مطالعات Pires و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی هیک، جذبی نزدیک به ۰/۲ نانومتر به‌دست می‌آید. Khaled و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان دادند که با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده ماهیچه ماهی ساردین، روندی خطی در افزایش قدرت کاهندگی مشاهده می‌شود و در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش‌ترین میزان کاهندگی مشاهده می‌شود.

پروتئین هیدرولیز شده شامل پپتیدها و یا پروتئین‌های اهدا کننده هیدروژن می‌باشند که با رادیکال‌ها واکنش نشان داده و آن‌ها را به محصولات پایدار تبدیل کنند، در نتیجه باعث قطع واکنش زنجیره ای رادیکال می‌شوند (Khantaphant and Benjakul, 2008). فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده وابسته به چندین عامل از جمله نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، حلالیت پروتئین‌ها، طبقه پپتیدها و حضور اسید آمینه‌های آزاد می‌باشد (Galla et al., 2012). نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که پوست ماهی منبع غنی از ژلاتین با خواص

کارکردی متعدد بوده که این امر لزوم استفاده از آن را در رژیم غذایی موجب می‌شود. ژلاتین هیدرولیز شده حاصل از آن شامل پپتیدهای اهدا کننده الکترون بوده و توانایی مهار رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشد. فعالیت بالای ژلاتین هیدرولیز شده در مهار رادیکال‌های آزاد جهت بازدارندگی فعالیت اکسیداسیونی، امکان استفاده بیش‌تر از این ترکیب زیست فعال به جای ضداکسیدان‌های مصنوعی را در آینده فراهم می‌سازد که می‌تواند در آینده به عنوان غذای کارکردی مورد استفاده قرار گیرد. بنابراین مطلوب است تا تحقیقات بیش‌تری در این زمینه به خصوص جداسازی پپتیدهای زیست فعال با خواص کارکردی مطلوب انجام شود.

تشکر و قدردانی

تحقیق حاضر در راستای بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد دانشگاه تربیت مدرس انجام شده است. از دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس جهت کمک‌های مالی و معنوی و نیز از کمک‌های بی دریغ کارشناسان آزمایشگاه، و هم‌چنین آقای مهندس محمدرضا سلیمانی و خانم مهندس مینا اسمعیلی خاریکی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

منابع

Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. C. 2011. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*, 44 (2): 407-413.

Annunziata, A. A., and Vecchiob, R. 2010. Italian consumer attitudes toward products for well-being: the functional foods market. *International Food and Agribusiness Management Review*, 13 (2): 19-50.

AOAC. 2005. Official Method of Analysis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical.

- Gómez-Guillén, M. C., Giménez, B., López-Caballero, M. A., and Montero, M. P. 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25 (8): 1813-1827.
- Gómez Guillén, M. C.; López Caballero, M. E.; Alemán, A.; López de Lacey, A; Giménez, B.; Montero García, P. 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin, 89-115, Estelle Le Bihan, Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application, Transworld Research Network, Trivandrum, India, 161.
- Gómez-Guillén, M. C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., and Montero, P. 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. *Trends in Food Science & Technology*, 20 (1): 3-16.
- Guerard, F., Dufosse, L., De La Broise, D., and Binet, A. 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11 (4): 1051-1059.
- Hasler, C. M. 2002. Functional foods: benefits, concerns and challenges-A position paper from the American council on science and health. *The Journal of nutrition*, 132 (12): 3772-3781.
- Himaya, S. W. A., and Kim, S. K. 2014. Functional Proteins and Peptides from Fish Skin, Seafood Processing By-Products, pp 197-205, Kim, S. K., Seafood Processing By-Products, Springer New York, 597p.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., and Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bionanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, 44, 172-182.
- Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M., and Farahmandghavi, F. (2015). Bio-based composite edible films containing *Origanum vulgare* L. essential oil. *Industrial Crops and Products*, 67, 403-413.
- Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W., and Wu, J. 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food chemistry*, 135 (4): 3039-3048.
- Arnesen, J. A., and Gildberg, A. 2007. Extraction and characterisation of gelatin from Atlantic salmon (*Salmo salar*) skin. *Bioresource Technology*, 98 (1): 53-57.
- Aubourg, S. P. 2000. Assessment of antioxidant effectiveness on thermally treated marine lipids by fluorescence detection. *European Food Research Technology*, 211 (5): 310-315.
- Bakhshan, A., Doghikolaei, A. E., Taheri, A. 2014. The antioxidant properties of protein hydrolyzate derived from waste in the fillet process of salmon (*Salmo salar*). *Comparative Pathobiology*, 11 (1): 1143-1152.
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Ravallec-Plé, R., Leroy, Y., Guillochon, D., Barkia, A., and Nasri, M. 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry*, 111 (2): 350-356.
- Chalamaiah, M., Hemalatha, R., and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food chemistry*, 135 (4): 3020-3038.
- Chew, Y. L., Omar, M., and Khoo, K. S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in southeast asia. *LWT-food science and technology*, 41 (6): 1067-1072.
- García-Moreno, P. J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N. M., Espejo-Carpio, F. J., Guadix, A., and Guadix, E. M. 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65 (c): 469-476.
- Galla, N. R., Pamidighantam, P. R., Akula, S., and Karakala, B. 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food chemistry*, 135 (3): 1479-1484.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. C. 2009. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. *Food Chemistry*, 114 (3): 976-983.
- Godinho, I.S.M. 2013. Production of fish protein hydrolysates by a marine proteolytic strain, Lisboa: ISA, 87 p.

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.

Kumar, N. S., Nazeer, R. A., and Jaiganesh, R. 2011. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, 32 (7): 1496-1501.

Kumar, N. S., Nazeer, R. A., and Jaiganesh, R. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Amino Acids*, 42 (5): 1641-1649.

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.

Li, Z. 2014. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes, Master of Science Thesis, The university of Dalhousie, Halifax, Canada.

Mendis, E., Rajapakse, N., and Kim S. K. 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysates. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (3): 581-587.

Menrad, K. 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of food engineering*, 56 (2): 181-188.

Najafian, L., and Babji, A. S. 2012. A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33 (1): 178-185.

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 (4): 1354-1362.

Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (7): 1718-1726.

Iranian Fisheries Organization. 2013. Annual Fisheries Statistics. pp. 64. In Farsi.

Jayathilakan, K., Sultana, K., Radhakrishna, K., and Bawa, A. S. 2012. Utilization of byproducts and waste materials from meat, poultry and fish processing industries: a review. *Journal of food science and technology*, 49 (3): 278-293.

Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., and Ahn, C. B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food research international*, 42 (9): D1266-1272.

Jridi, M., Lassoued, I., Nasri, R., Ayadi, M. A., Nasri, M., and Souissi, N. 2014. Characterization and potential use of cuttlefish skin gelatin hydrolysates prepared by different microbial proteases. *BioMed research international*, 2014 (2014): 1-14

Khaled, H. B., Ktari, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Jridi, M., Lassoued, I., and Nasri, M. 2014. Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. *Journal of food science and technology*, 51 (4): 622-633.

Khantaphant, S., and Benjakul, S. 2008. 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*, 151 (4): 410-419.

Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., Nagai, T., and Tanaka, M. 2005. Characterisation of acid-soluble collagen from skin and bone of bigeye snapper (*Priacanthus tayenus*). *Food chemistry*, 89 (3): 363-372.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, KD 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., Ben Salah, R., and Nasri, M. 2012. Functionalities and

- (*Priacanthus tayenus*) skin for gelatin hydrolysate production. *International Food Research Journal*, 18 (3): 1129-1134.
- Tabarestani, H. S., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., and Mahoonak, A. S. 2010.** Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). *Bioresource technology*, 101 (15): 6207-6214.
- Thiansilakul, Y., Benjakul, S., and Shahidi, F. 2007.** Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103 (4): 1385-1394.
- Torres, J. A., Chen, Y. C., Rodrigo-Garcia, J., Jaczynski, J., and Shahidi, F. 2007.** Recovery of by-products from seafood processing streams, pp. 65-90, Shahidi, F, Maximising the value of marine by-products, Woodhead Publishing Ltd, Cambridge, UK.
- Yang, J. I., Ho, H. Y., Chu, Y. J., and Chow, C. J. 2008.** Characteristic and antioxidant activity of retorted gelatin hydrolysates from cobia (*Rachycentron canadum*) skin. *Food Chemistry*, 110 (1): 128-136.
- Yang, J. I., Liang, W. S., Chow, C. J., and Siebert, K. J. 2009.** Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochemistry*, 44 (10): 1152-1157.
- You, L., Regenstein, J. M., and Liu, R. H. 2010.** Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. *Journal of food science*, 75 (6): 582-587.
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E., and Molla, A. E. 2009.** Use of hydrolysates from yellowfin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. *International Aquatic Research*, 1 (1): 73-77.
- Pomponi, S. A. 1999.** The bioprocess-technological potential of the sea. *Journal of Biotechnology*, 70 (1): 5-13.
- Pires, C., Clemente, T., and Batista, I. 2013.** Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93 (4): 771-780.
- Sai-Ut, S., Benjakul, S., Sumpavapol, P., and Kishimura, H. 2014.** Antioxidant activity of gelatin hydrolysate produced from fish skin gelatin using extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* H11. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39 (4): 394 -403.
- Sarmadi, B. H., and Ismail, A. 2010.** Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides*, 31 (10): 1949-1956.
- Sharma, S., Singh, R., and Rana, S. 2011.** Bioactive peptides: a review. *International Journal Bioautomation*, 15 (4): 223-250.
- Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B., and Lugasi, A. 2008.** Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance-A review. *Appetite*, 51 (3): 456-467.
- Songchotikunpan, P., Tattiyakul, J., & Supaphol, P. (2008).** Extraction and electrospinning of gelatin from fish skin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 42 (3): 247-255.
- Sukkwai, S., Kijroongrojana, K., and Benjakul, S. 2011.** Extraction of gelatin from big eye snapper



Enzymatic hydrolysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin and evaluation of its antioxidant properties

Leila Ramezanzadeh¹, Seyed Fakhreddin Hosseini^{2*}, Maryam Nikkhah³

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: 28.11.2015 Accepted: 15.02.2016

*Corresponding Author: hosseinisf@modares.ac.ir

Abstract:

In this study, gelatin was first extracted by alkaline and acidic treatment including 0.19 N NaOH and 0.12 N acetic acid solution by ratio of skin of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to solution of 1 to 7 and then heat treatment in 50 °C. Then, hydrolysed by alcalase enzyme for 4 hours with the ratio of enzyme to the substrate 1 to 100 and the degree of hydrolysis were measured after 4 hours. DPPH and ABTS free radical scavenging activity, as well as reducing power assay of gelatin hydrolysate were measured. The results showed that the degree of hydrolysis after 4 hours was 46/7%. Also the highest DPPH and ABTS free radical scavenging and reducing power at concentration of 10 mg/ml were 39/8%, 50/7%, and 0/123, respectively. The skin from fish filleting can be a suitable raw material for extraction of peptides with biological activities. The results showed that peptides derived from rainbow trout fish skin gelatin can be considered as a natural antioxidant.

Keywords: Gelatin hydrolysates, Antioxidant properties, DPPH, ABTS, Reducing power assay.