فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره چهارم، زمستان ۱۳۹۶

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) و عصاره جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa*

ویدا قائمی[۱]، ابراهیم علیزاده دوغیکلایی[۲]، معظمه کردجزی[۳]*

تاریخ دریافت: دی ۹۵ تاریخ پذیرش: خرداد ۹۶

چکیده

امروزه به دلیل اثرات نامطلوب آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. ماکروجلبک‌های دریایی و پروتئین هیدرولیز شده ماهی منابع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی هستند و نقش مهمی را در حفظ کیفیت مواد غذایی در طول فرآوری و ذخیره‌سازی ایفا می‌کنند. در مطالعه حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) و عصاره جلبکی *Colpomenia sinuosa* مورد بررسی قرار گرفت و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاکنندگی یون آهن و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل عصاره جلبکی و پروتئین هیدرولیز شده محاسبه شد. نتایج نشان داد در روش‌های مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و هیدروکسیل در غلظت ۲ درصد به ترتیب ۰/۸۹±۲/۵۶ و ۱/۵۰±۷۱ درصد و میزان قدرت احیاکنندگی آهن در غلظت ۲ درصد ۰/۰۰۷±۰/۴۷ در پروتئین هیدرولیز شده و برای عصاره جلبکی در غلظت‌های ۲۰۰ (DPPH) و ۴۰۰ (مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۱/۵۰±۲/۶۸ و ۱۳/۲۵±۷۱/۸۷ درصد و میزان قدرت احیاکنندگی آهن در غلظت ۱/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۰/۰۰۳±۰/۱۲۸ بود. بر طبق نتایج این مطالعه، می‌توان پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*C. cultriventris caspia*) و عصاره ماکروجلبک *C. sinuosa* را به عنوان یک منبع بالقوه از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی به شمار آورد.

واژگان کلیدی: *جلبک قهوه‌ای، پروتئین هیدرولیز شده، خاصیت آنتی‌اکسیدانی، ماهی کیلکای معمولی.*

۱- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۲- دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه زابل، زابل، ایران.
۳- استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
* نویسنده مسئول: kordjazi.m@gmail.com

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌ها با مهار رادیکال‌های آزاد در سلول‌ها، فرآیند اکسیداسیون را به تاخیر می‌اندازند و با کاهش جهش‌های احتمالی از بیماری‌های قلبی و سرطان جلوگیری می‌کنند (Samaraweera et al., 2012). انواع اکسیژن فعال (ROS)[1] مانند پراکسید هیدروژن (H_2O_2)، رادیکال هیدروکسیل (OH)، آنیون سوپراکسید (O^{2-}) و اکسید نیتریک (NO) (Wijeratne et al., 2005) در طول متابولیسم در موجودات زنده تولید می‌شوند. در واقع این گونه‌های بسیار ناپایدار و واکنش‌پذیر تمایل به آغاز واکنش زنجیره‌ای دارند که در نتیجه منجر به تغییرات شیمیایی برگشت‌ناپذیری در پروتئین، چربی و DNA می‌شوند (Wijeratne et al., 2005). به منظور کاهش اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و خطر تخریب اکسیداتیو (Devi et al., 2008) بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی تجاری شامل بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT)،[2] بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA)،[3] ترت بوتیل هیدروکونیون (TBHQ)[4] و پروپیل گالات (PG)[5] (Wijesekara et al., 2012) به بسیاری از محصولات غذایی اضافه می‌شود اما به دلیل مسائل ایمنی و تقاضای مصرف‌کننده، به جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی توجه زیادی را به خود جلب کرده است (Devi et al., 2008). جلبک‌های دریایی یکی از بزرگترین تولیدکنندگان در محیط‌های آبی هستند که به واسطه داشتن پلی‌ساکاریدهای ارزشمندی مانند آگار، کاراژینان، آلژینات و غیره ارزش و اهمیت اقتصادی زیادی دارند (Taskin et al., 2007). جلبک‌ها حاوی مقادیر بالایی از ویتامین‌ها، مواد معدنی، پروتئین‌ها، کاروتنوئیدها، فیبرهای خوراکی و اسیدهای چرب ضروری هستند و به طور گسترده در صنایع غذایی، آرایشی و پزشکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Kotnala et al., 2009) همچنین جلبک‌ها منبع غنی از ترکیبات زیست‌فعال و مفید هستند که تاکنون ترکیبات زیستی متعدد با کاربردهای متنوع همچون اثرات آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌بیوتیکی، ضدقارچی، ضدویروسی و ضدسرطانی از جلبک‌های

1- Reactive Oxygen Species
2- Butylated Hydroytoluene
3- Butylhydroyanisole
4- Tert-butylhydroquinone
5- Propyl Gallat

پرسلولی شناسایی شده‌اند (Barsanti and Gualtieri, 2006) و به دلیل محتوای بالای ترکیبات آنتی‌اکسیدانی غیرآنزیمی مانند اسید آسکوربیک، گلوتاتیون، فنل و فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی هستند (Wu et al., 2010) و در برابر اکسیداسیون چربی مواد غذایی و استرس اکسیداتیو بافت‌ها اثر محافظتی بالقوه‌ای را ارائه می‌دهند (Yuan et al., 2005). ترکیبات بالقوه آنتی‌اکسیدانی در جلبک‌ها شامل برخی رنگدانه‌ها (فوکوزانتین، آستازانتین و کاروتنوییدها و غیره) و پلی‌فنول هستند (Souza et al., 2011). از طرف دیگر پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH)[1] نیز به دلیل خاصیت آنتی‌اکسیدانی به عنوان یک ماده زیستی نسبتا جدید مورد توجه قرار گرفته است. با توجه به پتانسیل بسیار بالای اکسیداسیون چربی در بسیاری از گونه‌های غذاهای دریایی، FPH می‌تواند برای کاهش اکسیداسیون چربی استفاده شود (Kristinsson and Rasco, 2002). بنابراین پژوهشگران به دنبال منابع آنتی‌اکسیدانی جدید با منشاء طبیعی هستند. از این رو، به دلیل اهمیت آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، این مطالعه به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی و عصاره ماکروجلبک *C. sinuosa* پرداخته است.

مواد و روش‌ها

تهیه ماده خام اولیه

مقدار ۸ کیلوگرم ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) از بندر صیادی مازندران (بابلسر) تهیه و با استفاده از یونولیت‌های حاوی یخ در حداقل زمان ممکن به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه منابع طبیعی گرگان منتقل شد. ابتدا ماهیان تخلیه شکمی و سپس با آب شستشو شدند. مواد خام اولیه با استفاده از چرخ گوشت صنعتی با منافذی به قطر ۰/۵ میلی‌متر به طور کامل چرخ شدند. سپس گوشت ماهی در کیسه‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی شد و به منظور آزمایش‌های بعدی در فریزر با دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جلبک (*Colpomenia sinuosa*)، از جلبک‌های قهوه‌ای جنوب کشور هستند که از سواحل شمالی خلیج فارس (قشم) جمع‌آوری شدند. پس از جمع‌آوری جلبک‌های دریایی، بلافاصله با آب دریا و سپس با آب شیرین شستشو داده شده، گل و لای و سایر مواد

1- Fish Protein Hydrolysate

چسبیده به آن‌ها زدوده شد. نمونه‌های تمیز شده، در کیسه‌های پلاستیکی زیپ‌دار قرار داده شدند و به منظور جلوگیری از نفوذ نور، توسط ورق‌های نازک آلومینیومی پوشانده و همراه با لایه‌های یخ در ظروف نگهدارنده مخصوص قرار داده شدند. شناسایی گونه‌ها توسط موسسه تحقیقات شیلات خلیج فارس صورت گرفت. سپس نمونه‌ها به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان منتقل و توسط آسیاب برقی پودر شد و تا شروع آزمایش‌های لازم برای عصاره‌گیری در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Sanchez-Machado et al., 2004).

آنزیم

آنزیم مورد استفاده شامل آنزیم Alcalase 2.4L استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* با فعالیت آنزیمی ۴/۲AU بر کیلوگرم و چگالی ۱۸/۱ گرم در میلی‌لیتر تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد (Wasswa et al., 2007).

پروتئین هیدرولیز شده

نمونه‌های چرخ شده و بسته‌بندی شده در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی شد. سپس ۵۰ گرم از آن توزین و در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر (نسبت وزنی- حجمی ۱:۲) به هر ارلن مایر حاوی نمونه اضافه شد و توسط هموژنایزر (T2 Digital ULTRA-TURRAX، IKA، آلمان) به مدت ۲ دقیقه هموژن و سپس در بن‌ماری با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی، نمونه خام حرارت‌دهی شدند (Guerard et al., 2002). pH محلول‌های تهیه شده اندازه‌گیری و با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال و یا هیدروکلریک اسید ۲ مولار به pH مورد نظر (pH ۸/۵) رسانده شد. نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (KS 4000 ic Control، IKA، آلمان) در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای انجام آزمایش‌ها با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد. پس از این که دمای نمونه‌ها به دمای مورد نظر رسیدند و درجه حرارت انکوباتور ثابت شد، آنزیم به مقدار ۰/۵ درصد به ارلن مایرهای حاوی ماده خام اولیه و آب مقطر تزریق شد. پس از هر نمونه‌گیری و در پایان آزمایش به منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها در بن‌ماری با

دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای مدت ۵ دقیقه حرارت‌دهی شدند (Guerard et al., 2002; Ovissipour et al., 2009) ارلن مایرهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از یخ تا رسیدن به دمای محیط، سرد و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور ۸۰۰۰g به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ (R5810، Eppendorf، آلمان) شدند. سپس مایع رویی آن‌ها جمع‌آوری و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع آزمایش نگهداری و بعد از آن با استفاده از دستگاه خشک‌کن به پودر تبدیل شد.

عصاره‌گیری جلبک

نمونه پودر شده به میزان ۵۰ گرم توزین شده، به ظروف شیشه‌ای منتقل شدند و با توجه به نسبت حلال به جلبک (۲۰ به ۱)، به نمونه‌ها ۱۰۰۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه افزوده شد (باباخانی لشکان و همکاران، ۱۳۹۲). سپس نمونه‌ها در شیکر انکوباتور در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه برای مدت ۲۴ ساعت به طور کامل هموژن شدند. لوله‌های فالکون حاوی عصاره جلبکی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با دور ۳۵۰۰g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. سپس مایع رویی لوله فالکون در شرایط سرد با استفاده از کاغذ صافی (Munktell، آلمان) فیلتر شد و همه عصاره‌ها جمع‌آوری و فریزدرای (Alpha 1-2 LD Plus، Christ، آلمان) شدند. پودر عصاره نیز در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان شروع آزمایش نگهداری شد (Seedevi et al., 2015).

تعیین میزان ترکیبات فنولی

به ۱۰۰ میلی‌لیتر از عصاره پلی‌ساکاریدی ۲ میلی‌لیتر Na_2CO_3 (۲٪) اضافه و بعد از ۲ دقیقه نگهداری در سکون در دمای اتاق، ۱۰۰ میکرولیتر محلول فولین- سیوکالتو ۵۰٪ به آن اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه قرارگیری نمونه‌ها در تاریکی در دمای اتاق، جذب آن‌ها در طول موج ۷۲۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Biochrom, Libra S12، انگلستان) خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید گالیک در غلظت‌های (۰/۱-۰/۰۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) استفاده شد (Tage et al., 1984).

مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH عصاره‌ها با استفاده از روش به کار رفته توسط Wong و همکاران (۲۰۱۳) و Rodriguez-Meizoso و همکاران (۲۰۰۶) با کمی تغییرات

تعیین شد. مطابق با روش ارائه شده، محلول معرف DPPH به صورت تازه و از حل شدن ۰/۰۲۳۵ گرم پودر بنفش رنگ DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر حلال اتانول تهیه و سپس به نسبت ۱ به ۱۰ با حلال اتانول رقیق‌سازی شد. غلظت‌های مختلف عصاره شامل ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (Lee et al., 2004) آماده و ۰/۱ میلی‌لیتر از این عصاره‌ها با ۳/۹ میلی‌لیتر از محلول معرف DPPH برای رسیدن به حجم ۴ میلی‌لیتر حل شدند و بلافاصله به مدت ۱ دقیقه روی شیکر قرار داده شدند. واکنش بعد از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق کامل شد و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. معرف اتانولی DPPH به عنوان نمونه شاهد و اتانول به عنوان نمونه بلانک در نظر گرفته شد. نمونه شاهد برای هر دور غلظت جدید از عصاره‌ها به صورت تازه تهیه و اندازه‌گیری شد. اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره‌ها طبق رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

$$I_{DPPH}\ (\%) = [(A_C - A_S)/A_C] \times 100$$

I_{DPPH}: درصد بازدارندگی؛ A_C: جذب شاهد؛ A_S: جذب نمونه.

قدرت احیاکنندگی آهن

۰/۵ میلی‌لیتر از عصاره استخراج شده در غلظت‌های مختلف (۴۰۰- ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به ۱/۲۵ میلی‌لیتر از بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH ۶/۶) اضافه شد و پس از اضافه کردن ۱/۲۵ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید ٪۱، انکوباسیون نمونه‌ها برای مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام شد. در ادامه با افزودن ۱/۲۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ٪۱۰، ۱/۲۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲۵۰ میلی‌لیتر $FeCl_3$ ٪۱، محلول به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد و در نهایت جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. برای رسم منحنی استاندارد از اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف (۴۰۰-۱۰) بر حسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر استفاده شد (Sellimi et al., 2015).

مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل

توانایی مهار رادیکال هیدروکسیل (OH) بر طبق روش Smirnoff و Cumbes (۱۹۹۹) با کمی تغییرات انجام شد. غلظت‌های مختلف نمونه (۱/۸۳-۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، با ۰/۵ میلی‌لیتر EDTA-Fe (۲ میلی‌مولار)،

۱میلی‌لیتر H_2O_2 (۳ درصد)، ۱میلی‌لیتر زعفران (۳۶۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و ۴/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات سدیم (۱۵۰ میلی‌مولار، pH ۷/۴) مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس با خواندن جذب در ۵۲۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر اثر مهار رادیکال هیدروکسیل مشخص شد. در نمونه شاهد از آب مقطر و به جای H_2O_2 از بافر فسفات سدیم استفاده شد. اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت در نظر گرفته شد. درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل عصاره‌ها طبق رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$I_{OH}\ (\%) = [(A_C - A_S)/A_C] \times 100$$

I_{OH}: درصد بازدارندگی؛ A_C: جذب شاهد؛ A_S: جذب نمونه.

تجزیه و تحلیل آماری

تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد و مقادیر به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد. برای بررسی آماری داده‌های به دست آمده، از نرم افزار SPSS (نسخه ۲۰) استفاده شد. سپس برای تحلیل داده‌ها از آزمون آماری آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای بررسی میانگین‌ها از آزمون LSD (در سطح خطای ٪۵) استفاده شد. برای رسم نمودارها از نرم افزار Microsoft Excel 2007 استفاده شد.

نتایج

اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی

در مطالعه حاضر، به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، ابتدا منحنی استاندارد (اسید آسکوربیک) رسم شد و اثر مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۲ درصد پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی ۲/۵۶±۰/۸۹ درصد مشاهده شد. اما اسید آسکوربیک که به عنوان شاهد مثبت استفاده شد در مقایسه با FPH دارای فعالیت مهارکنندگی قوی‌تری بود.

قدرت احیاکنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی

در این مطالعه به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، ابتدا منحنی استاندارد (اسید آسکوربیک) رسم شد و قدرت احیاکنندگی در غلظت ۲ درصد توسط پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی با میزان ۰/۴۷±۰/۰۰۷ مشاهده شد.

رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی

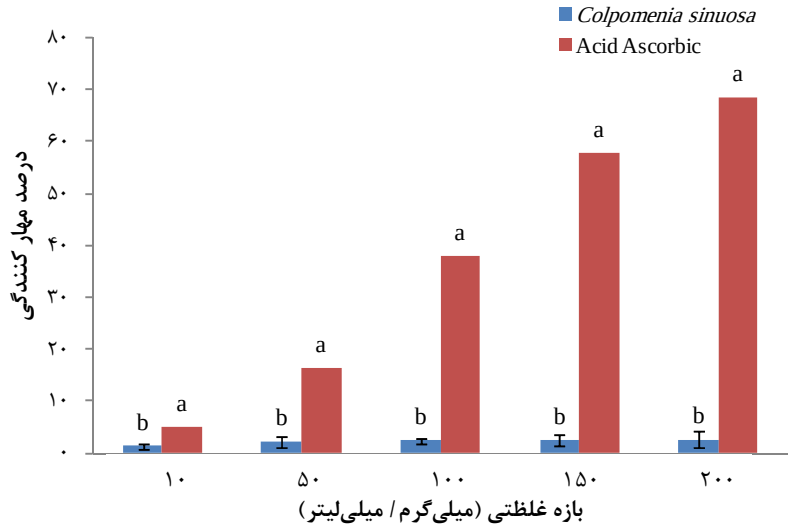
در مطالعه حاضر به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، ابتدا منحنی استاندارد (اسید آسکوربیک) رسم شد و درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل در غلظت ۲ درصد پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی ۱/۵۰±۷۱ درصد مشاهده شد.

فنل کل *Colpomenia sinuosa*

در مطالعه حاضر، به منظور تعیین فنل کل در عصاره جلبک *C. sinuosa*، ابتدا منحنی استاندارد (گالیک اسید) رسم شد و میزان فنل کل در این مطالعه ۰/۰۱ میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم نمونه مشاهده شد.

اثر مهارکنندگی رادیکال DPPH عصاره جلبکی *Colpomenia sinuosa*

توانایی مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره آبی ماکروجلبک *C. sinuosa* در شکل ۱ نشان داده شده است.

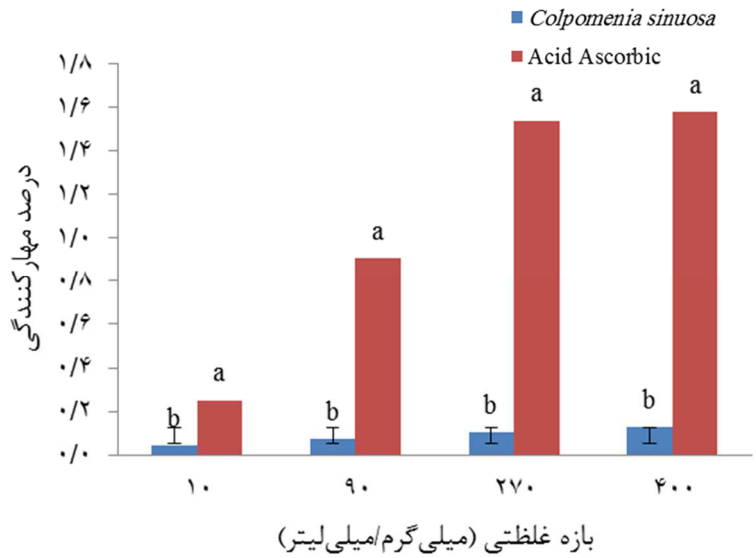


شکل ۱: قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *Colpomenia sinuosa* (میانگین ± انحراف معیار). اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت آنتی‌اکسیدان. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

در مطالعه حاضر، اثر مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره آبی *C. sinuosa* در غلظت‌های ۲۰۰- ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۲/۶۸- ۱/۳۶ درصد بود. با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد نیز افزایش می‌یابد. در بالاترین غلظت (۲۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شاهد مثبت اسید آسکوربیک اثر مهارکنندگی معادل ۶۸/۵۳ درصد را نشان داد. اثر مهارکنندگی توسط شاهد مثبت در تمام غلظت‌ها در مقایسه با عصاره جلبکی به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P<$ ۰/۰۱) و بین عصاره‌ها در تمام غلظت‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($P<$ ۰/۰۵). در این مطالعه نمونه جلبکی *C. sinuosa* توانایی ناچیزی را در مهار رادیکال آزاد DPPH از خود نشان داد در حالی که شاهد مثبت آسکوربیک اسید اثر مهارکنندگی قابل توجهی را از خود نشان داد.

قدرت احیاکنندگی یون آهن عصاره جلبکی *Colpomenia sinuosa*

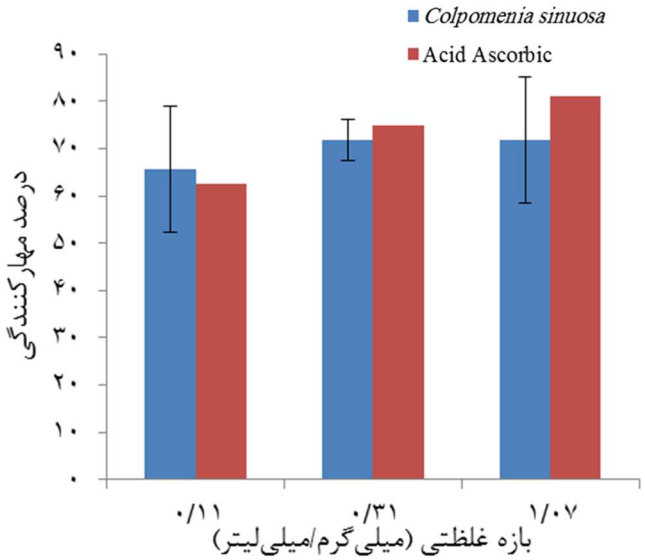
قدرت احیاکنندگی یون آهن توسط عصاره آبی ماکروجلبک *C. sinuosa* در شکل ۲ نشان داده شده است. با افزایش غلظت عصاره‌ها، قدرت احیا افزایش یافت. قدرت احیا *C. sinuosa* در غلظت ۴۰۰- ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۰/۱۲۸- ۰/۰۴۴ بود. در بالاترین غلظت (۴۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شاهد مثبت اسید آسکوربیک اثر مهارکنندگی معادل ۱/۵۷۹ را نشان داد. اثر مهارکنندگی توسط شاهد مثبت در تمام غلظت‌ها در مقایسه با عصاره جلبکی به صورت معنی‌داری بالاتر بود ($P<$ ۰/۰۱) و بین عصاره‌ها در تمام غلظت‌ها اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده شد ($P<$ ۰/۰۵). همان طور که در شکل دیده می‌شود با افزایش غلظت نمونه‌ها فعالیت احیاکنندگی نیز افزایش یافت. هر چه عدد جذب نمونه‌ها بالاتر باشد توانایی احیاکنندگی یون آهن توسط عصاره‌ها نیز بیشتر است که این پدیده گویای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتر است. از اسید آسکوربیک برای مقایسه قدرت احیاکنندگی عصاره با سایر آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده شد اسید آسکوربیک در تمام غلظت‌ها فعالیت احیاکنندگی بالاتری را از خود نشان داد.



شکل ۲: قدرت احیا آهن در غلظت‌های مختلف عصاره جلبک *Colpomenia sinuosa* (میانگین ± انحراف معیار). از اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت آنتی‌اکسیدان استفاده شد. حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی‌دار است (P<۰/۰۵).

رادیکال آزاد هیدروکسیل عصاره جلبک *Colpomenia sinuosa*

درصد مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل توسط عصاره آبی جلبک قهوه‌ای *C. sinuosa* در شکل ۳ نشان داده شده است. همان طور که در شکل دیده می‌شود فعالیت مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل به غلظت وابسته است و با افزایش غلظت عصاره‌ها درصد مهارکنندگی رادیکال هیدروکسیل نیز افزایش می‌یابد. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل *C. sinuosa* در غلظت ۱/۰۷-۰/۱۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۷۱/۸۷-۶۵/۶۲ درصد بود. در بالاترین غلظت (۱/۰۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) شاهد مثبت اسید آسکوربیک اثر مهارکنندگی معادل ۰/۰۰۳ درصد را نشان داد. بین غلظت‌های عصاره جلبکی اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵). در هیچ یک از غلظت‌ها بین عصاره جلبکی و اسید آسکوربیک از نظر فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل اختلاف آماری معنی‌داری مشاهده نشد (P>۰/۰۵) و عصاره جلبکی قدرتی مشابه با آنتی‌اکسیدان اسید آسکوربیک در مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل از خود نشان داد.



شکل ۳: درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل در غلظت‌های مختلف عصاره جلبکی *Colpomenia sinuosa* (میانگین ± انحراف معیار). از اسید آسکوربیک به عنوان شاهد مثبت آنتی‌اکسیدان استفاده شد. بین تیمارها اختلاف آماری معنی‌دار وجود نداشت (P>۰/۰۵).

بحث

روش مهار رادیکال DPPH یک روش سریع، راحت و کارآمد برای پیش‌بینی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها است. نوع آنزیم استفاده شده تاثیر مهمی بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر رادیکال آزاد DPPH محصول نهایی دارد (Yang et al., 2008). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی به پروتئازها، شرایط هیدرولیز و درجه هیدرولیز بستگی دارد (Jun et al., 2004). بسته به ویژگی آنزیم، در طول فرآیند هیدرولیز، طیف گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد تولید می‌شوند و هر گونه تغییر در سطح، اندازه و ترکیب پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد (Wu et al., 2003). ضمنا ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلی‌پپتیدها به توالی و طول آن‌ها مرتبط است و این بدان معنا است که پروتئازهای مختلف ممکن است از طریق هیدرولیز، پپتیدهای مختلف با توالی‌های مختلف تولید کند (Ahn et al., 2014). نتایج مطالعات Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) نشان

داد پروتیئن هیدرولیز شده محصولات ماهی ساردین دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است به طوری که بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (۸۷±۲/۱ درصد) با درجه هیدرولیز ۶ درصد بوده است. Foh و همکاران (۲۰۱۰) به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) پرداختند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد که بیشترین مقدار مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۸۶/۶۷ درصد) مربوط به نمونه هیدرولیز شده توسط آلکالاز بوده است (Foh et al., 2010). Ovissipour و همکاران (۲۰۱۳) اثر خود هضمی و هیدرولیز توسط پروتئازهای تجاری را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین ماهی کیلکا (*Clupeonella engrauliformis*) مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتایج به دست آمده توسط این پژوهشگران، بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH ۱۵/۶±۰/۷ درصد گزارش شده است که مربوط به نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم برروملین بوده است (Ovissipour et al., 2013). همچنین Nasri و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند بیشترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز شده ماهی goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) ۵۷±۰/۳۲ درصد بوده است.

یک رابطه مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت احیا ترکیبات زیست‌فعال آن‌ها وجود دارد (Juntachote et al., 2005). حضور آنتی‌اکسیدان در پروتئین‌های هیدرولیز شده باعث احیا کمپلکس آهن یا فریک سیانید Fe^{3+} به شکل آهن Fe^{2+} می‌شود (Wu et al., 2003). طی مطالعه‌ای که مهرگان نیکو و همکاران (۱۳۹۲) روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassius*) انجام دادند، بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی با میزان ۶۷/۳۲ درصد گزارش شد. بخشان و همکاران (۱۳۹۳) خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به دست آمده از ضایعات را در فرآیند فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*) مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی آزاد ۰/۴۲ بوده است (بخشان و همکاران، ۱۳۹۳). Samaranayaka و Li-Chan (۲۰۰۸) در بررسی قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی هیک اقیانوس آرام به جذب ۰/۶۰۳ دست یافتند. مطالعاتی که توسط Ovissipour

و همکاران (۲۰۱۳) روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) با استفاده از آنزیم‌های داخلی و تجاری انجام شد نشان داد قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی آنچوی توسط آلکالاز ۰/۱±۵/۱ بود که می‌تواند شروع اکسیداسیون چربی را به تاخیر اندازد. Elavarasan و همکاران (۲۰۱۴) خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور آب شیرین (*Catla catla*) را تحت تاثیر آنزیم‌های مختلف بررسی کردند. نتایج نشان دادند پروتئین هیدرولیز شده‌ای که با استفاده از آنزیم بروملین تهیه شده در مقایسه با پروتئین هیدرولیز شده‌ای که با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، فلاورزیم و پروتامکس تهیه شده است بالاترین قدرت احیاکنندگی را دارد. Piotrowicz و Mellado (۲۰۱۵) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کولی (*Engraulis anchoita*) را با استفاده از آنزیم‌های مختلف بررسی کردند و قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کولی را توسط آنزیم آلکالاز ۰/۰۰۱±۰/۲۶۲ گزارش دادند.

رادیکال هیدروژن واکنش‌پذیرترین رادیکال آزاد بوده که از واکنش بین آنیون سوپراکسید و پراکسید هیدروژن در حضور کاتالیزور یون فلزی مانند مس یا آهن تشکیل می‌شود (Abraham et al., 2013). طی بررسی که Je و همکاران (۲۰۰۵) روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای جدا شده از پروتئین هیدرولیز شده ماهی پولاک آلاسکا (*Theragra chalcogramma*) انجام دادند، نشان داده شد که فعالیت مهاری رادیکال آزاد هیدروکسیل به مقدار ۳۵ درصد بود. Girgih و همکاران (۲۰۱۳) برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی سالمون، بخش‌های پپتیدی جدا شده به وسیله HPLC را مورد بررسی قرار دادند و فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ماهی سالمون را ۲۸ درصد گزارش کردند. Wang و همکاران (۲۰۱۲) گزارش کردند که فعالیت مهاری رادیکال هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده عضلات *Sphyrna lewini* با توجه به غلظت متفاوت است. نتایج مطالعات آن‌ها نشان داد در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فعالیت مهاری ۰/۴۲±۹۴/۷۰ درصد بود (جدول ۱).

جدول ۱: نتایج مطالعات انجام شده بر پروتئین هیدرولیز شده (FPH) گونه‌های مختلف ماهی و قابلیت آنتی‌اکسیدانی آن

منبع	مهار DPPH (درصد)	FPH
Ovissipour et al., 2013	۱۵/۰±۶/۷	*Clupeonella engrauliformis*
Nasri et al., 2013	۰±۵۷/۳۲	*Zosterisessor ophiocephalus*
Foh et al., 2010	۸۶/۶۷	*Oreochromis niloticus*
Bougatef et al., 2010	۰±۵۷/۳۲	*Sardinella aurita*
مطالعه حاضر	۲/۵۶ ۰±/۸۹	*Clupeonella cultriventris caspia*
منبع	**قدرت احیاکنندگی آهن (درصد)**	**FPH**
Piotrowicz and Mellado, 2015	۰/۰±۲۶۲/۰۰۱	*Engraulis anchoita*
Elavarasan et al., 2014	۰/۰±۸۸۵/۰۶	*Catla catla*
Ovissipour et al., 2013	۵/۰±۱/۱	*Clupeonella engrauliformis*
Samaranayaka and Li-chan, 2008	۰/۶۰۳	*Merluccius productus*
بخشان و همکاران، ۱۳۹۳	۰/۴۲	*Salmo salar*
مهرگان نیکو و همکاران، ۱۳۹۲	۰/۵۱۳	*Carassius carassius*
مطالعه حاضر	۰/۴۷ ± ۰/۰۰۷	*Clupeonella cultriventris caspia*
منبع	**مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (درصد)**	**FPH**
Girgih *et al*., 2013	۲۸	*Salmo salar*
Wang et al., 2012	۹۴/۰±۷۰/۴۲	*Sphyrna lewini*
Je *et al*., 2005	۳۵	*Theragra chalcogramma*
مطالعه حاضر	۱±۷۱/۵۰	*Clupeonella cultriventris caspia*

ترکیبات فنولی یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که به طور قابل ملاحظه‌ای در فعالیت آنتی‌اکسیدانی جلبک‌ها نقش دارند (O'Sullivan et al., 2011). عصاره آبی جلبک مورد مطالعه، میزان فنول کل پایین‌تری را در مقایسه با عصاره‌های آبی جلبک‌های *Nizimuddinia zanardini* (۳/۳۷ میلی‌گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم نمونه) و *Iyengaria stellata* (۱/۲۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم نمونه) (محمدی، ۱۳۹۵) و عصاره‌های متانولی و کلرفرمی *Sargassum swartzii* (۱۲/۰±۰/۵ و ۱۱/۰۵±۰/۶ میلی‌گرم گالیک

اسید در ۱۰۰ گرم نمونه) (Sadati et al., 2011) از خود نشان دادند. ترکیبات فنلی معمولا در گیاهان یافت می‌شود، اما گزارش‌های اخیر نشان داد که عصاره جلبک‌های دریایی نیز حاوی آنتی‌اکسیدان فنلی هستند (Lim et al., 2002). باباخانی لشکان و همکاران (۱۳۹۱) اعلام کردند که عصاره آبی *Sargassum angustifolium* دارای بالاترین میزان ترکیبات فنولی (۲/۹۷±۰/۱۲ میلی‌گرم گالیک اسید بر گرم نمونه) بوده است.

فعالیت پایین جلبک در مهار رادیکال آزاد را می‌توان به توانایی ضعیف آن در اهدای اتم هیدروژن نسبت داد و از طرفی اثر مهارکنندگی بالای شاهد مثبت به دلیل توانایی بالای آن در اهدای اتم هیدروژن نسبت داد. از روش مهار رادیکال آزاد DPPH برای ارزیابی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی در زمان نسبتا کوتاه استفاده می‌شود. کاهش جذب در نتیجه تغییر رنگ محلول از بنفش به زرد اتفاق می‌افتد (Soares et al., 1997). در واقع، بیشتر، نمونه‌هایی قادر به مهار رادیکال آزاد DPPH هستند که در ساختار خود دارای گروه‌های OH- و $-OSO_3H$ باشند. جایگزینی گروه OH- با گروه $-OSO_3H$ باعث تقویت اثر مهارکنندگی می‌شود. بنابراین هر چه تعداد گروه OH- بیشتر باشد اثر مهارکنندگی نیز قوی‌تر خواهد بود (Zhang et al., 2011). قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH عصاره جلبک *C. sinuosa* مورد مطالعه، در مقایسه با جلبک *I. stellata* (محمدی، ۱۳۹۵) پایین‌تر و قدرت مهاری مشابه با جلبک *N. zanardini* نشان داده است و توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره آبی جلبک قهوه‌ای *I. stellata* به صورت معنی‌داری از *N. zanardinia* بالاتر بود. باباخانی لشکان و همکاران (۱۳۹۱) دریافتند بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH مربوط به عصاره آبی جلبک *Sargassum angustifolium* (۳/۲۷±۲/۳۳ درصد) بود. Lekameera و همکاران (۲۰۰۸) گزارش کردند که بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در عصاره متانولی جلبک *C. sinuosa*، ۸۸/۵۷ درصد بود. Bambang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش کردند بالاترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط عصاره اتانولی *Sargassum crassifolium* با مقدار ۷۳/۴۸±۰/۵۷ درصد و عصاره اتیل‌استاتی جلبک *Sargassum filipendula* با مقدار ۹۳/۸۷±۱/۳۸ درصد بود. همچنین Ye و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در عصاره

اتیل‌استاتی و بوتانولی جلبک *S. pallidum* بالاتر از عصاره به دست آمده از سایر حلال‌ها بود. به طوری که در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به ترتیب ۳۰/۵۰ و ۲۹/۳۶ درصد بود.

ماکروجلبک‌های دریایی منبع غنی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بوده و این پتانسیلی را برای کاربرد آن‌ها در محصولات غذایی و دارویی به وجود می‌آورد (سفری و همکاران، ۱۳۹۴). ظرفیت احیاکنندگی عصاره جلبک *C. sinuosa* مورد مطالعه در مقایسه با جلبک‌های *N. zanardini* و *I. stellata* پایین‌تر بود (محمدی، ۱۳۹۵). Ye و همکاران (۲۰۰۹) گزارش کردند که بالاترین مقدار قدرت احیاکنندگی عصاره آبی جلبک *Sargassum pallidum* و جذب ۰/۲۶۷±۰/۰۰۱ را داشت و در مقایسه با عصاره‌های بوتانولی، اتیل‌استاتی، کلرفرمی و اتانولی، عصاره مورد مطالعه قدرت احیا قابل توجهی را نشان داد. Taheri (۲۰۱۶) بیشترین مقدار قدرت احیاکنندگی عصاره متانولی جلبک *Gracilaria corticata* را ۰/۶۴±۰/۰۱ گزارش کرد (جدول ۲).

رادیکال هیدروکسیل به عنوان یک اکسید کننده بسیار قوی در نظر گرفته شده است که می‌تواند با اکثر ماکرومولکول‌های عملکردی در سلول‌های زنده واکنش نشان دهد و باعث آسیب شدید به مولکول‌های زیستی مجاور شود. بنابراین از بین بردن رادیکال هیدروکسیل در سیستم‌های سلولی و غذایی به عنوان دفاع آنتی‌اکسیدانی بسیار مهم است (Hu et al., 2010). عصاره جلبک *C. sinuosa* مورد مطالعه در مقایسه با جلبک‌های *I. stellata* (۸۴/۸۴ درصد) و *N. zanardini* (۸۱/۶۶ درصد) (محمدی، ۱۳۹۵) فعالیت مهاری پایین‌تری را نشان داد.

Athukorala و همکاران (۲۰۰۶) اعلام کردند فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل عصاره جلبک *Ecklonia cava*، ۳۱/۲ درصد بوده و به طور قابل توجهی پایین‌تر از عصاره مورد مطالعه بوده است. بالاترین درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد هیدروکسیل مربوط به عصاره آبی جلبک *Turbinaria conoides* ۱۴/۴±۱/۹۰ درصد بود که توسط Sachindra و همکاران (۲۰۱۰) گزارش شد، اما این مقدار نسبت به عصاره جلبکی مورد مطالعه بسیار کمتر بوده است (جدول ۲).

جدول ۲: نتایج مطالعات انجام شده بر گونه‌های مختلف جلبک به همراه حلال‌های استخراج و قابلیت آنتی‌اکسیدانی

گونه	حلال استخراج	میزان فنل کل (میلی‌گرم اسید گالیک بر گرم نمونه)	منبع
Sargassum swartzii	متانولی	۱۲/۰±۰/۵	Sadati et al., 2011
Sargassum swartzii	کلرفرمی	۱۱/۰±۰۵/۶	
Nizimuddinia zanardini	آبی	۳/۳۷	محمدی، ۱۳۹۵
Iyengaria stellata	آبی	۱/۲۲	
Sargassum angustifolium	آبی	۲/۰±۹۷/۱۲	باباخانی لشکان و همکاران، ۱۳۹۱
Colpomenia sinuosa	آبی	۰/۰۱	مطالعه حاضر
گونه	**حلال استخراج**	**DPPH (درصد)**	**منبع**
Sargassum filipendula	اتیل استاتی	۱/۳۸ ±۸۷/۹۳	Bambang et al., 2013
Sargassum crassifolium	اتانولی	۰/۵۷ ±۴۸/۷۳	
Sargassum pallidum	بوتانولی	۲۹/۳۶	Ye et al., 2009
Sargassum pallidum	اتیل استاتی	۳۰/۵۰	
Colpomenia sinuosa	متانولی	۸۸/۵۷	Lekameera et al., 2008
Nizimuddinia zanardini	آبی	۲/۷۳	محمدی، ۱۳۹۵
Iyengaria stellata	آبی	۷/۱۶	
Sargassum angustifolium	آبی	۲/۳۳ ±۲۷/۳	باباخانی لشکان و همکاران، ۱۳۹۱
Colpomenia sinuosa	آبی	۲/۶۸	مطالعه حاضر
گونه	**حلال استخراج**	**قدرت احیاکنندگی**	**منبع**
Gracilaria corticata	متانولی	۰/۶۴±۰/۰۱	Taheri, 2016
Sargassum.pallidum	آبی	۰/۲۶۷±۰/۰۰۱	Ye et al., 2009
Nizimuddinia zanardinii	آبی	۲۲٪/۷۶	محمدی، ۱۳۹۵
Iyengaria stellata	آبی	۶٪/۴	
Colpumenia.sinusa	آبی	۰/۱۲۸	مطالعه حاضر
گونه	**حلال استخراج**	**رادیکال آزاد هیدروکسیل (درصد)**	**منبع**

Turbinaria conoides	آبی	۱/۹۰ ±۴/۱۴	Sachindra *et al*., 2010
Ecklonia cava	-	۳۱/۲	Athukorala *et al*., 2006
Nizimuddinia zanardini	آبی	۸۱/۶۶	محمدی، ۱۳۹۵
Iyengaria stellata	آبی	۸۴/۸۴	
Colpomenia sinuosa	آبی	۷۱/۸۷	مطالعه حاضر

در این پژوهش فعالیت آنتی‌اکسیدانی ماکروجلبک *Colpomenia sinuosa* و پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی ارزیابی شد. نتایج فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که ماکروجلبک *C. sinuosa* و پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی منبع غنی از آنتی‌اکسیدان هستند و می‌توان از آن‌ها در صنایع دارویی و غذایی استفاده کرد.

منابع

باباخانی لشکان آ.، رضایی م.، رضایی ک. و سیف آبادی س.ج. ۱۳۹۱ . بهینه‌سازی استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدانی جلبک قهوه‌ای *Sargassum angustifolium* خلیج فارس به روش استخراج به کمک مایکروویو. نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۵(۳): ۲۵۵-۲۴۳.

باباخانی لشکان آ.، رضایی م.، رضایی ک. و سیف‌آبادی س.ج. ۱۳۹۲. استفاده از عصاره استخراج جلبک قهوه‌ای سارگاسوم (*Sargassum angustifolium*) به عنوان آنتی‌اکسیدان در نگهداری گوشت چرخ شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) در یخچال. نشریه شیلات دانشگاه تهران، ۶۶(۱): ۱۳-۱.

بخشان ع.، علیزاده دوغیکلایی ا. و طاهری ع. ۱۳۹۳. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت به دست آمده از ضایعات، در فرآیند فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*).

پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۱(۱): ۱۱۵۱-۱۱۴۲.

سفری پ.، رضایی م.، شویک‌لو ا.ر.، گرمسیری ا. و باباخانی لشکان آ. ۱۳۹۴. تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و میزان فنول کل دو گونه جلبک دریایی خلیج فارس *Chaetomorpha* و *Colpomenia sinuosa* در شرایط آزمایشگاهی (in vitro). مجله علوم و فنون دریایی، ۱۴(۱): ۷۰-۶۱.

محمدی ع. ۱۳۹۵. مقایسه خواص فیزیکوشیمیایی و کاربردی دو گونه جلبک قهوه‌ای (*Iyengaria stellata, Nizimuddinia zanardini*) سواحل قشم. پایان نامه کارشناسی ارشد، دانشگاه منابع طبیعی گرگان. ۹۲ص.

مهرگان نیکو ع.ر.، صادقی ماهونک ع.ر.، قربانی م.، طاهری ع. و اعلمی م. ۱۳۹۲. بهینه‌سازی عوامل موثر در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ. نشریه فرآوری و نگهداری مواد غذایی، ۵(۱): ۱۱۰-۹۵.

Abraham P., Ramamoorthy H. and Isaac B. 2013. Depletion of the cellular antioxidant system contributes to tenofovir disoproxil fumarate-induced mitochondrial damage and increased oxido-nitrosative stress in the kidney. Journal of Biomedical Science, 20(1): 2–15.

Ahn C.B., Kim J.G. and Je J.Y. 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. Food Chemistry, 147: 78–83.

Athukorala Y., Kim K.N. and Jeon Y.J. 2006. Antiproliferative and antioxidant properties of an enzymatic hydrolysate from brown

alga, *Ecklonia cava*. Food and Chemical Toxicology, 44: 1065–1074.

Bambang B.S., Kumalaningsih S., Susinggih W. and Hardoko. 2013. Polyphenol content and anti-oxidant activities of crude extract from brown algae by various solvents. Journal of Life Science and Biomedicine, 3(6): 439–443.

Barsanti L. and Gualtieri P. 2006. Algae: Anatomy, biochemistry, and biotechnology. Taylor and Francis Group, New York. 361P.

Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec R., Barkia A., Guillochon D. and Nasri M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate Ps of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. Food Chemistry, 118(3): 559–565.

Devi K.P., Suqanthy N., Kesika P. and Pandian S.K. 2008. Bio-protective properties of seaweeds: in vitro evaluation of antioxidant activity and antimicrobial activity against food borne bacteria in relation to polyphenolic content. BMC Complementary and Alternative Medicine, 8(38): 1–11.

Elavarasan K., Naveenkumar N. and Samasundar B.A. 2014. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from freshwater carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. Journal of Food Processing and Preservation, 38(3): 1207–1214.

Foh M.B.K., Amadou I., Foh B.M., Kamara M.T. and Xia W. 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis. International Journal of Molecular Sciences, 11: 1851–1869.

Girgih A.T., Udenigwe C.C., Hasan F.M., Gill T.A. and Aluko R.E. 2013. Antioxidant properties of salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. Food Research International, 52: 315–322.

Guerard F., Guimas L. and Binet A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B, 19–20: 489–498.

Hu T., Liu D., Chen Y., Wu J. and Wang S. 2010. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. International Journal of Biological Macromolecules, 46: 193–198.

Je J.Y., Park P.J. and Kim S.K. 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food

Research International, 38: 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: 20–26.

Juntachote T. and Berghofer E. 2005. Antioxidative properties and stability of ethanolic extracts of holy basil and galangal. Food Chemistry, 92: 193–202.

Kotnala S., Garg A. and Chatterji A. 2009. Screening for the presence of antimicrobial activity in few Indian seaweeds, *Pertanika*. Journal of Tropical Agricultural Science, 32(1): 69–75.

Kristinsson H.G. and Rasco B.A. 2002. Fish protein hydrolysates and their potential use in the food industry. P: 157–181. In: Fingerman M. and Nagabhushanam R. (Eds.). Recent Advances in Marine Biotechnology, Vol. 7. Enfield, New Hampshire.

Lee H.J., Kim Y.A., Ahn J.W. and Seo Y.W. 2004. Screening of peroxynitrite and DPPH radical scavenging activities from salt marsh plants. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering, 19(1): 57–61.

Lekameera R., Vijayabaskar P. and Somasundaram S.T. 2008. Evaluating antioxidant property of brown alga *Colpomenia sinuosa* (Derb et Sol). African Journal of Food Science, 2: 126–130.

Lim S.N., Cheung P.C.K., Ooi V.E.C. and Ang P.O. 2002. Evaluation of antioxidative activity of extracts from a brown seaweed, *Sargassum siliquastrum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50: 3862–3866.

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

O'Sullivan A.M., O'Callaghan Y.C., O'Grady M.N., Queguineur B., Hanniffy D., Troy D.J. Kerry J.P. and O'Brien N.M. 2011. In vitro and cellular antioxidant activities of seaweed extracts prepared from five brown seaweeds harvested in spring from the west coast of Ireland. Food Chemistry, 126: 1064–1070.

Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R. and Shahiri H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Journal of Food Chemistry, 115: 238–242.

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

Piotrowicz I.B.B. and Mellado M.M.S. 2015. Antioxidant hydrolysates production from Argentine anchovy (*Engraulis anchoita*) with different enzymes. International Food Research Journal, 22(3): 1203–1211**.**

Rodriguez-Meizoso I., Marin F.R., Herrero M., Senorans F.J., Reglero G., Cifuentes A. and Ibanez E. 2006. Subcritical water extraction of nutraceuticals with antioxidant activity from oregano: Chemical and functional characterization. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1560–1565

Sadati N., Khanavi M., Mahrokh A., Nabavi S.M.B., Sohrabipour J. and Hadjiakhoondi A. 2011. Comparison of antioxidant activity and total phenolic contents of some Persian Gulf marine algae. Journal of Medicinal Plants, 10(37): 73–79.

Samaranayaka A.G.P. and Li-Chan E.C.Y. 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Food Chemistry, 107: 768–776.

Samaraweera A.M., Vidanarachchi J.K. and Kurukulasuriya M.S. 2012. Industrial applications of macroalgae. P: 500–521 In: Kim S.K. (Ed.). Handbook of Marine Macroalgae Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley and Sons Ltd., UK.

Sanchez-Machado D.I., Lopez-Cervantes J., Lopez-Hernandez J. and Paseiro-Losada P. 2004. Fatty acids, total lipid, protein and ash contents of processed edible seaweeds. Food Chemistry, 85: 439–444.

Seedevi P., Moovendhan M., Sudharsan S., Vasanthkumar S., Srinivasan A., Vairamani S. and Shanmugam A. 2015. Structural characterization and bioactivities of sulfated polysaccharide from *Monostroma oxyspermum*. International Journal of Biological Macromolecules, 72: 1459–1465.

Sellimi S., Younes I., Ben Ayed H., Maalej H., Montero V., Rinaudo M., Dahia M., Mechichi T., Hajji M. and Nasri1 M. 2015. Structural, physicochemical and antioxidant properties of sodium alginate isolated from a Tunisian brown seaweed. International Journal of Biological Macromolecules, 72: 1358–1367.

Smirnoff N. and Cumbes Q.J. 1999. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry, 28: 1057–1060.

Soares J.R., Dins T.C.P., Cunha A.P. and Almeida L.M. 1997. Antioxidant activities of some extracts of *Thymus zygis*. Free Radical Research, 26: 469–478.

Souza B.W.S., Cerqueira M.A., Martins J.T., Quintas M.A.C., Ferreirat A.S., Teieirat J.A. and Vicente A.A. 2011. Antioxidant potential of two red seaweeds from the Brazilian coasts. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(10): 5589–5594.

Tage M.S., Miller E.E. and Pratt D.E. 1984. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. Journal of the American Oil Chemists' Society, 61(5): 928–931.

Taheri A. 2016. Antioxidant activity in some Iranian seaweed species from Chabahar. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 15(2): 802–817.

Taskin E., Ozturk M. and Kurt O. 2007. Antibacterial activities of some marine algae from the Aegean Sea (Turkey). African Journal of Biotechnology, 6(24): 2746–2751.

Wang B., Li Z.R., Chi C.F., Zhang Q.H. and Luo H.Y. 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of *Sphyrna lewini* muscle. Peptides, 36: 240–250.

Wasswa J., Tang J., Gu X.H. and Yuan X.Q. 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp. Food Chemistry, 104: 1698–1704.

Wijeratne S.S., Cuppett S.L. and Schlegel V. 2005. Hydrogen peroxide induced oxidative stress damage and antioxidant enzyme response in Caco-2 human colon cells. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 8768–8774.

Wijesekara I., Senevirathne M., Li Y.X. and Kim S.K. 2012. Functional ingredients from marine algae as potential antioxidants in the food industry. In: 398–402. Kim, S.K. (Ed.). Handbook of Marine Macro Algae Biotechnology and Applied Phycology. John Wiley and Sons Ltd., UK.

Wong B.Y., Tan C.P. and Ho C.W. 2013. Effect of solid-to-solvent ratio on phenolic content and antioxidant capacities of ‘‘Dukung Anak’’ (*Phyllanthus niruri*). International Food Research Journal, 20(1): 325–330.

Wu H.C., Chen H.M. and Shiau C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*).

Food Research International, 36: 949–957.

Wu S.C., Wang F.J. and Pan C.L. 2010. The comparison of anti-oxidative properties of seaweed oligosaccharides fermented by two lactic acid bacteria. Journal of Marine Science and Technology, 18: 537–545.

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: 128–136.

Ye H., Zhou C., Sun Y., Zhang X., Liu J., Hu Q. and Zeng X. 2009. Antioxidant activities in vitro of ethanol extract from brown seaweed *Sargassum pallidum*. European Food Research and Technology, 230: 101–109.

Yuan Y.V., Bone D.E. and Carrington M.F. 2005. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. Food Chemistry, 91: 485–494.

Zhang Y., Lu X., Fu Z., Wang Z. and Zhang J. 2011. Sulphated modification of a polysaccharide obtained from fresh persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit and antioxidant activities of the sulphated derivatives. Food Chemistry, 127: 1084–1090.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 4, Winter 2018

Evaluation of antioxidant activity of protein hydrolysate from Common Kilka (*Clupeonella Cultriventris caspia*) and brown algae *Colpomenia sinuosa* extract

Vida Ghaemi[1], Ebrahim Alizadeh Doughikollaee[2], Moazameh Kordjazi[3]*

Received: January 2017 Accepted: June 2017

Abstract

Today, due to adverse effects of chemical antioxidants, natural antioxidants have attracted considerable attention. Seaweeds and fish protein hydrolysates are rich sources of natural antioxidants and have an important role in keeping the quality of food served during processing and storage. In this study, the antioxidant activity of protein hydrolysate from the common kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) and brown algae (*Colpomenia sinuosa*) extract was investigated. The results showed DPPH and hydroxyl free radical scavenging methods, at a concentration of 2%, respectively 2.56±0.89% and 71±1.50% and amount of reducing power of iron at a concentration of 2% was 0.47±0.007 in protein hydrolysate and for algae extract at concentrations of 200 (DPPH) and 400mg/mL (Hydroxyl free radical scavenging) were respectively 2.68±1.50% and 71.87±13.25% and amount of reducing power of iron in concentration of 1.07mg/mL was 0.128±0.003. In conclusion, protein hydrolysate from the common kilka (*C. cultriventris caspia*) and algae (*C. sinuosa*) extracts can be considered as a potential source of antioxidant compounds.

Key words: *Brown Algae, Protein Hydrolysates, Antioxidant Activity, Common Kilka*.

1- M.Sc. in Seafood Processing, Zabol University, Zabol, Iran.
2- Associate Professor in Seafood Processing Department, Zabol University, Zabol, Iran.
3- Assistant Professor in Seafood Processing Department, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
*Corresponding Author: kordjazi.m@gmail.com