

Effect of Molecular Weight of Isolated Protein Hydrolysate from *Sardinella sindensis* Obtained Using Pancratin on the Anti-Oxidative and Anti-Diabetic Properties

Fatan B.¹ MSc, Ahmadi Gavlighi H.^{*1} PhD, Sahari A.¹ PhD

¹ Food Science & Technology Department, Agricultural Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Aims: The purpose of the present study was to hydrolyze *Sardinella sindensis* protein isolate by pancreatin enzyme and then fractionation hydrolysate based on molecular weight and finally evaluating and comparing the anti-oxidative and anti-diabetic properties of the fractions with hydrolysate.

Materials & Methods: Protein isolate from *Sardinella sindensis* muscle was extracted and then hydrolyzed using pancreatin enzyme in two enzyme/substrate ratio of 2.5 and 5% (W/W) for 2h. The hydrolysates were fractionated into three fractions included FPH-I (<2kDa), FPH-II (2-10kDa) and FPH-III (>10kDa) using an ultrafiltration (UF) membranes. The antioxidant and anti-diabetic activities of the fractions and hydrolysate were investigated.

Findings: The degree of hydrolysis increased with increasing hydrolysis time and it was significant between 30 and 60 minutes ($p < 0.05$). FPH-III showed the highest DPPH radical scavenging activity. In terms of chelating activity on Fe^{2+} , there was no significant difference between the fractions and hydrolysate ($p > 0.05$). Also, FPH-III showed a better ABTS radical-scavenging activity. FPH-III had the highest inhibitory potential against α -amylase at 2.5%. In addition, the inhibitory effect of samples at 20mg/ml against α -glucosidase was less than 50%.

Conclusion: FPH-III from *Sardinella sindensis* protein isolate by pancreatin enzyme had the highest DPPH radical scavenging, ABTS⁺ activity and α -amylase inhibitory.

Keywords

Hydrolysates [Not in MeSH];
Sardine [Not in MeSH];
Chelating Activity [Not in MeSH];
Alpha Amylase Inhibition [Not in MeSH]

*Corresponding Author

Tel: +98 (21) 48292313

Fax: +98 (21) 48292313

Post Address: Food Science & Technology Department, Agricultural Faculty, Jalale Ale Ahmad Highway, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116

ahmadi_ha@modares.ac.ir |

Received: June 8, 2018

Accepted: October 30, 2018

ePublished: June 20, 2019

تاثیر وزن مولکولی آبکافته ایزوله پروتئین عضله ماهی *Sardinella sindensis* حاصل از آنزیم پانکراتین روی خواص ضد اکسایشی و ضد دیابتی

بهاره فتن MSc

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

حسن احمدی گاولیقی* PhD

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

محمدعلی سحری PhD

گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده

اهداف: هدف از پژوهش حاضر، آبکافت ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند توسط آنزیم پانکراتین و سپس جزء به جزء سازی آبکافته براساس وزن مولکولی و در نهایت ارزیابی و مقایسه خواص ضد اکسایشی و ضد دیابتی بخش های تفکیک شده با آبکافته بود.

مواد و روش ها: ایزوله توسط آنزیم پانکراتین در دو نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵٪ (وزنی/وزنی) در مدت ۲ ساعت آبکافت شد. آبکافت حاصل توسط غشای فرایالایش به سه بخش FPH-I (کوچکتر از ۲ کیلودالتون)، FPH-II (بین ۱۰-۲ کیلودالتون) و FPH-III (بزرگتر از ۱۰ کیلودالتون) جزء به جزء شد. فعالیت ضد اکسایشی و ضد دیابتی بخش های تفکیک شده و خود آبکافته مورد سنجش قرار گرفت.

یافته ها: درجه آبکافت با افزایش زمان افزایش یافت و بین زمان های ۳۰ تا ۶۰ دقیقه معنی دار بود ($p < 0.05$). بخش FPH-III بیشترین توانایی مهار رادیکال DPPH را داشت. از نظر شلاته کنندگی یون آهن II تفاوت معنی داری بین بخش های تفکیک شده و آبکافته وجود نداشت ($p > 0.05$). همچنین بخش FPH-III بیشترین توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS را داشت. FPH-III در غلظت ۲/۵٪ دارای بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز بود. همچنین فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا گلوکوزیداز نمونه ها در غلظت ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر کمتر از ۵۰٪ بود.

نتیجه گیری: FPH-III بیشترین فعالیت مهار رادیکال های DPPH، ABTS⁺ و بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز آبکافته ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند حاصل از آنزیم پانکراتین را داشت.

کلیدواژه ها: آبکافت آنزیمی، ماهی ساردین، شلاته کنندگی، بازدارندگی آنزیم آلفا آمیلاز

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۳/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۸/۸

*نویسنده مسئول: ahmadi_ha@modares.ac.ir

مقدمه

دیابت یکی از مهم ترین بیماری هایی است که امروزه شیوع آن در جهان به سرعت رو به افزایش است. دیابت نوع دو حدود ۹۰-۸۰٪ موارد تشخیص دیابت را که یک بیماری قابل پیشگیری است، شامل می شود. هیپرگلیسمی بعد از صرف غذا، نقش مهمی در گسترش دیابت نوع ۲ ایفا می کند [۱]. در حال حاضر مهارکننده های آلفا گلوکوزیداز مانند آکاربوز، مگلیتول و گلیبوز به عنوان داروهای

درمانی برای درمان افراد دیابتی با هیپرگلیسمی پس از صرف غذا در نظر گرفته می شوند. با این حال استفاده مزمن از این عوامل می تواند منجر به عوارض جانبی نظیر استفراغ، اسهال و گرفتگی شکم شود [۲]. تعدادی از مطالعات برای شناسایی منابع طبیعی مهارکننده های آلفا گلوکوزیداز و آلفا آمیلاز انجام شده است. گزارش شده است که طیف وسیعی از میوه ها، سبزیجات از جمله زغال اخته، توت فرنگی و نیز پپتیدهای عضله ماهی ساردین و اخیراً پروتئین تخم مرغ دارای فعالیت مهارکنندگی این آنزیم ها هستند [۲].

از طرفی تنش اکسیداتیو ناشی از گونه های فعال اکسیژن مانند پراکسید هیدروژن و سوپراکسید نقش مهمی در بروز بیماری هایی مانند دیابت، بیماری مزمن کبدی، سرطان و اختلالات قلبی و عروقی ایفا می کند [۲]. همچنین اکسایش لیپیدها از مهم ترین نگرانی های صنعت مواد غذایی است، چراکه منجر به ایجاد عطر و طعم نامطلوب، رنگ تیره و ترکیبات سمی در مواد غذایی می شود. به دلیل نگرانی هایی که در مورد ایمنی بلندمدت ضد اکسایشی های سنتزی مانند هیدروکسی انیسول بوتیل شده (BHA) و دی بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) وجود دارد، تقاضا به سمت ضد اکسایش های طبیعی افزایش پیدا کرده است [۳]. مطالعات علمی متعددی نشان می دهند که بسیاری از پروتئین های آبکافت شده و پپتیدهای حاصل از منابع مختلف دریایی شامل ماهی ها، نرم تنان و ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان یا محصولات جانبی آنها نیز توانایی ضد اکسایشی بالایی دارند [۴].

آبکافت پروتئین، فناوری سودمندی برای تولید فرآورده های با ارزش افزوده بالا از مواد خام کم ارزش مانند ماهی های کم مصرف و ضایعات آبزیان است. از مهم ترین عملکردهای این محصولات آبکافتی که حاوی پپتیدهای زیست فعال هستند می توان به فعالیت های ضد اکسایشی، ضد میکروبی، ضد سرطان، ضد دیابتی، مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین I اشاره کرد [۵]. وزن مولکولی پروتئین آبکافت شده یکی از مهم ترین عوامل در تولید آبکافته پروتئین با خواص عملکردی و بیولوژیکی مورد نظر است [۶]. به منظور جداسازی و شناسایی آبکافتها با بیشترین خواص زیستی روش های مختلفی به کار رفته است. در رابطه با مخلوط پیچیده ای از پروتئین ها و پپتیدها مشکل اصلی جداسازی، پپتیدهایی با اندازه و خواص فیزیکی شیمیایی متفاوت است که روند شناسایی توالی آنها را دچار مشکل می کند. در تعدادی مطالعات از غشاهای فرایالایش با وزن مولکولی مختلف، کروماتوگرافی فیلتراسیون ژلی، طیف سنج جرمی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای جداسازی و شناسایی توالی پپتیدهای زیست فعال از منابع آبی استفاده شده است [۷]. فرآیند استفاده از غشاهای فرایالایش این مزیت را دارد که می توان با استفاده از آن توزیع وزن مولکولی آبکافت های مورد نظر را با انتخاب اندازه غشای مناسب کنترل و موجب افزایش خواص عملکردی آن شد. در مطالعه ای فرآیند جزء به جزء سازی غشایی منجر به افزایش خواص بیولوژیکی و عملکردی آبکافت پروتئین های شیر شد و سپس در مطالعات بعدی به تدریج به سمت استفاده از سایر

B: مقدار سود مصرفی بر حسب میلی‌لیتر، N_b : نرمالیتۀ سود، α : نشان‌دهنده متوسط درجه تفکیک گروه‌های $\alpha-NH_2$ که α برای آنزیم الکالاز با اتخاذ درجه حرارت $50^\circ C$ برای هیدرولیز برابر 0.87 محاسبه شد. M_p : وزن پروتئین هیدرولیزشده (گرم)، h_{tot} : تعداد کل پیوندهای پپتیدی در سوبسترای پروتئینی بر حسب میلی‌اکی‌والان بر گرم پروتئین ($meqv\ g^{-1}\ protein$) که h_{tot} برای کنسانتره پروتئین ماهی $8/6$ میلی‌اکی‌والان به ازای گرم پروتئین است.

جزء به جزء سازی آبکافتۀ ایزوله پروتئین (FPH) تیمارشده با آنزیم پانکراتین توسط غشای فرایالایش با اندازه غشای ۲ و 10 کیلودالتون با پمپ Master flex-L/S (Coleman-Palmer؛ ایالات متحده) به سه بخش زیر تقسیم شدند: بخش تفکیک شده آبکافتۀ با وزن مولکولی کمتر از 2 کیلودالتون (FPH-I)، بخش تفکیک شده آبکافتۀ با وزن مولکولی بین 10 کیلودالتون (FPH-II) و بخش تفکیک شده آبکافتۀ با وزن مولکولی بیشتر از 10 کیلودالتون (FPH-III). سپس تمامی زیربخش‌ها توسط خشک‌کن انجمادی Christ مدل Alpha 1-2 LD plus (Christ؛ آلمان) خشک و برای ادامه کار در دمای $20^\circ C$ نگهداری شدند.

ارزیابی خواص ضد اکسایشی و ضد دیابتی آبکافتۀ

فعالیت به دام اندازی رادیکال DPPH

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، طبق روش نانجو و همکاران [15] با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد. روش کار به این صورت بود که ابتدا از نمونه‌های پودر شده آبکافتۀ و زیربخش‌های آن، محلولی با غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. 500 میکرولیتر از محلول نمونه‌ها با 500 میکرولیتر از محلول اتانولی رادیکال DPPH (0.1 میلی‌مولار) مخلوط و به مدت 30 دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب نمونه‌ها توسط طیف‌سنج نوری Carry 60 UV-Vis (Agilent؛ ایالات متحده) در 517 نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از معادله منحنی کالیبراسیون ترولکس زیر محاسبه شد:

$$Y = -0.0128X + 0.6991$$

جذب نمونه در طول موج 517 نانومتر $Y =$

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن II (Fe^{2+})

فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن II با استفاده از روش دکر و ولج [16] با کمی تغییرات ارزیابی شد. ابتدا محلولی با غلظت 5 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه‌های پودر شده آبکافتۀ و زیربخش‌های آن، 2 میلی‌مولار از کلرید آهن II و 5 میلی‌مولار از فروزین تهیه شد. سپس 500 میکرولیتر از نمونه به 1850 میکرولیتر آب اضافه و به آن 50 میکرولیتر از محلول کلرید آهن II افزوده شد. پس از گذشت 3 دقیقه در تاریکی، 100 میکرولیتر محلول فروزین به آن افزوده و به مدت 20 دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. در نهایت جذب نمونه‌ها در طول موج 562 نانومتر خوانده شد. EDTA به عنوان کنترل مثبت استفاده و فعالیت شلاته‌کنندگی از طریق معادله منحنی کالیبراسیون EDTA زیر محاسبه شد:

سوبستراهایی مانند پروتئین‌های سویا، هموگلوبین، گلیادین گندم و آبنیان جهت یافت [8, 9].

ماهی ساردین یک گونه کوچک ماهی دریایی است که در آب‌های ساحلی جنوبی ایران یافت می‌شود. این گونه به عنوان گونه غالب ساردین ماهیان در آب‌های شمالی خلیج فارس است [10]. صید این ماهیان در استان هرمزگان پیشینه‌ای طولانی دارد. آمار صید نسبی در این استان نشان می‌دهد که سهم صید سطح زیان‌ریز از صید کل از میزان 10% در سال 1380 به 27% در سال 1390 افزایش یافته است [11]. ساردین عمدتاً برای تولید غذای ماهی استفاده می‌شود. اما به دلیل داشتن منبع غنی از پروتئین می‌تواند در تولید پپتیدهای زیست‌فعال و تبدیل آن به ماده‌ای با ارزش افزوده بالا در فرمولاسیون محصولات غذایی به عنوان ضد اکساینده و فراسودمند استفاده شود.

بنابراین با توجه به مطالب ارایه شده، هدف از پژوهش حاضر تولید آبکافتۀ از ایزوله پروتئین عضله ماهی ساردین سند توسط آنزیم پانکراتین و سپس جزء به جزء سازی پروتئین آبکافتۀ به بخش‌های مختلف و در نهایت ارزیابی و مقایسه خواص ضد اکسایشی و ضد دیابتی بخش‌های تفکیک شده با پروتئین آبکافتۀ شده بود.

مواد و روش‌ها

ماهی ساردین سند با نام علمی *Sardinella sindensis* از دریای عمان صید و به صورت منجمد به آزمایشگاه گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده کشاورزی تربیت مدرس منتقل شد. نمونه‌ها تا زمان استخراج ایزوله پروتئین در دمای $80^\circ C$ در کیسه‌های زیپ‌دار نگهداری شدند. قبل از استفاده، ماهی‌های منجمد در دمای $4^\circ C$ انجمادزایی و بعد از تخلیه شکمی و جدا کردن سر، با استفاده از چرخ گوشت کاملاً چرخ شدند و سپس از مواد خام چرخ‌شده، ایزوله پروتئین استخراج شد. به منظور آبکافت آنزیمی، آنزیم پانکراتین پانکراس خوک و همچنین برای بررسی خواص ضد دیابتی، آنزیم‌های آلفا آمیلاز پانکراس خوک (5 واحد بر میلی‌گرم) و آلفا گلوکوزیداز ساکاروماپسیس سروریه (10 واحد بر میلی‌گرم) تهیه شدند (سیگما؛ ایالات متحده).

تهیه پروتئین ایزوله شده ماهی: تهیه ایزوله پروتئین به روش حلالیت و ترسیب ایزوالکتریک (ISP) با روش هولتین و همکاران انجام شد [14].

آبکافت آنزیمی ایزوله و تعیین درجه هیدرولیز

آبکافت ایزوله مطابق با روش کلمپانگ و همکاران انجام شد [13]. تعیین درجه آبکافت به وسیله روش pH-stat، توضیح داده شده توسط آلدر و نیسن [14] با استفاده از اطلاعات به دست آمده با pH متر با مدل ۷۱۸ انجام شد. برای ثابت نگه داشتن pH در محدوده ۸، سود دو نرمال استفاده و درصد درجه آبکافت (DH%) با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$DH\% = \frac{B \times N_b}{M_p} \times \frac{1}{\alpha} \times \frac{1}{h_{tot}} \times 100$$

جذب نمونه شامل نمونه، نشاسته و آنزیم؛ جذب پیش‌زمینه شامل نمونه، نشاسته و بافر و جذب کنترل شامل بافر، نشاسته و آنزیم است.

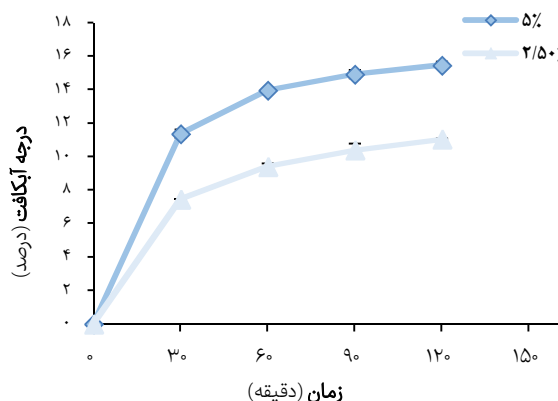
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با روش تجزیه واریانس یک‌طرفه (آنووا) با استفاده از نرم‌افزار JMP 10 در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. به‌منظور بررسی اختلاف میانگین در صورت معنی‌دار بودن اثر فاکتورها ($p < 0.05$) از آزمون توکی استفاده شد. رسم شکل‌ها با استفاده از نرم‌افزار Excel 2013 انجام شد. تمامی نتایج به صورت میانگین آماری در سه تکرار بیان شد.

یافته‌ها

درجه آبکافت

درجه آبکافت با افزایش مدت زمان افزایش یافت، اما بعد از ۶۰ دقیقه اول با افزایش مدت زمان از شدت و سرعت آبکافت کاسته شد. تغییرات درجه آبکافت بین زمان ۳۰ تا ۶۰ دقیقه معنی‌دار ($p < 0.05$) بود، اما بین زمان‌های ۱۲۰-۶۰ دقیقه معنی‌دار نبود. همچنین نتایج نشان داد که تغییر غلظت آنزیم پانکراتین (نسبت آنزیم/سوبسترا) از ۲/۵ تا ۵٪ به‌طور معنی‌داری باعث افزایش درجه آبکافت شد (نمودار ۱).



نمودار ۱) روند تغییرات درجات آبکافت آنزیم پانکراتین در دو نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵٪ در زمان‌های مختلف

خواص ضداکسایشی

برای ارزیابی خواص ضداکسایشی نمونه‌ها، ابتدا پیش‌آزمایشی از غلظت‌های مختلف نمونه‌ها در مهار رادیکال DPPH، رادیکال ABTS⁺ و شلاته‌کنندگی یون آهن انجام شد. نتایج نشان داد که آزمون‌های ضداکسایشی نمونه‌ها وابسته به غلظت هستند و با افزایش غلظت نمونه‌ها خواص ضداکسایشی آنها نیز افزایش یافت. در ادامه برای مقایسه خواص ضداکسایشی نمونه‌ها با یکدیگر، یک غلظت (۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌عنوان غلظت پایه انتخاب شد. در جدول ۱ نتایج آزمون‌های ضداکسایشی نمونه‌ها آورده شده است. نتایج نشان داد که بخش FPH-III در هر دو سطح ۲/۵ و ۵٪،

$$Y = -0.0128X + 0.216$$

جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر

فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS

به‌منظور ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS از روش تتسریمو/تگ و همکاران^[17] استفاده شد. ابتدا ۲۰ میکرولیتر از نمونه به ۹۸۰ میکرولیتر محلول ABTS اضافه و پس از گذشت ۱۰ دقیقه در تاریکی، جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS با استفاده از معادله منحنی کالیراسیون ترولکس زیر محاسبه شد:

$$Y = -0.0019X + 0.7094$$

جذب نمونه در طول موج ۷۳۴ نانومتر

سنجش فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز

بررسی فعالیت بازدارندگی نمونه‌ها نسبت به آنزیم آلفاگلوکوزیداز براساس روش کیم و همکاران انجام شد^[18]. میزان ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۵۰ میکرولیتر از آنزیم آلفاگلوکوزیداز مخمر ساکارومایسس سروریه (۲/۰ واحد در هر میلی‌لیتر) به محلول اضافه و به مدت ۵ دقیقه در دمای ۲۵°C گرمخانه‌گذاری شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول ۴- نیتروفنیل آلفادی‌گلوکوپیرانوزید (PNPG) به مخلوط واکنش اضافه و جذب نمونه واکنش در ۴۱۰ نانومتر قرائت شد. میزان بازدارندگی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی آلفاگلوکوزیداز} = \frac{\text{شیب خط نمونه} - \text{شیب خط کنترل}}{\text{شیب خط کنترل}} \times 100$$

سنجش فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز

بررسی فعالیت بازدارندگی نمونه‌ها نسبت به آنزیم آلفاآمیلاز براساس روش مک‌دوگال و همکاران انجام شد^[19]. به این منظور ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه حل‌شده در بافر فسفات (۲/۰ مول بر لیتر حاوی ۰/۰۶۹ مول بر لیتر سدیم کلرید و با pH=۶/۸) به ۱۰۰ میکرولیتر آنزیم آلفاآمیلاز پانکراس خوک (فعالیت ۵/۰ واحد بر میلی‌لیتر) اضافه شد. مخلوط واکنش در دمای ۳۷°C به مدت ۵ دقیقه گرمخانه‌گذاری شد. سپس در حدود ۱۰۰ میکرولیتر محلول نشاسته (۵/۰ گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات) اضافه و دوباره محلول در دمای ۳۷°C به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب نگهداری شد. سپس با استفاده از حمام آب گرم در ۱۰۰°C به مدت ۱۰ دقیقه آنزیم غیرفعال و بعد به مدت ۲ دقیقه در ۱۳۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد تا نشاسته نامحلول رسوب کند. پس از آن ۲۰ میکرولیتر از محلول رویی نمونه‌ها با ۱ میلی‌لیتر از محلول رنگی به مدت ۱۰ دقیقه در ۷۰°C نگهداری شد و سپس جذب آن در طیف‌سنج نوری در طول موج ۴۱۰ نانومتر خوانده شد. میزان بازدارندگی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد بازدارندگی آلفاآمیلاز} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب پیش‌زمینه} - \text{جذب کنترل}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

یون آهن وجود نداشت ($p > 0.05$) و تغییر غلظت آنزیم باعث افزایش معنی‌داری در شلاته‌کنندگی یون آهن نمونه‌ها داشت ($p < 0.05$). همچنین FPH-I در هر دو سطح دارای بیشترین توانایی مهار رادیکال کاتیون ABTS بود.

بیشترین توانایی را دارد. FPH-I کمترین توانایی را در مهار رادیکال DPPH داشت و تغییر غلظت آنزیم پانکراتین تفاوت معنی‌داری در مهار این رادیکال نداشت ($p > 0.05$). همچنین طبق نتایج تفاوت معنی‌داری بین بخش‌های تفکیک‌شده با آبکافه در شلاته‌کنندگی

جدول ۱) نتایج فعالیت ضدکسایشی نمونه‌های آبکافه ایزوله پروتئین در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر

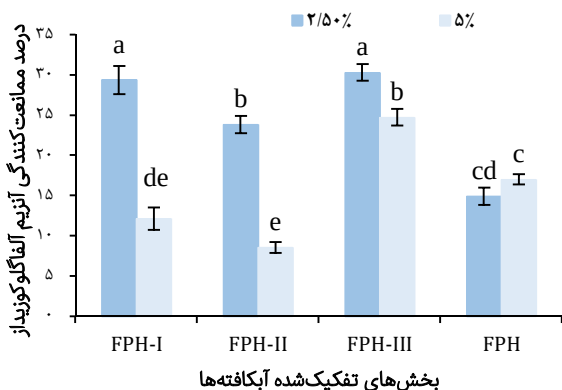
نسبت آنزیم/سوبسترا	بخش تفکیک‌شده آبکافه	فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (میکروگرم ترولکس/گرم ماده خشک)	فعالیت کی‌لیت‌کنندگی فلز (میکروگرم EDTA/گرم ماده خشک)	فعالیت مهارکنندگی رادیکال کاتیون ABTS (میکروگرم ترولکس/گرم ماده خشک)
۲/۵%	FPH-I	۵/۰۲±۰/۲ ^d	۱۰/۴۲±۰/۰۳ ^b	۲۴۲±۰/۷۳ ^a
	FPH-II	۵/۵۹±۰/۰۱ ^{bcd}	۸/۲۱±۰/۰۶ ^d	۲۰۸/۹۶±۱/۶۴ ^d
	FPH-III	۶/۳۹±۰/۱۴ ^{ab}	۸/۷۴±۰/۰۶ ^d	۱۹۳/۹۲±۲/۷۱ ^e
	FPH	۶/۱۶±۰/۲۰ ^{abc}	۹/۹۵±۰/۱۷ ^{bc}	۲۳۲/۲۴±۱/۰۷ ^b
۵%	FPH-I	۵/۲۳±۰/۲۰ ^{cd}	۱۳/۳۷±۰/۲۲ ^a	۲۴۳/۷۲±۲/۶۵ ^a
	FPH-II	۵/۴۲±۰/۰۶ ^{bcd}	۹/۵۰±۰/۱۳ ^c	۲۲۰/۹۲±۱/۹۲ ^c
	FPH-III	۷/۱۳±۰/۵۲ ^a	۱۳/۴۳±۰/۳۰ ^a	۱۷۶/۱۲±۰/۰۵ ^f
	FPH	۶/۶۱±۰/۲۶ ^a	۱۳/۸۵±۰/۱۷ ^a	۲۲۶/۱۴±۱/۷۸ ^{bc}

*حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده اختلاف آماری معنی‌دار بین میانگین‌ها است ($p < 0.05$).

خواص ضدیبابتی

برای بررسی خواص بازدارندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز ابتدا پیش‌آزمایشی از غلظت‌های مختلف نمونه‌ها انجام شد. نمونه‌ها در غلظت‌های کمتر از ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عملکرد ضعیفی در بازدارندگی این آنزیم‌ها داشتند و در غلظت‌های بالا نیز کدورت مانع از انجام آزمایش شد. بنابراین در ادامه به‌منظور مقایسه خواص ضدیبابتی نمونه‌ها با یکدیگر از غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد. نتایج آزمون‌های بازدارندگی آنزیم‌های آلفاآمیلاز و آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها نشان داد که غلظت کمتر آنزیم پانکراتین یعنی ۲/۵% نسبت به ۵% فعالیت بازدارندگی بالاتری دارد. در نمودار ۲ درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاآمیلاز نمونه‌ها در دو غلظت آورده شده است. همچنین FPH-III در سطح ۲/۵% با ۶۶% ممانعت‌کنندگی، بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز را داشت. FPH-I در سطح ۵% نیز با ۲۹% ممانعت‌کنندگی، دارای کمترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاآمیلاز بود.

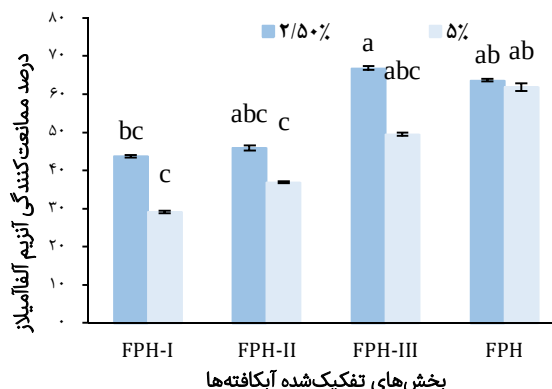
نتایج بازدارندگی نمونه‌ها در هر دو غلظت بر فعالیت آنزیم آلفاگلوکوزیداز عملکرد ضعیف و فعالیت آنها کمتر از ۵۰% بود. در بین تمام نمونه‌ها، FPH-III در سطح ۲/۵% با ۳۰% ممانعت‌کنندگی، بیشترین قابلیت بازدارندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز را دارا بود (نمودار ۳).



نمودار ۳) درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاگلوکوزیداز نمونه‌ها در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵%؛ حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح ۹۵% است.

بحث

طبق نتایج، کاهش شدت آبکافت بعد از ۶۰ دقیقه اول با افزایش زمان آبکافت، کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و همچنین کاهش میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم را به دنبال داشت. از طرفی شکل‌گیری ترکیباتی که ممانعت‌کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد [20]. تغییر در اندازه، ساختار، توالی اسیدآمینوها و پپتیدها در اثر گذشت زمان آبکافت، فعالیت ضدکسایشی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [21].



نمودار ۲) درصد ممانعت‌کنندگی آنزیم آلفاآمیلاز نمونه‌ها در غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و نسبت آنزیم/سوبسترای ۲/۵ و ۵%؛ حروف مختلف بیانگر معنی‌داری در سطح ۹۵% است.

ساز و کار عمل پپتیدها به عنوان ضد اکساینده به طور واضح مشخص نیست، اما اسید آمینه‌هایی مانند هیستیدین، سیستئین، والین، پرولین، فنیل آلانین، تیروزین و تربیتوفان نقش مهمی در فعالیت ضد اکسایشی پپتیدها و پروتئین آبکافت‌شده ماهی دارند [22]. وجود اسید آمینه‌های آب‌گریز در پپتیدها و پروتئین آبکافت‌شده، انحلال آنها در چربی را افزایش داده و دسترسی آنها را به رادیکال‌های آب‌گریز افزایش می‌دهد و بنابراین باعث افزایش فعالیت ضد اکسایشی می‌شود [23]. انتخاب آنزیم پروتئولیتیک مناسب عامل بسیار مهمی برای رهاسازی پپتیدهای ضد اکسایشی از پروتئین ماهی است. آنزیم‌هایی مانند آلکالاز، آلفا کیموتریپسین، پروتامکس و تریپسین به طور موفقیت‌آمیزی برای تولید پپتیدهای ضد اکسایشی از منابع پروتئینی ماهی بررسی شده‌اند [21, 22, 24]. در کنار انتخاب آنزیم مناسب، شرایط فیزیکی و شیمیایی مانند دما و pH بهینه برای عملکرد مناسب آنزیم و همچنین مدت زمان آبکافت از عوامل موثر در تولید پروتئین آبکافت‌شده با فعالیت ضد اکسایشی بالا هستند [25].

طبق نتایج حاضر، در آزمون بازدارندگی رادیکال DPPH و شلاته‌کنندگی یون آهن II، بیشترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به بخش FPH-III بود که با آبکافت (FPH) تفاوت معنی‌داری نداشت ($p > 0.05$). در حالی که در آزمون بازدارندگی ABTS بیشترین فعالیت ضد اکسایشی مربوط به بخش FPH-I بود که با آبکافت تفاوت معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). جون و همکاران در مطالعه‌ای که بهبود خواص عملکردی آبکافت پروتئین فریم ماهی کاد را با استفاده از غشاهای فرایالایش مورد بررسی قرار دادند، گزارش کردند که از لحاظ خواص عملکردی آبکافت‌های تفکیک‌شده بهتر از آبکافت بود و بخش تفکیک‌شده آبکافت با وزن مولکولی بیشتر از ۱۰ کیلودالتون فعالیت ضد اکسایشی بالاتری را از خود نشان داد [6]. همچنین در پژوهش حاضر با افزایش غلظت آنزیم پانکراتین از ۲/۵ تا ۵٪ درجه آبکافت و به دنبال آن خصوصیات ضد اکسایشی آبکافت نیز افزایش یافتند. این نتایج مشابه نتایج پژوهش *نالیان‌تون* و همکاران است که آنها به افزایش خاصیت ضد اکسایشی پروتئین آبکافت‌شده با افزایش درجه آبکافت اشاره کرده‌اند [26]. در مقابل *کومپوتگ* و همکاران اختلاف معنی‌داری در فعالیت ضد اکسایشی پروتئین آبکافت‌شده با درجه‌های آبکافت ۵ تا ۲۵٪ مشاهده نکردند [13]. اختلاف در گزارش‌ها می‌تواند به دلیل تفاوت در ماده اولیه، نوع آنزیم پروتئاز و شرایط آبکافت باشد که موجب تولید پپتیدهایی با ساختار و عملکرد متفاوت می‌شود.

گان و همکاران گزارش کردند که آبکافت‌های پروتئین ماهی حلوی زرد باله تیمار شده با پیپسین، در پایین‌ترین درجه آبکافت (۲۲٪) نسبت به آنزیم‌های دیگر فعالیت مهارکنندگی DPPH بالاتری داشت. وزن مولکولی ضد اکساینده‌ها از بین بخش‌های تفکیک‌شده ۱۰-۳۰، ۳-۵، ۱-۳ و کمتر از ۱ کیلودالتون، ۱۳ کیلودالتون تعیین شد [27]. ژانگ و همکاران نیز نشان دادند که آبکافت پروتئین کپور نقره‌ای تیمار شده با آنزیم پیپسین بالاترین خاصیت مهار رادیکال

DPPH (۶۸/۴٪) در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) نسبت به آنزیم‌های دیگر دارد. در ادامه آبکافت حاصل از آنزیم پیپسین توسط غشای فرایالایش به بخش‌های بزرگتر از ۱۰ کیلودالتون، بین ۵-۱۰، ۳-۱ و کمتر از ۱ کیلودالتون تفکیک شد. همچنین در میان بخش‌های مختلف، بخش تفکیک‌شده کمتر از ۱ کیلودالتون خاصیت ضد اکسایشی بالاتری (۷۷/۸٪) را نشان داد و آبکافت حاصل از آنزیم پیپسین، ۵۲٪ خاصیت مهار رادیکال DPPH داشت [28]. دنگ و همکاران گزارش کردند که بین فعالیت شلاته‌کنندگی آبکافت‌های حاصل از آنزیم فلاوریزیم و آلکالاز با درجه آبکافت رابطه‌ای خطی وجود دارد. به این معنی که افزایش درجه آبکافت منجر به افزایش فعالیت شلاته‌کنندگی آبکافت‌ها می‌شود [23]. همچنین در پژوهش گیم‌نر و همکاران گروه‌های کربوکسیل و آمینو در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه اسیدی و اسیدهای آمینه بازی در مهار یون آهن II نقش اصلی را ایفا می‌کنند [29].

متسویی و همکاران گزارش کردند که آبکافت عضله ماهی ساردین تیمار شده با پروتئاز قلیایی در ۱۷ ساعت آبکافت بالاترین فعالیت بازدارندگی علیه آلفا گلوکوزیداز با IC_{50} برابر ۴۸/۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. به گفته آنها آبکافت‌های عضله ساردین که از پروتئازهای مختلف به دست آمدند، فعالیت‌های مهارکنندگی مختلفی روی آنزیم آلفا گلوکوزیداز نشان دادند. این تفاوت در فعالیت مهارکنندگی آبکافت‌ها توسط پروتئازهای مختلف به دلیل تفاوت در اندازه محصول هیدرولیتیک با سوبسترای خاص است. دو پپتید Val-Trp با IC_{50} برابر ۲۲/۶ میلی‌مولار و Tyr-Tyr- Pro-Leu با IC_{50} برابر ۳/۷ میلی‌مولار از آبکافت عضله ساردین شناسایی شدند که خاصیت بازدارندگی روی آنزیم آلفا گلوکوزیداز داشتند [30].

بررسی‌های مختلف نشان داده‌اند که بین وزن مولکولی پپتیدها با فعالیت زیستی آنها ارتباط وجود دارد [31]. استفاده از غشاهای فرایالایش به منظور تفکیک آبکافت‌ها، می‌تواند پپتیدهایی که دارای فعالیت زیستی خاصی هستند را در یک محدوده معین وزن مولکولی تغلیظ کند و فعالیت زیستی آبکافت‌های جزء به جزء را بهبود بخشد [28]. در پژوهش حاضر نیز با جزء به جزء سازی آبکافت، به دلیل تغلیظ پپتیدهای دارای فعالیت بیشتر در یک بخش، فعالیت ضد اکسایشی و ضد دیابتی بخش‌های تفکیک‌شده آبکافت نسبت به خود آبکافت اولیه افزایش یافت. مطالعات متعددی نشان داده‌اند که پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین (در محدوده بین ۱-۱۰ کیلودالتون) خاصیت ضد اکسایشی بیشتری نسبت به انواع آنها با وزن مولکولی بالا دارند. این اثر با واکنش بهتر رادیکال‌های آزاد فعال با پپتیدهای کوچک مرتبط است [32].

نتیجه‌گیری

استفاده از غشاهای فرایالایش باعث افزایش فعالیت ضد اکسایشی و بازدارندگی آنزیم‌های آلفا آمیلاز نسبت به آبکافت شد و FPH-III بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH، ABTS* و بازدارندگی

Organisation; 1993.

12- Hultin HO, Kristinsson HG, Lanier TC, Park JW. Process for recovery of functional proteins by pH shifts. In: Park JW. Surimi and surimi seafood. 2nd Edition. Didcot: Taylor & Francis; 2005. pp. 107-39.

13- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Hayes KD, Shahidi F. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *Int J Food Sci Technol*. 2008;43(6):1019-26.

14- Adler-Nissen J. Enzymic hydrolysis of food proteins. Essex: Elsevier Applied Science Publishers; 1986.

15- Nanjo F, Goto K, Seto R, Suzuki M, Sakai M, Hara Y. Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radic Biol Med*. 1996;21(6):895-902.

16- Decker EA, Welch B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *J Agric Food Chem*. 1990;38(3):674-7.

17- Thetsrimuang Ch, Khammuang S, Chiablaem K, Srisomsap Ch, Sarnthima R. Antioxidant properties and cytotoxicity of crude polysaccharides from *Lentinus polychrous* Lév. *Food Chem*. 2011;128(3):634-9.

18- Kim KT, Rioux LE, Turgeon SL. Alpha-amylase and alpha-glucosidase inhibition is differentially modulated by fucoidan obtained from *Fucus vesiculosus* and *Ascophyllum nodosum*. *Phytochemistry*. 2014;98:27-33.

19- McDougall GJ, Shpiro F, Dobson P, Smith P, Blake A, Stewart D. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit α -amylase and α -glucosidase. *J Agric Food Chem*. 2005;53(7):2760-6.

20- Diniz FM, Martin AM. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein. Composition of the hydrolysates. *Int J Food Sci Nutr*. 1997;48(3):191-200.

21- Wu HC, Chen HM, Shiau CY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriacus*). *Food Res Int*. 2003;36(9-10):949-57.

22- Hsu KC, Lu GH, Jao CL. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Res Int*. 2009;42(5-6):647-52.

23- Dong Sh, Zeng M, Wang D, Liu Z, Zhao Y, Yang H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem*. 2008;107(4):1485-93.

24- Batista I, Ramos C, Coutinho J, Bandarra NM, Nunes ML. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem*. 2010;45(1):18-24.

25- Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a Review. *Food Chem*. 2012;135(4):3020-38.

26- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem*. 2011;124(4):1354-62.

27- Gan KH, Heijerman HG, Geus WP, Bakker W, Lamers CB. Comparison of a high lipase pancreatic enzyme extract with a regular pancreatin preparation in adult cystic fibrosis patients. *Aliment Pharmacol Ther*. 1994;8(6):603-7.

آنزیم آلفاآمیلاز آبکافتۀ ایزوله پروتئین ماهی ساردین سند حاصل از آنزیم پانکراتین را داشت.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از همکاری مسئولان و کارکنان آزمایشگاه مرکزی و گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تربیت مدرس تشکر و سپاسگزاری می‌شود.

تأییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافع بین نویسندگان این پژوهش وجود ندارد.

سهم نویسندگان: بهاره فتان (نویسنده اول)، پژوهشگر اصلی/نگارنده مقدمه/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪): حسن احمدی گاولیقی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۴۰٪): محمدعلی سحری (نویسنده سوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی (۲۰٪).

منابع مالی: پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس در قالب پایان‌نامه کارشناسی ارشد انجام شده است.

منابع

- 1- Cui-Feng ZH, Guan-Zhi LI, Hong-Bin PE, Zhang F, Yun CH, Yong LI. Effect of marine collagen peptides on markers of metabolic nuclear receptors in type 2 diabetic patients with/without hypertension. *Biomed Environ Sci*. 2010;23(2):113-20.
- 2- Patil P, Mandal S, Tomar SK, Anand S. Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. *Eur J Nutr*. 2015;54(6):863-80.
- 3- Yu L, Haley S, Perret J, Harris M, Wilson J, Qian M. Free radical scavenging properties of wheat extracts. *J Agric Food Chem*. 2002;50(6):1619-24.
- 4- Kim SK, editor. Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013.
- 5- Meisel H, FitzGerald RJ. Biofunctional peptides from milk proteins: Mineral binding and cytomodulatory effects. *Curr Pharm Des*. 2003;9(16):1289-96.
- 6- Jeon YJ, Byun HG, Kim SK. Improvement of functional properties of cod frame protein hydrolysates using ultrafiltration membranes. *Process Biochem*. 1999;35(5):471-8.
- 7- Harnedy PA, FitzGerald RJ. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *J Funct Foods*. 2012;4(1):6-24.
- 8- Chabeaud A, Vandanjon L, Bourseau P, Jaouen P, Chaplain-Derouiniot M, Guérard F. Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Sep Purif Technol*. 2009;66(3):463-71.
- 9- Saidi S, Deratani A, Belleville MP, Amar RB. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. *Food Res Int*. 2014;65(Part C):453-61.
- 10- Abdollahi M, Rezaei M, Jafarpour SA. Gel forming and physico-chemical properties of protein recovered from whole and gutted common kilka (*Clupeonella cultriventris*). *J Fish Sci Technol*. 2015;4(3):102-17. [Persian]
- 11- Van Zaling NP, Owfi F, Ghasemi S, Khorshidian K, Niamaimandi N. Resources of small pelagic in Iranian waters, a review. Rome: Food and Agriculture

muscle hydrolyzate. Zeitschrift für Naturforschung C. 1999;54(3-4):259-63.

31- Saidi S, Deratani A, Belleville MP, Amar RB. Production and fractionation of tuna by-product protein hydrolysate by ultrafiltration and nanofiltration: Impact on interesting peptides fractions and nutritional properties. Food Res Int. 2014;65(Part C):453-61.

32- He R, Girgih AT, Malomo SA, Ju X, Aluko RE. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed protein hydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. J Funct Foods. 2013;5(1):219-27.

28- Zhong S, Ma Ch, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chem. 2011;126(4):1636-42.

29- Giménez B, Alemán A, Montero P, Gómez-Guillén MC. Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and squid. Food Chem. 2009;114(3):976-83.

30- Matsui T, Oki T, Osajima Y. Isolation and identification of peptidic α -glucosidase inhibitors derived from sardine