بررسی رفتار ضد اکسایشی پپتیدهای زیست فعال تهیه شده از فرآورده های جانبی صنایع گوشت

نسیم مشگین فر[۱*]، علیرضا صادقی ماهونک[۲]، امان محمد ضیایی فر[۳]، محمد قربانی[۲]، مهدی کاشانی نژاد[۲]

۱- دانش آموخته ی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه گرگان
۲- دانشیار گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه گرگان
۳- استادیار گروه علوم وصنایع غذایی دانشگاه گرگان

(تاریخ دریافت: ۹۲/۶/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۱۱/۸)

چکیده

در پژوهش حاضر پروتئین هیدرولیز شده، از امعاء و احشاء گوسفند (معده و روده) با به کارگیری آنزیم آلکالاز (2.4 L) تولید شد. اثر متغیرهای دما (۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (در شش سطح) و نسبت آنزیم به سوبسترا (۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون)، بر میزان درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی در قالب آزمون فاکتوریل بررسی شد. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در ۴۵ درجه سانتی‌گراد، زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه و میزان آنزیم ۹۰ واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا حاصل شد ($p< 0.05$). میزان درجه هیدرولیز تحت شرایط حاصل ۳۶/۹۲٪ بود. برای ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیاء کنندگی یون فریک و اثر پروتئین هیدرولیز شده بر پایداری روغن سویا اندازه‌گیری شد.آزمون‌های اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی در دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد انجام شدند. بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاء کنندگی یون فریک به ترتیب در زمان های ۱۵۰ و ۱۸۰ دقیقه و میزان آنزیم ۹۰ واحد آنسون به دست آمد ($P< 0.05$). نتایج نشان می دهد که پروتئین هیدرولیز شده‌ی امعاء و احشاء گوسفند می‌تواند به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی، جایگزین مناسبی برای آنتی اکسیدان‌های سنتزی قلمداد گردد.

کلید واژگان: امعاء و احشاء گوسفند، پپتیدهای آنتی‌اکسیدان، پروتئین هیدرولیز شده، هیدرولیز آنزیمی.

* مسئول مکاتبات: nasimmeshginfar@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

۱- مقدمه

امعاء و احشاء مواد مازادی هستند که از ذبح دام حاصل می‌شوند. این مواد شامل اندام های درونی بدن به ویژه اعضاء دستگاه گوارش (مانند معده و روده) می‌باشند. ترکیباتی مانند روده، چنانچه بلافاصله پس از کشتار روزانه به قسمت تصفیه و پالایش جهت استفاده در کارخانه‌های تبدیل کننده، انتقال نیابد و یا در صورت عدم مصرف در محل‌های ویژه دفع نشود، بستر مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها و باکتری‌های مختلف می‌باشد. همچنین عدم استفاده مناسب از این ترکیبات از نظر اقتصادی برای کشتارگاه به صرفه نمی‌باشد. میزان امعاء واحشاء حاصل از ذبح دام ۶ تا ۷ درصد معدل وزنی لاشه را در بر می‌گیرد. به عبارت دیگر چنانچه میانگین متوسط وزن لاشه هر گوسفند ۳۲ کیلوگرم باشد ۲/۰۸ کیلوگرم ضایعات قابل تبدیل وجود خواهد داشت [۱]. شاید بتوان گفت که بهترین راه برای تولید محصولاتی با ارزش افزوده‌ی بالا از این منابع پروتئینی، کابرد آنزیم‌های پروتئاز به منظور تولید پروتئین های هیدرولیز شده باشد [۲].پروتئین‌های هیدرولیز شده ترکیباتی هستند با وزن مولکولی پائین که تحت عنوان پپتیدهای زیست فعال شناخته می‌شوند. این ترکیبات پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند. از مهمترین عملکردهای این ترکیبات زیست فعال می‌توان به فعالیت‌های ضد اکسایش، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده‌ی سیستم ایمنی بدن اشاره کرد. ویژگی آنتی اکسیدانی این ترکیبات، هم در شرایط درون زیستی و هم به صورت برون زیستی قابل توجه است [۳]. ضرورت استفاده از آنتی اکسیدان های طبیعی، با توجه به نگرانی‌هایی که امروزه در مورد استفاده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد یکی دیگر از مزایای تولید این ترکیبات به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی می‌باشد. با این وجود مکانیسم دقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها به درستی مشخص نیست، بر طبق نتایج تحقیقات مختلف این ترکیبات به صورت موثر از اکسیداسیون چربی‌ها و روغن‌ها جلوگیری می‌کنند و فعالیت ویژه‌ای در مهار رادیکال‌های آزاد و یون‌های فلزی از خود نشان می‌دهند [۳]. فعالیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات به طور ویژه تحت تاثیر ترکیب آمینواسیدهای تشکیل دهنده، موقعیت مکانی اسیدهای آمینه در ساختار پپتید، شکل و ساختمان ویژه‌ی پپتیدها، شرایط واکنش، نوع پروتئاز مورد استفاده و میزان درجه‌ی‌هیدرولیز قرار دارد [۴]. تاکنون مطالعات زیادی در رابطه با تولید پروتئین هیدرولیز شده از منابع پروتئینی حیوانی مختلف و بررسی تاثیر شرایط واکنش بر ویژگی و بازدهی این محصولات صورت گرفته است [۵، ۶ و۷]. همچنین تحقیقاتی در رابطه با بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و خواص سلامتی بخش پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از منابع پروتئین حیوانی انجام شده، که نتایج آن‌ها به صورت کلی حاکی از وجود فعالیت آنتی اکسیدانی مناسب در تمامی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد و از عوامل مهم و تاثیرگذار بر عملکرد آنتی اکسیدانی این ترکیبات به شرایط انجام واکنش و میزان پیشرفت واکنش اشاره شده است [۸، ۹].در حال حاضر پروتئین هیدرولیز شده به دلیل داشتن ویژگی‌های مطلوبی به عنوان ترکیب اصلی فرمولاسیون‌های خاص غذایی و داروئی مورد استفاده قرار می‌گیرد، با این وجود این محصول، پتانسیل انجام تحقیقات تکنولوژیکی و تغذیه‌ای زیادی را دارا می‌باشد [۱۰]. با توجه به مطالب بیان شده، این تحقیق با هدف تولید محصول غذایی غنی از پروتئین با ارزش تغذیه‌ای بالا، با استفاده از فرایند هیدرولیز آنزیمی و بررسی اثر شرایط تولید (دما، زمان و میزان آنزیم) بر خصوصیات محصول (میزان درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی)، انجام شده است.

۲- مواد و روش ها

جهت هیدرولیز آنزیمی پروتئین ازمعده و روده‌ی گوسفند به عنوان ماده‌ی اولیه استفاده شد. بدین منظور این مواد از کشتارگاه (جلین واقع درحوالی گرگان) تهیه، و پس از شستشوی کامل توسط آب پرفشار به آزمایشگاه تجزیه مواد غذای یگروه صنایع غذایی دانشگاه گرگان، منتقل،و تا شروع آزمایش درفریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای فرایند هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم آلکالاز (2.L4)۱ با منشاء میکروبی استفاده شد. این آنزیم از شرکت نووزایمز (دانمارک) خریداری و تا شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شد.

۲-۱- تهیه ی پروتئین هیدرولیز شده

به منظور تهیه پروتئین هیدرولیز شده، نمونه‌های روده و معده‌ی منجمد شده پس از یخ‌زدایی در قطعات کوچک بریده و

1. 2/4 (Anson unit)/ml enzyme

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

توسط چرخ گوشت خانگی به صورت کامل چرخ شدند و پس از آن، این مواد تحت فرایند چربی گیری قرار گرفتند، بر طبق نتایج برخی از تحقیقات انجام شده در مورد کاهش محتوی چربی ماده اولیه جهت تهیه پروتئین هیدرولیز شده، مشخص شد که فعالیت آنتی اکسیدانی این ترکیبات هیدرولیز شده پس از چربی‌گیری افزایش می‌یابد [۱۰]. جهت فرایند چربی‌گیری، مخلوط چرخ شده ماده اولیه بلافاصله در ظروف مخصوص به اتوکلاو منتقل شد و در دمای ۱۲۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه استریل گشت. مخلوط استریل شده پس از سرد شدن در دمای محیط توسط مخلوط‌کن تا حد امکان همگن گردید و سپس در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه در دستگاه سانتریفیوژ یخچال دار با دور g ۶۰۰۰، تحت نیروی گریز از مرکز قرار گرفت. پس از سانتریفیوژ، مواد به سه فاز تقسیم شدند که فاز بالایی را چربی، فاز میانی را آب و فاز انتهایی را پروتئین رسوب کرده و غنی شده تشکیل می‌داد، محتوی پروتئین جهت آزمایش‌های بعدی جمع‌آوری شد [۵]. جهت انجام فرایند هیدرولیز تمامی واکنش‌ها در ارلن‌های ۱۰۰ میلی‌لیتر که حاوی ۲۰ گرم نمونه‌ی پروتئینی (پروتئین چربی گیری شده) به همراه بافر Tris-Hcl به نسبت ۱ به ۲ (ماده اولیه به بافر) بود، انجام شد [۱۱]. سپس آنزیم آلکالاز در pH ۸ که با کمک بافر تنظیم شد و مناسب برای فعالیت آنزیم بود به مخلوط ماده اولیه اضافه شد. همچنین استفاده از بافر به ثابت بودن pH در طی فرایند کمک کرد. واکنش‌های هیدرولیز در انکوباتور لرزشی با درجه تلاطم (۲۰۰rpm) در زمان‌های ۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰، ۲۱۰ دقیقه، مقادیر آنزیم ۳۰، ۶۰ و۹۰ واحد آنسون و در دماهای ۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ انجام شد. در انتها فعالیت آنزیم با اعمال دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه متوقف شد. دمای مخلوط با استفاده از حمام یخ کاهش یافت و سپس به مدت ۲۰ دقیقه و دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار با دور g ۶۷۰۰ برای جمع آوری مایع رویی سانتریفیوژ شد [۱۲].

۲-۲- تعیین درجه هیدرولیز

یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز می‌باشد که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می‌کند. درجه هیدرولیز بر اساس روش هویل و مریت (۱۹۹۴) تخمین زده شد [۱۳]. حجمی از محلول ۲۰٪ تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) تهیه گردید و به میزان مساوی به سوپرناتانت اضافه شد تا محلول TCA ۱۰٪ به دست آید و سپس به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد با دور g ۶۷ریفی۰۰ سانتوژ شد و مایع رویی جمع‌آوری گردید. جهت اندازه‌گیری میزان ازت در هر یک از مراحل، از روش کلدال استفاده شد. درجه هیدرولیز به صورت زیر محاسبه گردید:

درجه هیدرولیز=٪ $\frac{\text{نیتروژن محلول در TCA (10%)}}{\text{نیتروژن کل در نمونه هیدرولیز شده}}$

۲-۳- سنجش فعالیت پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH

برای این منظور ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر نمونه‌ی محلول پروتئین هیدرولیز شده که در شرایط مختلف زمان و غلظت آنزیم تولید شده بودند، با ۱۰۰۰ میکرولیترDPPH(0.1Mm) تهیه شده در اتانول ۹۹/۵٪ در لوله‌ی آزمایش مخلوط شدند، مخلوط برای مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه داشته شد و در نهایت میزان احیای رادیکال DPPH توسط محلول پروتئین هیدرولیز شده در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری شد. لازم به ذکر است در نمونه کنترل به جای محلول پروتئین هیدرولیز شده از ۱۰۰۰ میکرولیتر اتانول استفاده شد [۱۴].

٪ مهار رادیکال آزاد = $\frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب کنترل})}{\text{جذب کنترل}}$

۲-۴- اندازه گیری قدرت احیاء کنندگی

برای این آزمایش، میزان یک میلی لیتر از هر تیمار محلول پروتئین هیدورلیز شده، به همراه ۲/۵ میلی لیتر از بافر فسفات (۰/۲M) در pH=۶/۶ و ۲/۵ میلی لیتر از فری سیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط گردید. این مخلوط در ۵۰ درجه سانتی‌گراد گرم و سپس ۲/۵ میلی لیتر از محلول TCA۱۰٪ (w/v) به آن اضافه شد. پس از آن به مدت ۱۰ دقیقه با دور g ۱۶۵۰ سانتریفیوژ شد و در نهایت ۲/۵ میلی لیتر از سوپر ناتانت با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر از محلول ۰/۱٪ (w/v) کلرید فریک مخلوط شد. بعد از ۱۰ دقیقه واکنش، جذب محلول حاصل در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

۷۰۰ نانومتر قرائت شد [۱۴]. افزایش جذب مخلوط واکنش بیانگر قدرت احیاء کنندگی آن خواهد بود در این آزمایش از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۲-۵- اندازه گیری اثر آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده برروی روغن سویا

بدین منظور، محلول پروتئین هیدرولیز شده در شرایط به دست آمده از نظر ایجاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسب، تهیه شد و سپس توسط دستگاه خشک کن انجمادی به پودر پروتئین هیدرولیز شده تبدیل گردید. جهت انجام این آزمایش نمونه‌های روغن شامل مخلوط روغن و پروتئین هیدرولیز شده ۱(HP) با غلظت‌های (ppm ۱۰۰،۲۰۰ و۵۰۰)، مخلوط روغن و آنتی اکسیدان سنتزی BHT با غلظت‌های (ppm ۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰) و نمونه‌ی روغن تصفیه شده بدون هیچ گونه افزودنی به عنوان شاهد، تهیه شدند، عمل اختلاط پودر پروتئین و روغن توسط همزن مغناطیسی و به مدت ۳۰ دقیقه انجام شد. پس از آن نمونه ها به مدت پانزده روز در دمای ثابت ۶۳ درجه سانتیگراد گرمخانه‌گذاری شدند. کلیه‌ی آزمون‌ها در روزهای سوم، ششم، نهم، دوازدهم و پانزدهم زمان گرمخانه گذاری برروی نمونه‌ها انجام شد [۱۵].

۲-۵-۱- تعیین عدد پراکسید

اندازه‌گیری این اندیس طبق استانداردAOCS, 53cd8,1997 انجام شد [۱۶]. میزان ۵ گرم نمونه‌ی روغن در داخل ارلن ۲۵۰ میلی لیتر به همراه ۳۰ میلی لیتر مخلوط اسید استیک- کلروفرم (۲:۳ حجمی-حجمی) مخلوط شد، سپس ۰/۵ میلی لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم به مخلوط اضافه شد و به مدت یک دقیقه در تاریکی قرار گرفت. پس از اضافه کردن ۳۰ میلی لیتر آب مقطر به مخلوط ذکر شده، مخلوط با استفاده از محلول تیوسولفات سدیم ۰/۰۱N تیتر شد. در نهایت با اضافه کردن ۰/۵ میلی لیتر محلول نشاسته ۱٪ به مخلوط، ادامه تیتر کردن را تا از بین رفتن رنگ ادامه یافت. اندیس پراکسید از فرمول زیر محاسبه شد.

$$PV = \frac{(V_2 - V_1) \times N \times 1000}{m}$$

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

این مطالعه با استفاده از طرح کاملا تصادفی در قالب آزمایش فاکتوریل و بررسی اثر متغیرهای دما (در سطوح ۴۰، ۴۵، ۵۰ و۵۵ درجه سانتی‌گراد)، زمان (در سطوح۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و۲۱۰ دقیقه) و میزان آنزیم (در سطوح۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون) و در سه تکرار انجام شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ صورت گرفت. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS و رسم نمودارها با نرم افزار Excell انجام گردید.

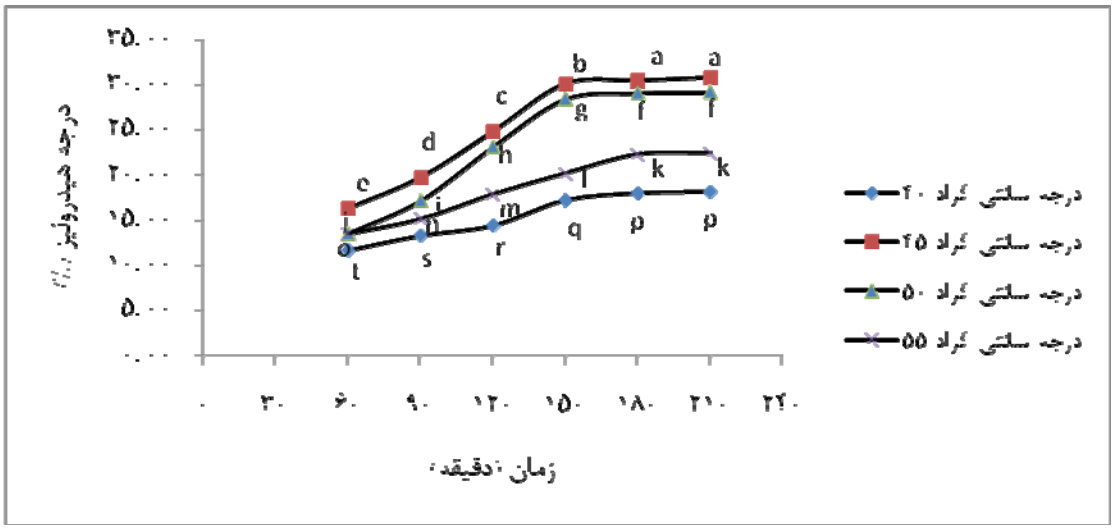
۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی میزان پیشرفت هیدرولیز

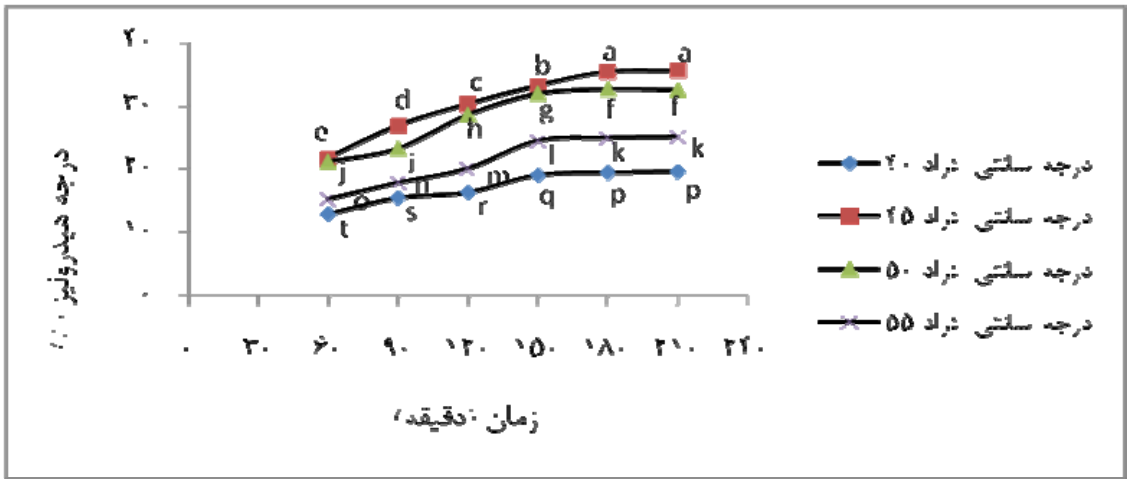
کنترل میزان پیشرفت هیدرولیز در طی فرآیند هیدرولیز مهم می‌باشد، چرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال‌پذیری، وزن مولکولی پپتیدهای حاصل و حتی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین تولید شده وابسته به شدت و میزان درجه هیدرولیز می‌باشد.اثر دما و زمان بر میزان درجه‌ی هیدرولیز در غلظت‌های آنزیمی مختلف در شکل‌های ۱، ۲ و ۳ نشان داده شده است. فاکتور زمان اثر معنی‌داری بر میزان درجه‌ی هیدرولیز داشت ($p<۰/۰۵$).به صورت کلی باافزایش زمان هیدرولیز، میزان درجه‌ی هیدرولیزافزایش یافت. بیشترین میزان درجه هیدرولیز در تمامی سطوح دما و میزان آنزیم، در زمان ۲۱۰ دقیقه حاصل شد، که در مقایسه بین تیمارها مشخص شد، درجه‌ی هیدرولیز در تیمارهای ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری (در سطح احتمال $p<۰/۰۵$) ندارد. کمترین میزان درجه هیدرولیز نیز در زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه به دست آمد. فاکتور دما نیز اثر معنی‌داری بر میزان درجه‌ی هیدرولیز داشت ($p<۰/۰۵$). اثر غلظت آنزیم نیز بر میزان درجه هیدرولیز معنی‌دار شد ($p<۰/۰۵$). افزایش میزان آنزیم باعث افزایش میزان درجه‌ی هیدرولیز شد. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان درجه هیدرولیز دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا) به دست آمد، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز به ۳۶/۹۲٪ رسید. طاهری و همکاران (۲۰۱۱) میزان درجه‌ی هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده‌ی ماهی ساردین را با استفاده از آنزیم آلکالاز، در شرایط بهینه در دمای ۴۵/۶۲ درجه‌ی سانتی‌گراد، ۳۵/۱۴٪ گزارش کردند [۱۷]. بیهاسکار و همکاران (۲۰۰۸) شرایط بهینه برای تولید پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء گوسفند را با استفاده از یک نوع پروتئاز قارچی دمای ۴۳ درجه‌ی سانتی‌گراد و زمان ۴۵ دقیقه گزارش کردند [۵].

1. Hydrolysate Protein

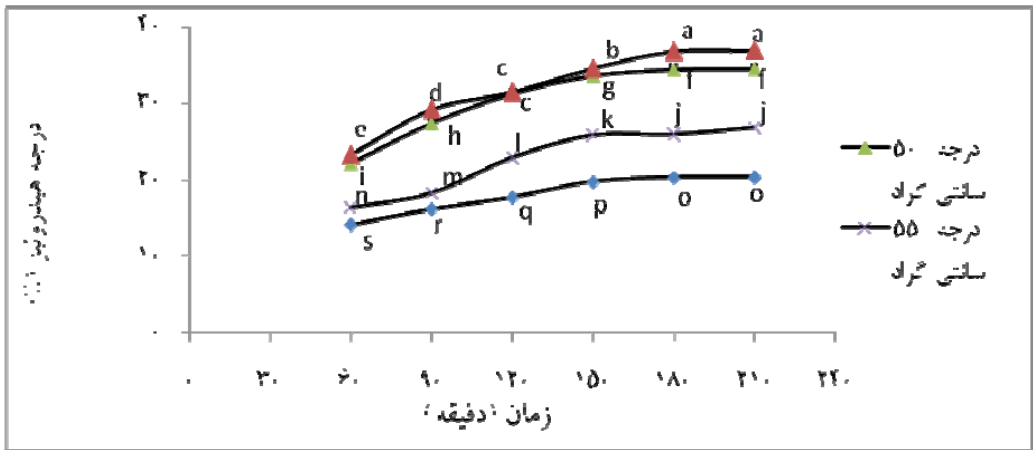
[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]



شکل ۱ اثر افزایش زمان و دما (در سطح آنزیمAU ۳۰) بر میزان درجه‌ی هیدرولیز. حروف مشابه بیانگر اختلاف غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است. اعداد مربوط به درجه‌ی هیدرولیز نشان دهنده‌ی میانگین‌ها هستند (n=3).



شکل ۲ اثر افزایش زمان و دما (در سطح آنزیم AU۶۰) بر میزان درجه‌ی هیدرولیز. حروف مشابه بیانگر اختلاف غیر معنی‌دار در سطح احتمال ۵٪ است. اعداد نشان دهنده‌ی میانگین‌ها هستند (n=3).

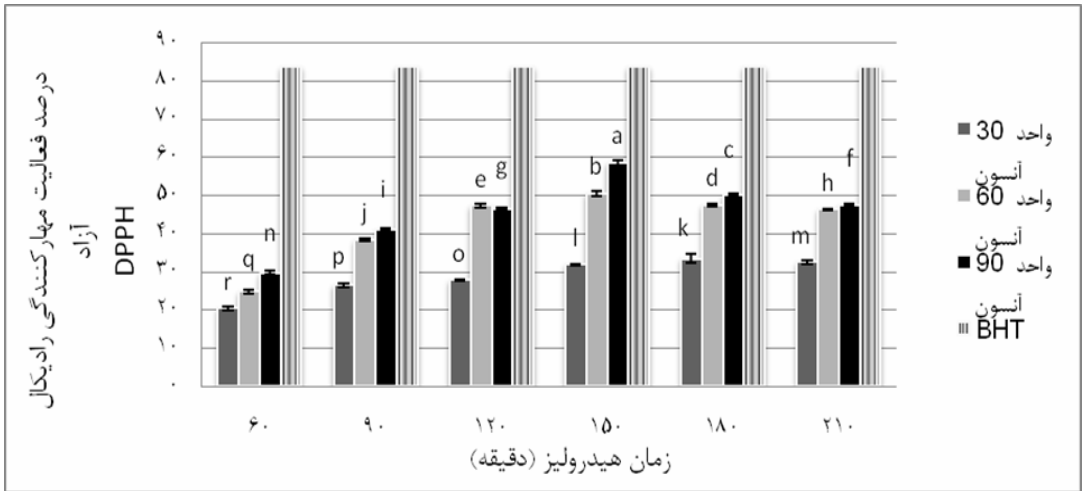


شکل ۳ اثر افزایش زمان و دما (در سطح آنزیمAU ۹۰) بر میزان درجه ی هیدرولیز. حروف مشابه بیانگر اختلاف غیر معنی دار در سطح احتمال ۵٪ است. اعداد مربوط به درجه‌ی هیدرولیز نشان دهنده ی میانگین ها هستند (n=3).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

۳-۲- فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH

واکنش های هیدرولیز برایاین آزمون در دمای ثابت ۴۵ درجه سانتی‌گراد (دمای بهینه‌ی حاصل شده جهت هیدرولیز و فعالیت آنزیم)، با سطوح متغیر زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم، انجام شد. نتایج این آزمایش نشان داد که تمامی تیمارهای پروتئین هیدرولیز شده قابلیت حذف رادیکال آزاد را دارا می باشند، ولی در تمامی آن ها فعالیت حذف رادیکال آزاد از مقدار محاسبه شده برای BHT (۲۰۰ ppm) با اختلاف معنی‌دار کمتر بود ($p<۰/۰۵$). کمترین میزان، در هر سه سطح آنزیم در تیمارهایی با زمان هیدرولیز ۶۰ دقیقه قرار داشت ($p<۰/۰۵$). دلیل این موضوع شاید فرصت کم برای دسترسی مناسب آنزیم به سوبسترا، جهت شکستن پیوندهای پپتیدی باشد.شکل ۴ نشان می‌دهد که فعالیت مهار رادیکال آزاد در اغلب تیمارها با رسیدن زمان هیدرولیز به حدود ۱۵۰ دقیقه، به حداکثر خود رسید و با ادامه‌ی افزایش زمان، از میزان آن کاسته شد. بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد در زمان هیدرولیز۱۵۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا) برابر با ۵۸/۵۱٪ بود ($p<۰/۰۵$). کاهش مقدار فعالیت مهارکنندگی توسط پروتئین هیدرولیز شده با زیاد شدن زمان هیدرولیز می‌تواند ناشی از، پیشرفت مقدار هیدرولیز و اثر بیشتر آنزیم بر ماده‌ی پروتئینی باشد که این موضوع باعث شکستن زنجیره‌ی برخی از پپتیدهای آنتی اکسیدان تشکیل شده در مراحل اولیه ی هیدرولیز و کاهش آن ها می شود [۱۸]

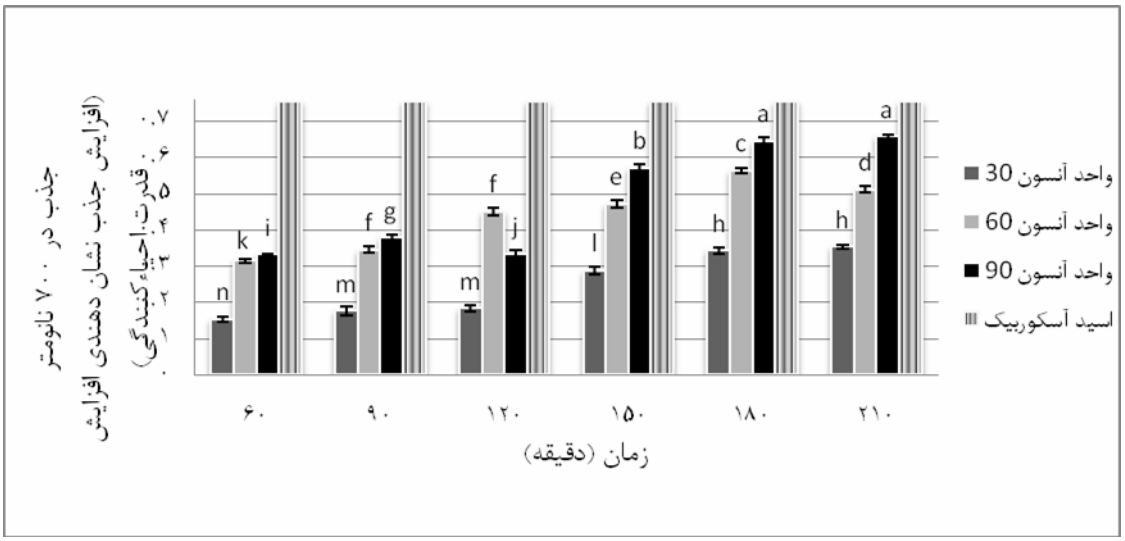


شکل۴ درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در زمان ها و سطوح آنزیمی مختلف. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد. اعداد مربوط به هر تیمار نشان دهندی میانگین‌ها هستند (n=3).

۳-۳- قدرت احیاء کنندگی یون فریک

واکنش هیدرولیز جهتسنجش قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده، در دمای ثابت ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد (با توجه به نتایج قبلی)، با سطوح متغیر زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم انجام شد. اسید آسکوربیک با غلظت ۲۰۰ PPM به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. بیشترین فعالیت احیاء کنندگی توسط پروتئین هیدرولیز شده در زمان ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا) به دست آمد. که دارای جذبی برابر با ۰/۶۴۷ بود، و اختلاف معنی‌داری با تیمار بعد از خود (زمان ۲۱۰ دقیقه)، (در سطح احتمال $p<۰/۰۵$) نداشت. همچنین نتایج نشان داد که در تمامی تیمارها، اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت، دارای بالاترین قدرت احیاء کنندگی بود. به صورت کلی قدرت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده با افزایش زمان هیدرولیز و میزان آنزیم افزایش یافت. همچنین می‌توان اینگونه بیان کرد که میزان فعالیت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده به صورت نسبی با افزایش میزان درجه هیدرولیز، افزایش یافت.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]



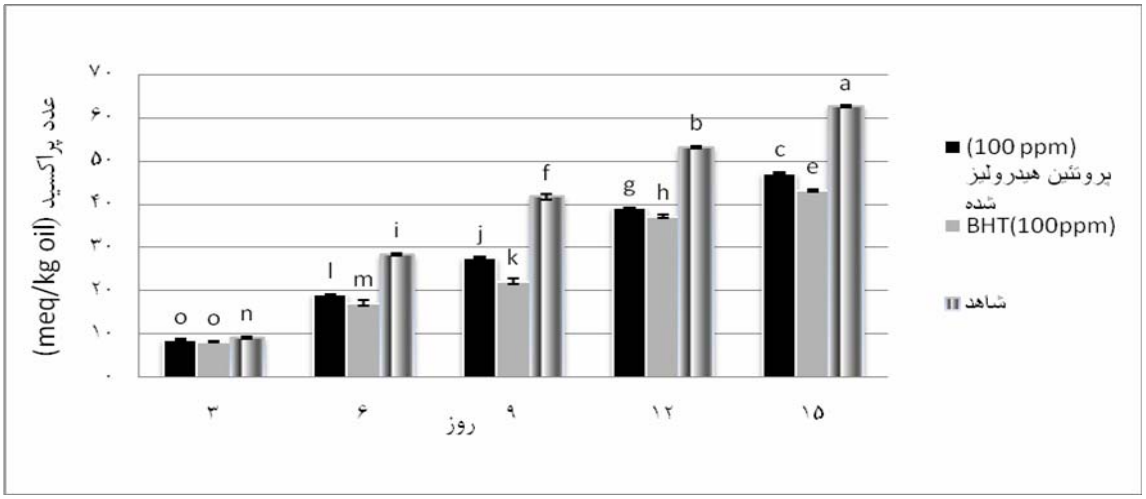
شکل۵ میزان فعالیت احیاء کنندگی پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌ها و سطوح آنزیمی مختلف. حروف غیر مشابه بیانگر اختلاف معنی دار می باشد اعداد مربوط به هر تیمار نشان دهنده‌ی میانگین‌ها هستند (n=3).

۳-۴- عدد پراکسید

هیدروپراکسیدها محصولات اولیه اکسایش خود به خود می‌باشند. به طور کلی هر اندازه که درجه غیر اشباعیت روغن‌ها بیشتر باشد روغن و یا ماده چرب آمادگی بیشتری برای اکسیداسیون دارد. وقتی که میزان پراکسید به حد معینی برسد تغییرات مختلفی صورت گرفته و مواد فرار آلدهیدی و کتونی ایجاد شده که در ایجاد بو و طعم مواد چرب موثر می باشند [۱۹].

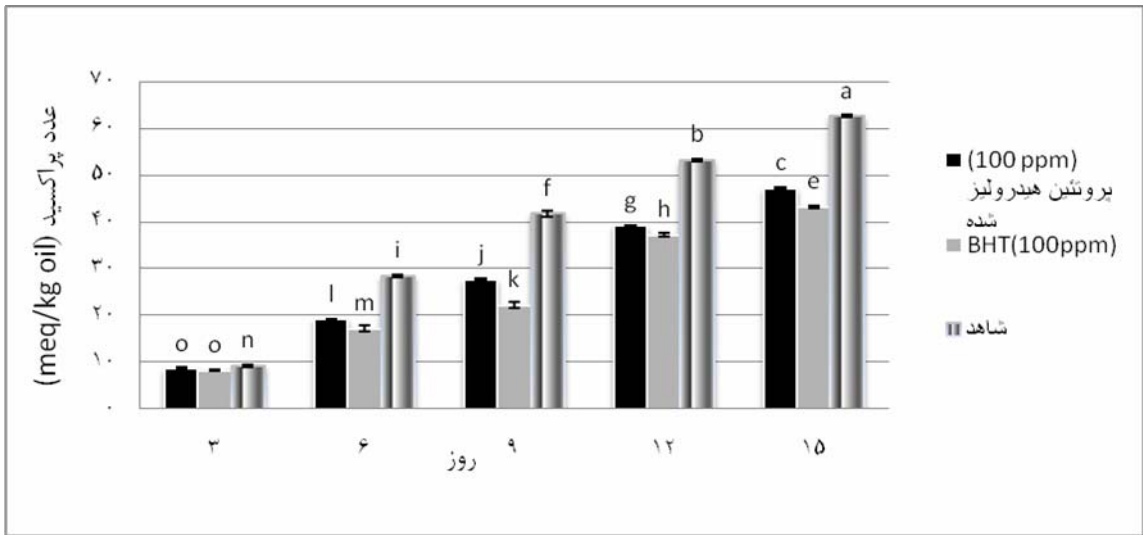
هیدروپراکسید می تواند ید موجود در پتاسیم یدید را آزاد کند، مقدار ید آزاد شده را می توان با سدیم تیوسولفات اندازه گرفت:

$$2\,ROOH + 2\,KI \rightarrow 2ROOK + I_2$$
$$I_2 + 2S_2O_3^{2-} \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2I^-$$

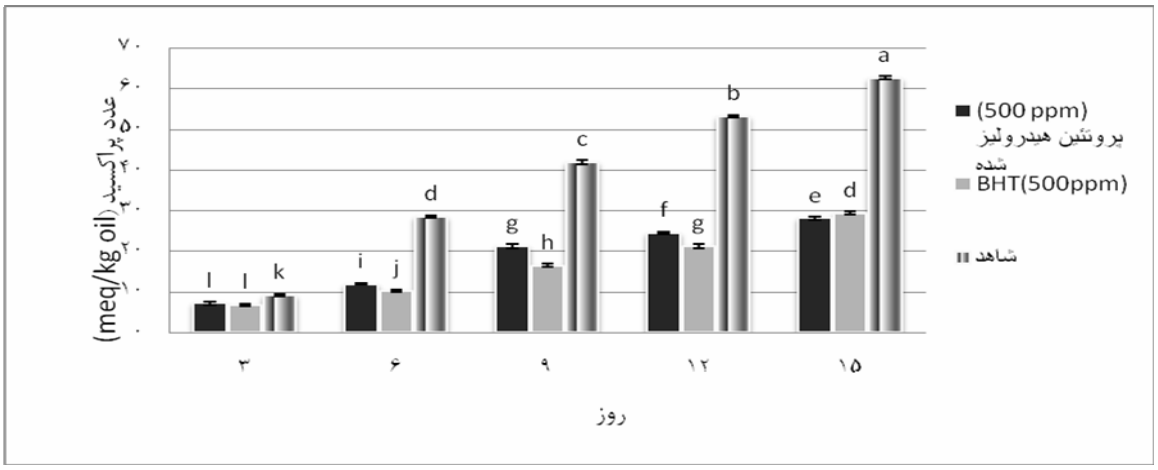


شکل۶ مقایسه تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده و آنتی اکسیدانی سنتزی در غلظت ppm ۱۰۰ از نظر میزان عدد پراکسید. اعداد مربوط به هر تیمار نشان دهنده ی میانگین ها هستند (n=3).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]



شکل۷ مقایسه تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده و آنتی اکسیدانی سنتزی در غلظت ppm ۲۰۰ از نظر میزان عدد پراکسید. اعداد مربوط به هر تیمار نشان دهنده ی میانگین ها هستند (n=3).



شکل۸ مقایسه تیمارهای حاوی پروتئین هیدرولیز شده و آنتی اکسیدانی سنتزی در غلظت ppm ۵۰۰ از نظر میزان عدد پراکسید. اعداد مربوط به هر تیمار نشان دهنده ی میانگین ها هستند (n=3).

شکل های ۶، ۷ و ۸ مقادیر عدد پراکسید را در همه ی روزهای مورد آزمایش برای هر یک از نمونه های مختلف روغن به ترتیب در غلظت های ppm۱۰۰، ۲۰۰ و ۵۰۰ و همچنین در مقایسه با یکدیگر نشان می دهند. روند نمودارها نشان می دهد که در تمامی تیمارهای مورد بررسی با افزایش زمان نگهداری نمونه‌ها در شرایط اکسیداسیون، مقادیر عدد پراکسید سیر صعودی داشته است. نتایج نشان می‌دهد که در همه ی روزهای مورد آزمایش بالاترین عدد پراکسید مربوط به نمونه‌ی شاهد، که حاوی هیچ نوع آنتی اکسیدانی نمی‌باشد، بود ($p<۰/۰۵$). نمونه ی روغن به همراه آنتی اکسیدان سنتزی BHT با غلظتppm ۵۰۰ کمترین میزان عدد پراکسید را بین اکثر تیمارها داشت. همچنین نمونه ی روغن به همراه پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ppm ۵۰۰، در مقایسه با نمونه‌های حاوی آنتی اکسیدان سنتزی با غلظتppm ۱۰۰ و ۲۰۰، میزان عدد پراکسید کمتری را نشان داد ($p<۰/۰۵$). نمونه‌ی روغن حاوی پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ppm ۲۰۰ نیز محتوی میزان محصول اکسید شده‌ی کمتری در مقایسه با تیمار روغن به همراه آنتی اکسیدان سنتزی با غلظت ppm۱۰۰ بود. به صورت کلی با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده (آنتی اکسیدان طبیعی) میزان عدد پراکسید کاهش و به تاخیر اندازی اکسایش افزایش یافته بود. نکته‌ی قابل توجه در این بررسی این است که، در تیمارها با غلظت آنتی اکسیدان (طبیعی و سنتزی)ppm ۲۰۰ و ۵۰۰، در روزهای آخر نگهداری توان آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و آنتی اکسیدان سنتزی BHT، به یکدیگر نزدیک بود و در روز پانزدهم، مقدار عدد پراکسید در نمونه‌ی حاوی پودر پروتئین هیدرولیز شده، نسبت

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

به نمونه‌ی حاوی BHT با تفاوت معنی داری به میزان کمتری به دست آمد. این موضوع می‌تواند بیانگر پایداری بیشتر ویژگی ضد اکسایش پروتئین هیدرولیز شده در طی دوران نگهداری نسبت به آنتی اکسیدان سنتزی BHT باشد. دیاو و همکاران (۲۰۰۹) تحقیقی در رابطه با اثر بازدارندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از استخوان برروی اکسایش لیپید در فراورده‌های گوشت خوک انجام دادند. پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم آلکالاز و در طول مدت ۵ ساعت تهیه شد. ترکیب هیدرولیز شده سپس به ترکیب یک نوع پای گوشتی حاصل از گوشت خوک با غلظت های ۳-۰٪ اضافه شد، که نتایج نشان داد پروتئین هیدرولیز شده استخوان فعالیت آنتی‌اکسیدانی مناسبی در طی دوران انبارداری از محصول گوشتی از خود نشان داد، برای این کار محتوی محصولات اکسید شده‌ی واکنش دهنده با تیوباربیتوریک اسید و کربونیل پروتئین اندازه‌گیری شد. غلظت ۰/۰۲٪ BHT نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده باعث افزایش عملکرد آنتی اکسیدانی شد، غلظت ۲٪ ترکیب هیدرولیز شده بالاترین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی را به همراه داشت. نتایج ارزیابی حسی نشان داد که افزودن پروتئین هیدرولیز شده به پای گوشت باعث بهبود طعم و رنگ محصول خواهد شد [۲۰].

۵- نتیجه گیری

نتایج این تحقیق در رابطه با فرایند تولید پروتئین هیدرولیز شده‌ی حاصل از امعاء و احشاء گوسفند نشان داد که تولید این محصول به صورت موثری تحت تاثیر شرایط واکنش قرار دارد، در واقع هر یک از فاکتورهای دما، زمان و میزان آنزیم تاثیر کاملا معنی‌داری (در سطح اطمینان ۹۵٪) بر کیفیت محصول داشت. شرایط بهینه برای دستیابی به بیشترین میزان درجه هیدرولیز دمای ۴۵ درجه‌ی سانتی‌گراد، زمان ۱۸۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۹۰ (واحد آنسون/ کیلوگرم سوبسترا) بود، که تحت این شرایط میزان درجه هیدرولیز ۳۶/۹۲٪ به دست آمد. مقایسه‌ی نتایج مربوط به میزان درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی در این آزمایش نشان داد که، میزان پیشرفت هیدرولیز و ویژگی آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشاء گوسفند به صورت کاملا مستقیمی با یکدیگر در ارتباط نیستند. همچنین نتایج بیانگر این مطلب بود که، رفتار آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، علاوه بر شرایط واکنش شامل دما، زمان و میزان آنزیم،تحت تاثیر ساختار پپتیدهای تولید کننده‌ی این خاصیت نیز می‌باشد. در نهایت با بررسی و مقایسه‌ی عملکرد آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده‌در این پژوهش، می‌توان گفت که این محصول غنی از پروتئین به عنوان یک منبع آنتی اکسیدان طبیعی، در غلظت های مناسب قابل رقابت با محصولات آنتی اکسیدان سنتزی می باشد.

۶- تشکر و سپاسگزاری

از حمایت های معاونت محترم علمی و فناوری ریاست جمهوری (صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور) کمال تشکر را داریم. همچنین از مسئولین و کارمندان آزمایشگاه تخصصی پژوهشکده قلب و عروق صدیقه طاهره (س)، گروه علوم و صنایع غذایی گرگان و سرکار خانم دکتر معصومه صادقی به خاطر فراهم آوردن محیط انجام آزمایش، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

۷- منابع

[1] Processing and preservation of meat. 2010. Aviable from http:// www. Hakimemehr.ir. accessed 21 April 2011.

[2] Kristinsson H.G., Rasco B.A. 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties.Critical Reviews in Journal ofFood Science and Nutrition. 40, 43–81.

[3] Vioque, J., Clemente, A., Pedroche, J., Yust, M. M. and Millgn, F. 2001. Obtencion y aplicacionesde hidrolizadosproteicos.Journal of GrasasAceites.52,132–136.

[4] Calderon,D.I., Barca,A.M., Ruiz-Salazar, R.A. and Jara-Marini, M.E. 2000. Enzymatic hydrolysis of soy protein to improve its amino acid composition and functionalproperties.Journal of Food science and Technology.65,246–253.

[5] Bhaskar, N., Modi,V. K., Govindaraju, K., Radha, C. and Lalitha, R.G. 2008. Utilization of meat industry by products:Proteinhydrolysate from sheep visceral mass. Journal of Bioresource Technology.98,388–394.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

herring (*Clupeaharengus*). Journal of FoodScience. 59,76–79.

[14] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz,Y. and Nasr, M. 2008.Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelusmustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal protease. Journal of Food Chemistry. 114,1198–1205.

[15]Mardani-ghahfarokhi, V., Alami, M., Arabshahi, S., Sadeghi- mahoonak, A. 2011. Evaluation antioxidant activity of leaf extract of western flower (*oenotherabiennis*) and its effect on oxidative stability of soybean oil. In: Twentieth congress of food science and Technology. Iran :sharif university of Technology. pp:121-129.

[16] Official Methods and Recommended Practices of the AmericanOil Chemists, Society .1997. Method Cd 8-53, 4th edn, edited by D. Firestone, AmericanOil Chemists, Society, Champaign.

[17] Taheri, A., AbedianKenari, A., Motamedzadegan, A. and HabibiRezaie, M. 2011. Optimization of goldstripe sardine (*Sardinellagibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase 2.4L by response surface methodology.CyTA - Journal of Food . 9: 114–120.

[18] Taheri, A. 2011. Antioxidant properties of rainbow sardine (*Dussumieriaacuta*) protein hydrolysate: optimization using response surface methodology. International food congress Novel Approaches in food industry. pp: 26-29.

[19] Parvaneh, V. 2006. Quality control and food chemical experiments, Tehran university publishers, 332 p.

[20] Diao, J., Diao, X., Kong, B. and Chen, H. 2009. The Inhibiting Effect of Bone Protein Hydrolysare on Lipid oxidation in Pork Patties. Journal of Northeast Agricultural University. 16,29-34.

[6] Ovissipour, M. R., Abedia, A. M., Motamedzadegan, A., Rasco,B., Safari, R. and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the propertiesof protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenserpersicus*) viscera.Journal of Food Chemistry. 115, 238–242.

[7] Jamdar, S.N. andHarikumar, P. 2008. A rapid autolytic method for the preparation of protein hydrolysate from poultry viscera. Journal of Bioresource Technology. 99, 6934–6940.

[8] Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R.2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysatefrom the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanusvitta*). Journal of LWT-Food Science and Technology. 44,1139-1148.

[9] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz,Y. and Nasr, M. 2008.Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelusmustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal protease. Journal of Food Chemistry. 114,1198–1205.

[10] Hwang, J. Y., Shyu,Y. S., Wang,Y.T. and Hsu,C. K. 2010. Antioxidative properties of proteinhydrolysate from defatted peanut kernels treated withesperase.Journal ofFood Science Technology.43,285–290.

[11] Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R.2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysatefrom the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanusvitta*).Journal ofLWT-Food Science and Technology. 44,1139-1148.

[12] Ovissipour, M. R., Abedia, A. M., Motamedzadegan, A., Nazari, R.M. 2010. Study of protein hydrolysate properties from tuna visceral *(Thunnus albacores).* Journal of Iranian Food Science and TechnologyResearch, 6(1), 68-76.

[13] Hoyle, N.T., and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]

Evaluation of antioxidant activity of bioactive peptides prepared from meat industry by-products

Meshginfar, N. [1 *], Sadeghi mahoonak, A. R. [2] , Ziaiifar, A. M. [3], Kashaninejad, M. [2], Ghorbani, M. [2]

1. MSc graduated, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Iran
2. Associate professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources
3. Assistant professor, Department of Food Science, Faculty of Agriculture, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(Received: 92/6/23 Accepted: 92/11/8)

In the present study Protein hydrolysate was prepared from the sheep visceral (stomach and intestine) using Alcalase 2.4 L. The effect of temperature (40, 45, 50 and 55 °C), time (in six levels) and enzyme/substrate ratio (30, 60 and 90 Anson unit), on degree of hydrolysis and antioxidant activity were investigated using factorial experiment. The highest degree of hydrolysis was observed at 45 °C, after 180 min and enzyme/substrate ratio of 90 Anson unit/ Kg substrate ($p< 0.05$). Under these conditions, degree of hydrolysis was 36/92%. To study the antioxidant activity of protein hydrolysate, DPPH radical scavenging activity, ferric reducing power and effect of protein hydrolysate on stability of soybean oil were measured. All antioxidant activity experiments were performed at constant temperature (45°C). The highest DPPH radical scavenging activity and ferric reducing power were achieved after 150 min at enzyme/substrate ratio of 90 Anson unit/ Kg substrate ($p< 0.05$) and after 180 min at 90 Anson unit/ Kg substrate ($p< 0.05$), respectively. Results show that protein hydrolysate can be used as a natural antioxidant source instead of synthetic antioxidants.

Keywords: Sheep visceral, Antioxidant peptides, Protein hydrolysate, Enzymatic hydrolysis.

* Corresponding Author E-Mail Address: nasimmeshginfar@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-28]