فیزیولوژی و بیوتکنولوژی آبزیان
سال پنجم، شماره سوم، پاییز ۱۳۹۶

تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی کیلکا با روش هیدرولیز آنزیمی و سنجش خواص زیست‌فعالی آن

زهرا نحوی[۱]، سید فخرالدین حسینی[۲]*، مژگان زندی[۳]

تاریخ دریافت: آذر ۹۵ تاریخ پذیرش: اسفند ۹۵

چکیده

در مطالعه حاضر، ابتدا با استفاده از آنزیم آلکالاز از ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) پروتئین هیدرولیز شده (FPH) به دست آمد. سپس فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی به وسیله آزمون‌های قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، قدرت کاهندگی آهن، فعالیت شلاته کنندگی یون آهن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل در ۵ غلظت متفاوت (۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر)، مورد ارزیابی قرارگرفت. نتایج بیان کننده آن بود که با افزایش غلظت پروتئین، خاصیت آنتی‌اکسیدانی FPH به طور معنی‌داری افزایش یافت. بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی آهن، شلاته کنندگی یون آهن و فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل مربوط به غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در مجموع می‌توان گفت هیدرولیز آنزیمی ماهی کیلکا منجر به تولید پروتئین‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی می‌شود که می‌توانند بعد از تایید مطالعات کلینیکی به عنوان افزودنی مواد غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

واژگان کلیدی: *کیلکای معمولی، پروتئین هیدرولیز شده ماهی، فعالیت آنتی‌کسیدانی.*

۱- کارشناس ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۲- استادیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران.
۳- دانشیار گروه پلیمرهای زیست‌سازگار، پژوهشگاه پلیمر و پتروشیمی ایران، تهران، ایران.
* نویسنده مسئول: hosseinisf@modares.ac.ir

مقدمه

اهمیت اکسیداسیون در بدن و مواد غذایی به خوبی شناخته شده است و این واکنش برای بقای سلول‌ها ضروری است. یکی از اثرات جانبی این واکنش تولید رادیکال‌های آزاد و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال (ROS[1]) است که باعث تغییرات اکسیداتیو می‌شود (Sharma et al., 2012). در این میان آنتی‌اکسیدان‌ها به عنوان اصلی‌ترین راه مبارزه با رادیکال‌های آزاد و بازسازی سلول‌های تخریب شده مطرح هستند، چرا که موجب تخریب آن‌ها و افزایش کارایی سیستم ایمنی بدن در مقابل انواع بیماری‌ها می‌شود. همچنین آنتی‌اکسیدان‌ها خطر پیشرفت بیماری آلزایمر را کاهش می‌دهند (Skouta et al., 2014).

آنتی‌اکسیدان‌ها به طور گسترده‌ای در مکمل‌های غذایی برای تقویت سلامت و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌هایی مانند سرطان و بیماری‌های عروق کرونر قلب استفاده می‌شوند و بدن را از اثرات مخرب رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال حفظ می‌کنند، همچنین مانع پیشرفت بسیاری از بیماری‌های مزمن و پراکسیداسیون لیپیدی می‌شوند (Najafian and Babji, 2012). هدف اصلی استفاده از یک آنتی‌اکسیدان به عنوان افزودنی غذایی، حفظ کیفیت غذا و افزایش عمر نگهداری آن است (Peighambardoust, Zarenejad and 2014). پژوهش در رابطه با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Mohammadiet al., 2016). در حال حاضر جمعیت جهان حدود ۲۵٪ از پروتئین مورد نیاز خود را از ماهی به دست می‌آورند (Khora, 2013). اهمیت ماهی به عنوان منبعی از مواد زیست‌فعال جدید با سرعت نسبتا زیادی در حال رشد است (Najafian and Babji, 2012) که با داشتن اسیدهای چرب غیراشباع، پلی‌ساکاریدها، مواد معدنی، ویتامین‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها، آنزیم‌ها و پپتیدهای زیست‌فعال به عنوان غذای کارکردی و منبعی از غذا-داروها استفاده می‌شود (Khora, 2013). غذاهای کارکردی شامل یک غذای کامل یا غذاهای غنی شده و بهبود یافته می‌باشد 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 می‌کند (Hasler, 2002). در مقایسه با مواد

1- Reactive Oxygen Species

غذایی متداول، غذاهای کارکردی دارای مزایای فیزیولوژیکی است و خطر ابتلا به بیماری‌های مزمن را فراتر از مواد مغذی پایه‌ای کاهش می دهند. همچنین بدن را با مقدار قابل توجهی از ویتامین، چربی، پروتئین و کربوهیدرات که برای بقای سلامت آن مورد نیاز است مواجه می‌کنند (Chingwaru, 2010 Cencic and).

در این بین، کیلکای معمولی (*cultriventris Clupeonella*) ساکن مناطق کم‌عمق و نزدیک به ساحل دریای خزر هستند که تغییر صیدگاه‌ها موجب افزایش برداشت این ذخیره نسبت به سال‌های گذشته شده است (مطلبی و پرافکنده، ۱۳۸۸). متاسفانه، به دلیل اندازه کوچک، فسادپذیری بالا و عدم تخلیه شکمی تنها بخش کوچکی از کیلکاماهیان صید شده (۴٪) به مصرف انسانی رسیده و مابقی آن برای تولید پودر ماهی استفاده می‌شود (Khoshkhoo et al., 2010). در نتیجه، به منظور دست‌یابی به حداکثر کارایی می‌توان از کیلکا ماهیان در تولید محصولات با ارزش افزوده[1] و به ویژه استخراج ترکیبات زیست‌فعال استفاده کرد. پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از ماهی ممکن است فعالیت‌های زیستی متنوع از جمله بازدارندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین I[2] (ACE) (Raghavan and Kristinsson, 2009)، تنظیم سیستم ایمنی (Shahidi et al., 1995)، اثرات ضدانعقادی (Jo et al., 2008)، اثرات آنتی‌اکسیدانی (Thiansilakul et al., 2007) و اثرات ضدمیکروبی (Salampess et al., 2010) را نشان دهند. پپتیدهای زیست فعال در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال است و بعد از آزاد شدن توسط هیدرولیز آنزیمی، عملکردهای فیزیکوشیمیایی متعددی را از خود بروز می‌دهند.

با این که در حال حاضر، استراتژی اصلی شناسایی و مشخص کردن پروتئین‌های آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز پروتئین‌ها است، توصیف روش‌های جدید در ارتباط با ساختار پروتئین و فعالیت آنتی‌اکسیدانی برای پیش‌بینی پتانسیل آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مواد غذایی مورد نیاز است. در این راستا، تعدادی از مطالعات نشان دادند که پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی (FPH)[3] به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های قوی عمل می‌کنند (Ko et al., 2013). از طرفی، قابلیت آنتی‌اکسیدانی

1- Value-added Products
2- Angiotensin I Converting Enzyme
3- Fish Protein Hydrolysate

این پروتئین‌های هیدرولیز شده به تاثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شده است. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال های آزاد، شلاته کردن فلزات، غیرفعال کنندگی اکسیژن یا دهندگی هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغاز کننده‌های اکسیداسیون چربی به - وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن است (Li et al., 2008). به کارگیری تکنولوژی آنزیمی به منظور بازیابی و تغییرات پروتئینی، منجر به تولید طیف گسترده‌ای از اجزای غذایی و محصولات صنعتی شده است. مشخص شده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی قابلیت استفاده در کاربردهای تغذیه‌ای و دارویی دارند (Nalinanon et al., 2011).

در مطالعه‌ای توسط Dong و همکاران (۲۰۰۸)، پروتئین مینس ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) با آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزیم هیدرولیز شده و خواص بیوشیمیایی و آنتی‌اکسیدانی آن بررسی شد و مشخص شد که FPH توانایی قابل توجهی را در مهار رادیکال هیدروکسیل و پراکسیداسیون اسید لینولئیک از خود نشان می‌دهد. بنابراین، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با هدف افزودن به مواد غذایی امکان تداوم انتشار ترکیب آنتی‌اکسیدانی را در طی نگه‌داری و توزیع فراهم آورده، و از همین رو منجر به افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی با کاهش اکسیداسیون خودبه‌خودی لیپید، که به عنوان یکی از عوامل اصلی موثر بر از بین رفتن کیفیت حسی و تغذیه‌ای شناخته می‌شود.

مواد و روش‌ها

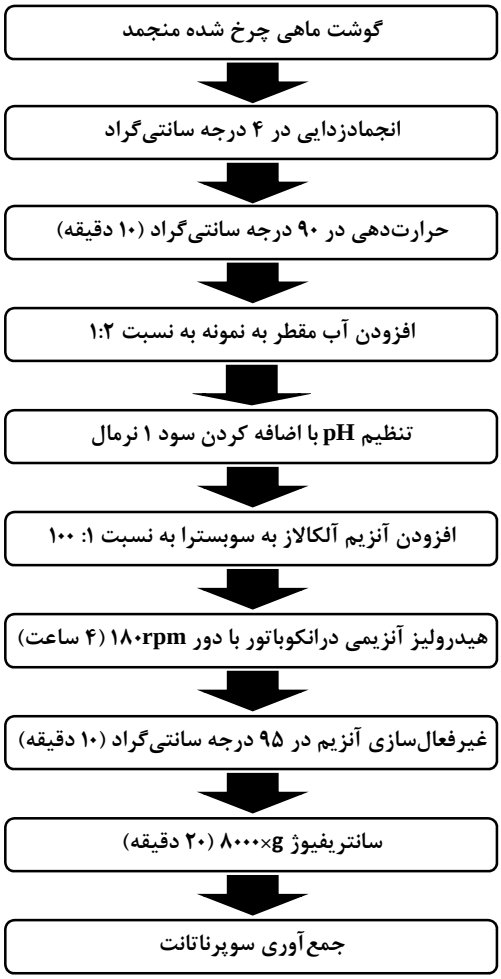
تهیه نمونه

ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*) پس از صید از سواحل بابلسر، یخ‌گذاری شد و به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور) انتقال داده شد. نمونه‌ها پس از شستشو با آب سرد، در پلاستیک‌های درب‌دار بسته‌بندی و به منظور بررسی‌های آزمایشگاهی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH)

در ابتدا ماهی کیلکای منجمد در دمای محیط انجمادزدایی شده، با آب مقطر به خوبی شسته شد و با چرخ گوشت به طور کامل چرخ شد. مراحل تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی در شکل ۱ نشان داده شده است. پس از چرخ کردن، مقدار ۲۰ گرم از نمونه روی ترازو وزن شد و برای غیرفعال‌سازی آنزیم

های درونی، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم قرار گرفت. سپس با نسبت ۲:۱ (نمونه:آب مقطر) آب مقطر به نمونه اضافه شد و در بشر با هموژنایزر (DIAX 900، Heidolph، آلمان) به خوبی همگن شد. سپس pH واکنش برای دستیابی به میزان بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز (pH ۸/۵)، با اضافه کردن محلول سود ۱ نرمال به محیط واکنش ثابت نگه داشته شد.



شکل ۱: مراحل تهیه پروتئین هیدرولیز شده از کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris*)

سپس آنزیم آلکالاز در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴ ساعت با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱ به ۱۰۰ در انکوباتور شیکردار (Comecta، اسپانیا) با دور ۲۰۰rpm هیدرولیز شد. پس از آن، آنزیم با حرارت دادن مخلوط در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه غیرفعال شد و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه با دور g×۷۹۰۰ سانتریفیوژ (Universal ،320 R، آلمان) شد. مایع روماند جمع‌آوری شد و سپس به منظور دست‌یابی به غلظت‌های مختلف از FPH میزان پروتئین محلول با استفاده از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) اندازه‌گیری شد. در پایان نمونه‌ها در فریز ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگه‌داری شدند (Ovissipour et al., 2012).

اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH[1]

برای این منظور ۲ میلی‌لیتر از محلول ۰/۱۶ میلی‌مولار DPPH[2] با ۲ میلی‌لیتر نمونه با غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مخلوط شد. سپس ترکیب حاصل به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق در شرایط تاریکی نگه داشته شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با روش طیف‌سنجی[3] اندازه‌گیری شد. نمونه شاهد نیز به همین طریق تهیه شد با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH با توجه به رابطه ۱ محاسبه شد.

رابطه ۱:

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

R_{DPPH}: قدرت مهارکنندگی رادیکال DPPH؛ A_S: میزان جذب نمونه مورد آزمایش؛ AC: میزان جذب شاهد.

جذب کمتر مخلوط نشان دهنده فعالیت مهار رادیکالی DPPH بالاتر است (Brand-Williams et al., 1995).

تعیین قدرت کاهندگی آهن (III)[4]

بدین منظور ۱ میلی‌لیتر از نمونه با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار (pH ۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱ درصد (Ferricyanide Potassium) ترکیب شد. ترکیب حاصل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد

1- DPPH Radical Scavenging Activity
2- Cholesterol,1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
3- Spectrophotometry
4- Ferric Reducing Activity Power

(وزنی- حجمی) به آن اضافه شد. در ادامه ترکیب حاصل با دور g×۱۶۵۰ به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت به ۲/۵ میلی‌لیتر از فاز بالایی، ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر کلرید آهن (III) ۰/۱ درصد اضافه شد. سپس این محلول در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نگهداری شد تا ایجاد رنگ در آن صورت گیرد. میزان جذب محلول نهایی در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه گیری شد (Chew et al., 2008).

اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال ABTS[1]

ظرفیت مهار رادیکال آزاد ABTS با روش Aleman و همکاران (۲۰۱۱) انجام گرفت. در ابتدا محلول استوک رادیکال ABTS (ABTS ۷ میلی‌مولار در محلول پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار) تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق در مکان تاریک نگهداری شد. سپس حجمی از محلول استوک تهیه شده با آب مقطر رقیق شده ترکیب شد تا محلول مورد نظر برای انجام آزمایش به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در ۷۳۴ نانومتر برسد. در ادامه ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر واکنش‌گر ABTS مخلوط شد و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد در مکان تاریک نگهداری شد. سپس جذب آن با الایزاریدر (Epoch، BioTek، آمریکا) در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد و داده‌ها به شکل درصد بازدارندگی بر اساس غلظت بیان شدند. قدرت مهارکنندگی نیز با استفاده از رابطه ۲ محاسبه شد.

رابطه ۲:

$$R_{ABTS} = [(A_S - A_C)/A_C] \times 100$$

R_{ABTS}: قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS؛ A_S: میزان جذب نمونه مورد آزمایش؛ AC: میزان جذب شاهد.

فعالیت شلاته‌کردن یون آهن (II)

فعالیت شلاته کردن یون آهن (II) بر اساس روش اصلاح شده Dinis و همکاران (۱۹۹۴) سنجش شد. بدین منظور ۱ میلی‌لیتر نمونه با ۰/۱ میلی‌لیتر کلراید آهن (II) ۲ میلی‌مولار مخلوط شد. سپس ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار به مخلوط تهیه شده اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در مکان تاریک نگه‌داری شد. سپس جذب آن در طول موج ۵۶۲ نانومتر خوانده شد. فعالیت شلاته کردن یون آهن با رابطه ۳ سنجش شد.

1- 22'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

رابطه ۳:

$$C_{Fe} = [(A_S-A_C)/A_C] \times 100$$

C_{Fe}: فعالیت شلاته کنندگی یون آهن؛ A_S: میزان جذب نمونه مورد آزمایش؛ AC: میزان جذب شاهد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل[1]

ابتدا ۰/۱ میلی‌لیتر نمونه با ۳۰۰ میکرولیتر واکنش‌گر (اسیدسولفوریک ۰/۶ مولار، فسفات سدیم ۲۸ میلی‌مولار، مولیبدات آمونیوم ۴ میلی‌مولار با نسبت ۱:۱:۱) مخلوط شد و سپس به مدت ۹۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از سرد شدن، جذب نمونه‌ها در طول موج ۶۹۵ نانومتر خوانده شد (Hathwar et al., 2011).

تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۱۶) انجام گرفت. پس از اطمینان از نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون کولموگروف- اسمیرنف، از آزمون واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. همچنین برای تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح $P\leq ۰/۰۵$ استفاده شد.

نتایج

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

میزان مهار رادیکال آزاد DPPH در شکل ۲ آورده شده است. بیشترین مقدار مهار رادیکال آزاد ۶۸/۴۹ درصد و کمترین مقدار ۳۰/۴۲ درصد بود.

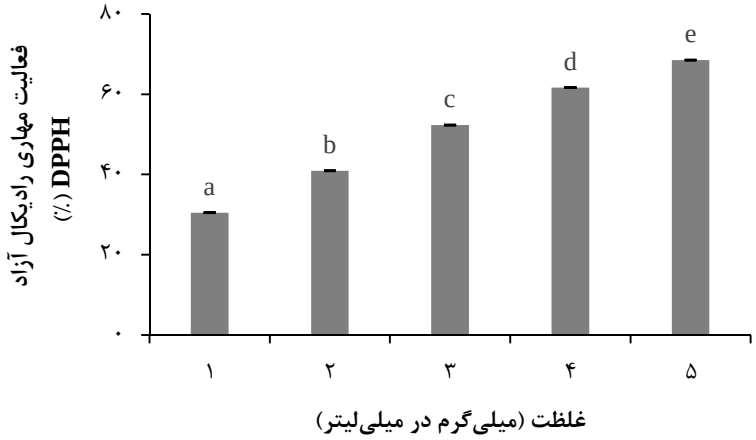
فعالیت مهار رادیکال ABTS

فعالیت مهار رادیکال ABTS پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا در شکل ۳ آورده شده است. بیشترین مقدار مهار رادیکال آزاد ۸۵/۳۲ درصد و کمترین مقدار ۴۴/۵۹ درصد بود.

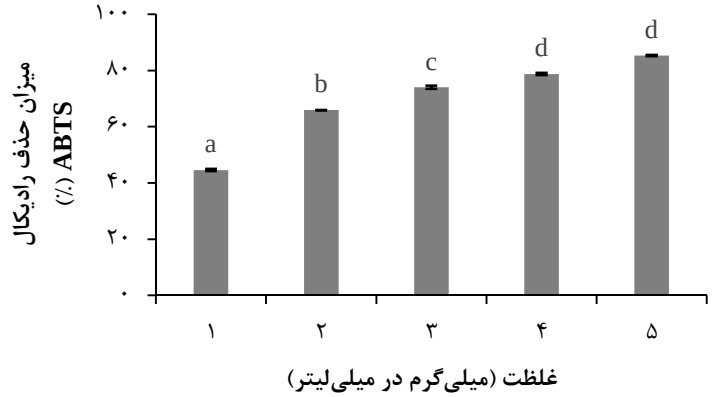
فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (Π)

فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (Π) در شکل ۴ آورده شده است. بیشترین میزان شلاته کردن یون آهن (Π(۳۷/۷۵ درصد و کمترین مقدار ۱۰/۷۷ درصد بود.

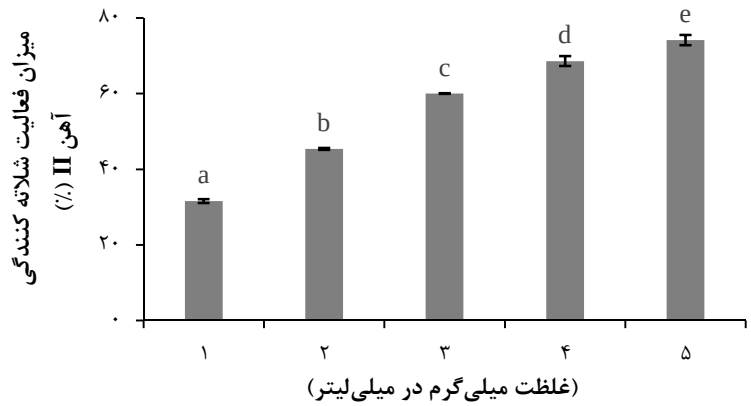
1- Total Antioxidant Activity



شکل ۲: میزان حدف رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (میانگین ± انحراف معیار). حروف کوچک غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۳: میزان مهار رادیکال آزاد ABTS پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (میانگین ± انحراف معیار). حروف کوچک غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



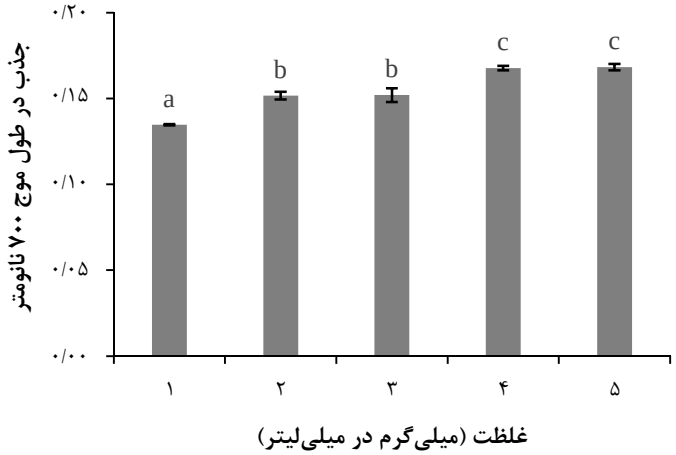
شکل ۴: میزان شلاته‌کردن یون آهن (II) پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (میانگین ± انحراف معیار). حروف کوچک غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

تعیین قدرت کاهندگی آهن III

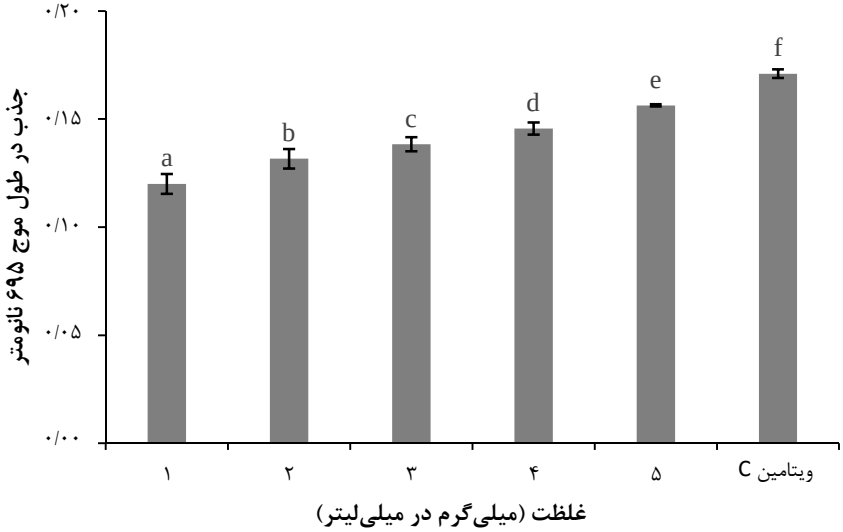
میزان قدرت کاهندگی آهن III پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی در شکل ۵ آورده شده است. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود قدرت کاهندگی آهن در غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر حدود ۰/۱۳۴۶ و در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حدود ۰/۱۶۸۳ قدرت کاهندگی است.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل

فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی در شکل ۶ آورده شده است. همان طور که مشاهده می‌شود مطابق آزمایش‌های قبلی کمترین و بیشترین جذب به ترتیب مربوط به غلظت‌های ۱ و ۵ است.



شکل ۵: میزان قدرت کاهندگی آهن (III) پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (میانگین ± انحراف معیار). حروف کوچک غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).



شکل ۶: میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی(میانگین ± انحراف معیار). حروف کوچک غیرمشترک نشان دهنده اختلاف معنی‌دار بین تیمارها است (P<۰/۰۵).

بحث

مطالعات متعددی روی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی انجام شده است (Je et al., 2007). DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر نشان می‌دهد. هنگامی که رادیکال DPPH در معرض یک ماده الکترون دهنده مانند آنتی‌اکسیدان قرار می‌گیرد، با پذیرش اتم هیدروژن منجر به مهار رادیکال DPPH و کاهش جذب می‌شود، بنابراین میزان جذب پایین‌تر نشان از مهار بیشتر رادیکال آزاد است (Mishra et al., 2012). همان طور که از نتایج پیدا است پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی در غلظت‌های متفاوت به عنوان یک دهنده مناسب الکترونی عمل کرده که می‌تواند با رادیکال آزاد DPPH وارد واکنش شود و به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال‌های آزاد پایان دهد. این نتیجه با نتایج Ovissipourو همکاران در سال ۲۰۱۲ که اثر خودهضمی و هیدرولیز توسط پروتئازهای تجاری را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین ماهی کیلکا (*Clupeonella engrauliformis*) مورد بررسی قرار دادند، مطابق بود و با توجه به نتایج به دست آمده توسط این پژوهشگران، پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی بود.

با توجه به شکل ۲ در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده، میزان مهار رادیکال DPPH در بالاترین مقدار ممکن (۶۸/۵ درصد) بود. در این رابطه Foh و همکاران در سال ۲۰۱۰، که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) را مورد بررسی قرار داده بودند، گزارش کردند که بیشترین مقدار مهار رادیکال DPPH (۸۶/۶۷ درصد) در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به نمونه هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بود، بنابراین نتایج حاصل از مطالعه آن‌ها با نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر همخوانی داشت.

آزمون ABTS یک روش عالی برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های دهنده هیدروژن (مهار رادیکال‌های فاز آبی) و شکستن زنجیره آنتی‌اکسیدان‌ها (مهار رادیکال‌های پروکسیل چربی) است (Leong and Shui, 2002). با توجه به شکل ۳، با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکا تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، درصد مهار رادیکال ABTS افزایش نشان داد. به طور کلی، پروتئین‌های هیدرولیز شده محلول در آب

می‌توانند با رادیکال‌های آزاد به منظور تبدیل آن‌ها به محصولات پایدارتر واکنش دهند. در نتیجه، از طریق شکستن یک واکنش زنجیره‌ای از اکسیداسیون چربی جلوگیری می‌کند (Ovissipour et al., 2012). همچنین، نتایج مطالعات Chai و همکاران در سال ۲۰۱۵ گویای موضوع ذکر شده بود. در این رابطه Mosquera و همکاران (۲۰۱۴) بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده مربوط به محتوای اسیدهای آمینه آب‌گریز آن‌ها است که باعث افزایش حلالیت آن‌ها در چربی‌ها شده، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را بهبود می‌بخشد.

یون آهن فرو (II) گونه کلیدی فعال و مسئول تشکیل اکسیدان‌ها در سلول‌ها است که منجر به افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Huang et al., 2002). شلاته کردن یون فلزی به وسیله پپتیدها در پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند مانع از تشکیل اکسیدان‌ها شود و سطح اکسیداسیون لیپید را کاهش دهد. احتمالا گروه‌های کربوکسیل و آمین در زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه ضروری نقش مهمی را در شلاته کردن یون‌های فلزی از جمله یون آهن فرو ایفا می‌کنند (Saiga et al., 2003).

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده به دست آمده از ماهی کیلکا توانایی شلاته کردن یون فلزی را دارد. با توجه به نتایج با افزایش غلظت پروتئین، فعالیت شلاته کردن یون آهن فرو افزایش می‌یابد، به طوری که با توجه به شکل ۴ در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر بیشترین مقدار شلاته کنندگی (۳۷/۷۵) و در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر کمترین مقدار شلاته کنندگی (۱۰/۷۷) مشاهده شد. که این نتیجه با نتایج Foh و همکاران در سال ۲۰۱۰ که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) را مورد بررسی قرار دادند مطابق بود. همین طور نتایج مطالعه حاضر با نتایج Dey و Dora در سال ۲۰۱۱ که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولید شده به وسیله هیدرولیز آلکالاز از ضایعات میگو (*Penaeus monodon* و *Penaeus indicus*) را مورد بررسی قرار دادند مطابق بود.

بررسی قدرت کاهندگی آهن III روش دیگری است که برای بررسی توانایی یک آنتی‌اکسیدان برای اهدای الکترون انجام می‌شود و مکانیسمی است که برای پایداری رادیکال‌های آزاد توسط پروتئین هیدرولیز شده استفاده می‌شود (Kumar et al., 2011). در

واقع قدرت کاهندگی آهن III به منظور سنجش توانایی ترکیبات در کاهش آهن (III) به آهن (II) بر اساس واکنش اکسید و احیا، مورد بررسی قرار می‌گیرد (Khiari, 2010). در این روش رنگ زرد محلول واکنش به رنگ‌های مختلف (بین طیف سبز و آبی) وابسته به قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده تغییر می‌کند.

با توجه به شکل ۵، تفاوت معنی‌داری بین غلظت ۴ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر دیده نمی‌شد (P>۰/۰۵). در واقع با افزایش میزان غلظت پروتئین هیدرولیز شده در درجه هیدرولیز یکسان (۲۱/۷۹ درصد) قدرت کاهندگی افزایش نشان داد که با یافته‌های Dey و Dora در سال ۲۰۱۱ که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تولید شده به وسیله هیدرولیز آلکالاز از ضایعات میگو (*Penaeus monodon* و *Penaeus indicus*) را مورد بررسی قرار دادند، مطابق بود. نتایج آن‌ها نشان داد که ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در نمونه آزمایشگاهی قادر به افزایش قدرت کاهندگی بیشتری در غلظت‌های بالاتر بودند (Dey and Dora, 2011). احتمالا، پروتئین هیدرولیز شده قدرت کاهندگی بالا را با اهدای الکترون به رادیکال آزاد که منجر به ممانعت از انجام واکنش می‌شود، نشان می‌دهد. نتایج Suetsuna (۲۰۰۰) نیز این موضوع را تایید می‌کند.

اساس کار بررسی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی کل، احیا مولیبدن ۶ ظرفیتی به مولیبدن ۵ ظرفیتی در محیط اسیدی و دمای بالا است. این واکنش با تشکیل کمپلکس‌های سبز رنگ فسفومولیبدن همراه است که در طول موج ۶۹۵ نانومتر حداکثر میزان جذب را دارد. نمونه‌هایی که شدت جذب بالاتری در این طول موج دارند، ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری از خود نشان می‌دهند (Prieto et al., 1999). ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده احتمالا به دلیل پپتیدها و اسیدهای آمینه حاصل از هیدرولیز آنزیمی باشد. این نتیجه با نتایج Hathwar و همکاران در سال ۲۰۱۱ که بازیافت همزمان چربی و پروتئین به وسیله هیدرولیز آنزیمی ضایعات صنعتی ماهی با استفاده از پروتئازهای مختلف تجاری را مورد بررسی قرار داده بودند، مشابه بود.

پپتیدهای مشتق شده از پروتئین‌های ماهی توانایی اعمال فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قوی را در سیستم‌های مختلف اکسیداتیو نشان می‌دهند (Mendis et al., 2005). در حال حاضر، توجه فراوانی به کشف مواد آنتی‌اکسیدانی طبیعی بدون عوارض جانبی به

منظور توسعه آنتی‌اکسیدان‌های ایمن برای جلوگیری از بروز عوارض ناشی از اکسیداسیون مولکول‌های زیستی معطوف شده است (Je et al., 2007).

آنتی‌اکسیدان‌ها می‌توانند با مکانیسم مهار رادیکال آزاد از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند، از طرفی پروتئین هیدرولیز شده مشتق شده از ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز، ممکن است به طور بالقوه به عنوان یک منبع خوبی از پروتئین با خواص کارکردی مناسب از جمله خاصیت آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد. همان طور که از نتایج پیدا است با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده، حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، قدرت کاهندگی آهن III، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کل و همچنین فعالیت شلاته کردن افزایش یافت ($P>0/05$) که با نتایج مطالعات Ovissipour و همکاران (۲۰۱۲) و Zamani و همکاران (۲۰۱۶) منطبق بود. با توجه به مطالعات انجام شده، معمولا ضایعات آبزیان و ماهیان کم ارزش به صورت روغن ماهی، کود و کمپوست، پودر ماهی، فرآورده سیلاژ و غذا برای حیوانات خانگی استفاده می‌شوند. بسیاری از این محصولات بازیافت شده دارای ارزش اقتصادی کمی هستند، در حالی که با تولید ترکیبات زیست‌فعال از آن‌ها ارزش افزوده بیشتری به دست می‌آید.

منابع

مطلبی ع. و پرافکنده ف. ۱۳۸۸. وضعیت ذخایرماهیان کیلکا در دریای خزر. موسسه تحقیقات شیلات ایران. ۳۲ص.

Aleman A., Gimenez B., Perez-Santin E., Gomez-Guillen M. and Montero P. 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. Food Chemistry, 125(2): 334–341.

Brand-Williams W., Cuvelier M. and Berset C. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT- Food Science and Technology, 28(1): 25–30.

Cencic A. and Chingwaru W. 2010. The role of functional foods, nutraceuticals, and food supplements in intestinal health. Nutrients, 2(6): 611–625.

Chai T.T., Tong S.R., Law Y.C., Ismail N.I.N. and Wong F.C. 2015. Anti-oxidative, metal chelating and radical scavenging effects of protein hydrolysates from blue-spotted stingray. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 14(8): 1349–1355.

Chew Y.L., Omar M. and Khoo K.S. 2008. Antioxidant activity of three edible seaweeds from two areas in South East Asia. LWT- Food Science and Technology, 41(6): 1067–1072.

Dey S.S. and Dora K.C. 2011. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). Journal of Food Science and Technology, 51(3): 449–457.

Dinis T.C.P., Maderia V.C.M. and Almeida M.L.M. 1994. Action of phenolic derivates as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archives of Biochemistry and Biophysics, 315: 161–169.

Dong S.Y., Liu Z.Y., Zeng M.Y., Zhao Y.H., Guo Y.H. and Wang D.F. 2008. Functional characterization of protein hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) meat by two kinds of proteases. Food Science, 29(12): 94–98.

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(4): 1851–1869.

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.

Hathwar S.C., Bijinu B., Rai A.K. and Narayan B. 2011. simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. Applied Biochemistry and Biotechnology, 164(1): 115–124.

Huang X., Dai J., Fournier J., Ali A.M., Zhang Q. and Frenkel K. 2002. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. Free Radical Biology and Medicine, 32(1): 84–92.

Je J.Y., Qian Z.J., Byun H.G. and Kim S.K. 2007. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42: 840–846.

Jo H.Y., Jung W.K. and Kim S.K. 2008. Purification and characterization of a novel anticoagulant peptide from marine echiuroid worm, *Urechis unicinctus*. Process Biochemistry, 43(2): 179–184.

Khiari Z. 2010. Functional and bioactive components from mackerel (*Scomber scombrus*) and blue whiting (*Micromesistius poutassou*) processing waste. Ph.D. Thesis, Dublin Institute of Technology, Ireland. 323P.

Khora S.S. 2013. Therapeutic benefits of ω-3 fatty acids from fish. International Journal of Drug Development and Research, 5(2): 55–65.

Khoshkhoo Z., Motalebi A., Khanipour A.A., Firozjaee H.K. and Mahdabi M.N.M. 2010. Study on changes of protein and lipid of fish protein concentrate (FPC) produced form kilkas in VP and MAP packages at light and darkness condition during six months. International Journal of Environmental Science and Development, 1(1): 101–106.

Ko J.Y., Lee J.H., Samarakoon K., Kim J.S. and Jeon Y.J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology, 52: 113–120.

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.

Leong L.P. and Shui G. 2000. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore

markets. Food Chemistry, 76(1): 69–75.

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

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.

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.

Mishra K., Ojha H. and Chaudhury N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry, 130(4): 1036–1043.

Mohammadi A., Jafari S.M., Esfanjani A.F. and Akhavan S. 2016. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. Food Chemistry, 190: 513–519.

Mosquera M., Gimenez B., da Silva I.M., Boelter J.F., Montero P., Gomez-Guillen M.C. and Brandelli A. 2014. Nano-encapsulation of an active peptidic fraction from sea bream scales collagen. Food Chemistry, 156(2): 144–150.

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. 2012. 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.

Prieto P., Pineda M. and Aguilar M. 1999. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. Analytical Biochemistry, 269(2): 337–341.

Raghavan S. and Kristinsson H.G. 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates, Food Chemistry, 117(4): 582–588.

Saiga A., Tanabe S. and Nishimura T. 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(12): 3661–3667.

Salampess J., Phillips M., Seneweera S. and Kailasapathy K. 2010. Release of antimicrobial peptides through bromelain hydrolysis of leatherjacket (*Meuchenia* sp.) insoluble proteins. Food Chemistry, 120(2): 556–560.

Shahidi F., Han X.Q. and Synowiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chemistry, 53(3): 285–293.

Sharma N., Singh N.K., Singh O.P., Pandey V. and Verma P.K. 2011. Oxidative stress and antioxidant status during transition period in dairy cows. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences, 24(4): 479–484.

Skouta R., Dixon S.J., Wang J., Dunn D.E., Orman M., Shimada K., Rosenberg P.A., Lo D.C., Weinberg J.M. and Linkermann A. 2014. Ferrostatins inhibit oxidative lipid damage and cell death in diverse disease models. Journal of the American Chemical Society, 136(12): 4551–4556.

Suetsuna K. 2000. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. Marine Biotechnology, 2(1): 5–10.

Thiansilakul Y., Benjakul S. and Shahidi F. 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. Journal of Food Biochemistry, 31(2): 266–287.

Zamani A., Madani R. and Rezaei M. 2016. Antioxidative activity of protein hydrolysate from the muscle of common Kilka (*Clupeonella cultriventris caspia*) prepared using the purified trypsin from common Kilka intestine. Journal of Aquatic Food Product Technology, 26 (1): 2–16.

Zarenejad F. and Peighambardoust S. 2014. Effect of stabilization on functional components and fatty acid profile of wheat germ. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology, 8(4): 93–100.

Aquatic Physiology and Biotechnology
Vol. 5, No. 3, Autumn 2017

Production of hydrolyzed protein from Kilka by enzymatic hydrolysis and evaluation of its bioactive properties

Zahra Nahvi[1], Seyed Fakhreddin Hosseini[2]*, Mojgan Zandi[3]

Received: December 2016 Accepted: March 2017

Abstract

In the present study, fish protein hydrolysates (FPH) prepared by hydrolysis of common Kilka (*Clupeonella cultriventris*) using the Alcalase enzyme. The antioxidant activity of FPH was evaluated by DPPH and ABTS radical scavenging abilities, reducing power assay, ferrous ion-chelating and total antioxidant activity tests in five different concentrations (1, 2, 3, 4 and 5 mg/mL). The results indicated that with increasing concentration (5 mg/mL), the antioxidant properties of FPH were significantly increased. The highest DPPH radical scavenging activity, ferrous ion-chelating, ferric reducing antioxidant power and total antioxidant activity was related to the concentration of 5 mg/mL. In conclusion, Kilka fish enzymatic hydrolysis leads to the hydrolysate production with antioxidant properties and can be used as food additives after confirming by clinical studies.

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

1- M.Sc. in Seafood Processing, Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
2- Assistant Professor in Department of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor, Iran.
3- Associate Professor in Department of Biomaterials, Iran Polymer and Petrochemical Institute, Tehran, Iran.
*Corresponding Author: hosseinisf@modares.ac.ir