

تأثیر غلظت آنزیم بر فعالیت ضد انجمادی ژلاتین هیدرولیز در اکتومیوزین خرچنگ دراز آب شیرین قرار گرفته در معرض چرخه های انجماد و انجماد زدایی

اعظم اولاد ربیعی^۱، مهدی نیکو^{۲*}، کاوه رحمانی فرح^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد، پژوهشکده مطالعات دریاچه ارومیه، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۲- استادیار، پژوهشکده آرتمیا و آبی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

۳- استادیار، پژوهشکده آرتمیا و آبی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۵/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۷/۱۹)

چکیده

در این مطالعه ژلاتین هیدرولیز از پوست فیل ماهی پرورشی تولید و تأثیر ضد انجمادی آن در اکتومیوزین خرچنگ دراز آب شیرین قرار گرفته در معرض شش سیکل انجماد و انجماد زدایی مورد مطالعه قرار گرفت. ژلاتین هیدرولیز تولید شده از غلظت ۵ درصد آنزیم دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتر در مهار رادیکال های آزاد DPPH و ABTS در مقایسه با غلظت های ۱ تا ۴ درصد بوده است. اکسیداسیون چربی در اکتومیوزین در حضور ژلاتین هیدرولیز کاهش یافت که از طریق کاهش تشکیل ترکیبات واکنشی اسید تیوباربتوریک بعد از شش سیکل انجماد-انجماد زدایی مشخص شد. کاهش فعالیت Ca^{2+} -ATPase و گروه های سولفیدریل کل در اکتومیوزین طی سیکل های انجماد-انجماد زدایی رخ داد. اکتومیوزین حاوی ژلاتین هیدرولیز شده از غلظت ۵ درصد آنزیم دارای فعالیت بالاتر Ca^{2+} -ATPase و مقدار بیشتر گروه های سولفیدریل کل پس از شش سیکل های انجماد-انجماد زدایی که نشان دهنده نقش حفاظتی در برابر دنا تراسیون زنجیره سنگین میوزین بود. ژلاتین هیدرولیز شده از غلظت ۵ درصد آنزیم دارای پپتید های متعددی بوده ولی طبق آنالیز MALDI-TOF MS پپتید های با وزن مولکولی ۱۴۳۶/۷۲، ۱۵۷۹/۸۲، ۱۶۲۷/۷۴، ۱۷۱۶/۸۰ و ۲۱۳۵/۰۷ دالتون غالب ترین پپتید ها در این هیدرولیزات بوده اند. نتیجه نشان داد که ژلاتین هیدرولیز شده از غلظت ۵ درصد آنزیم با ترکیب خاص پپتیدی سبب کاهش دنا تراسیون اکتومیوزین طبیعی خرچنگ دراز آب شیرین گردید.

کلید واژگان: خرچنگ دراز آب شیرین، اکتومیوزین طبیعی، سیکل انجماد-انجماد زدایی، ژلاتین هیدرولیز

* مسئول مکاتبات: m.nikoo@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

نگهداری در انجماد یکی از مهمترین روش های حفاظت فرآورده های دریایی می باشد [۱]. علیرغم اینکه کیفیت چربی، پروتئین و ویژگی های حسی فرآورده در زمان نگهداری در انجماد به میزان قابل توجهی حفظ می گردد ولی کاهش تدریجی کیفیت همواره یکی از مشکلات پیش روی صنعت فرآورده های منجمد می باشد [۲]. چون پروتئین های میوفیبریل مهمترین پروتئین های ساختاری در فرآورده های دریایی می باشند، تغییرات ایجاد شده در زمان انجماد سبب تغییر ماهیت ساختاری و عملکردی آن می شود [۲]. میوزین که مهمترین پروتئین میوفیبریل است در برابر انجماد بسیار آسیب پذیر می باشد. سرهای کروی این پروتئین دارای فعالیت Ca^{2+} -ATPase می باشد که در برابر تغییرات ساختاری در پروتئین تحت اثر انجماد آسیب پذیر است [۳، ۴]. در زمان انجماد، بدلیل تغییرات ساختاری در سر میوزین و تجمع پروتئینی در این قسمت، فعالیت این آنزیم کاهش می یابد. همچنین اکسیده شدن گروه های سولفیدریل که در ناحیه سر میوزین قرار گرفته اند، در کاهش فعالیت Ca^{2+} -ATPase نقش دارد. از اینرو، کاهش فعالیت این آنزیم به عنوان یک شاخص جهت ارزیابی کیفیت پروتئین های میوفیبریل در زمان انجماد مورد مطالعه قرار می گیرد [۵].

ژلاتین مخلوط غیر یکنواخت از پپتیدهای با ساختارهای مختلف می باشد که از پروتئین مادری کلاژن تولید می شود [۶، ۷]. حرارت دهی به کلاژن در آب سبب باز شدن پیوندهای هیدروژنی گردیده و این امر موجب از بین بردن ساختار مارپیچ سه گانه کلاژن و عبور از حالت هلیکس^۱ به مارپیچی می گردد که در نهایت سبب می شود تا کلاژن به ژلاتین محلول تبدیل گردد [۸، ۹]. ژلاتین بطور کلی دارای درصد بالای اسید های آمینه گلوسین، آلانین، پرولین و هیدروکسی پرولیناست [۱۰]. وجود توالی ۳ اسید آمینه ای -Gly-X-Y- که مهمترین جزء در زنجیره آلفای کلاژن است نقش مهمی در خاصیت ضد انجمادی ژلاتین هیدرولیز دارد [۱۱]. پپتیدهای با چنین ترکیب یا توالی اسید آمینه ای توانستند از تشکیل آب خارج سلولی جلوگیری و از دناتوراسیون پروتئین به دلیل انجماد جلوگیری نمایند [۱۲].

1. Helix

واکنش فیما بین مولکول های هیدراته آب پروتئین های میوفیبریل و گروه های قطبی پپتید های هیدروفیل سبب تثبیت آب مرتبط با این پروتئین ها گردیده و منجر به مقدار بالاتر آب منجمد نشده در فرآورده می گردد. این حالت سبب کاهش تغییرات ساختاری در پروتئین خواهد گردید. اسید های آمینه آبدوست شامل پرولین، آسپاراژین، گلوتامین، سرین، هیستیدین، آرژنین، گلوسین و ترئونین در توالی پپتید خاصیت نگهداری آب داشته و سبب کاهش مهاجرت آب در تشکیل یخ می گردند. این امر سبب تثبیت مولکول های آب گردید [۱۲-۱۴]. پارامترهایی چون نوع آنزیم پروتئازی، نوع پروتئین و شرایط هیدرولیز بر اندازه پپتید و نتیجتا عملکرد ضد انجمادی آنها تاثیر می گذارند [۱۵]. گذشته از اندازه پپتید، ترکیب اسیدهای آمینه و قرار گیری آنها در زنجیره پپتید نیز به میزان زیادی تعیین کننده خاصیت ضد انجمادی خواهد بود [۱۶]. مطالعات پیشین نشان داد که ژلاتین هیدرولیز از منشاء حیوانی یا ماهی توانست از افت کیفیت پروتئین و محصول در زمان انجماد یا سیکل های انجماد و انجمادزدایی جلوگیری نماید و از اینرو ممکن است بتوانند به عنوان ترکیبات ضد انجمادی جایگزین مورد استفاده قرار گیرند. ژلاتین هیدرولیز با ساختار خاص پپتیدی خود نه تنها از کاهش گروه های سولفیدریل کل، حالیت و فعالیت آنزیم Ca^{2+} -ATPase تا حد زیادی جلوگیری نموده بلکه تشکیل پیوندهای دی سولفید و حرکت آب از مخازن داخلی میوفیبریلار به مخازن خارجی آن به میزان قابل توجهی کاهش یافت. [۱۶، ۱۷]. این پروتئین ها از ویژگی های حرارتی مناسبتری نیز برخوردار بودند. هدف این مطالعه استفاده از پوست فیل ماهی پرورشی به عنوان ضایعات جهت تولید ژلاتین هیدرولیز و بررسی تاثیر ضد انجمادی ژلاتین هیدرولیز با رنج وزن مولکولی پپتیدی مختلف بر جلوگیری از دناتوراسیون عضله خرچنگ دراز آب شیرین قرار داده شده در معرض سیکل های مختلف انجماد و انجماد زدایی بوده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه پوست و استخراج ژلاتین

نمونه های پوست فیل ماهی از مزرعه ساعی گستر (ساری، مازندران) تهیه و پوست آن پس از جداسازی باقیمانده گوشت و

۳-۲- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز از طریق رابطه زیر [۱۸] تعیین شد:

$$DH(\%) = BN_b/\alpha \times h_{tot} \times Mp$$

که در این معادله B حجم باز مصرفی بر حسب میلی لیتر، Nb نرمالیه باز (۱ مول)، Mp وزن پروتئین بر حسب گرم، h_{tot} مقدار کل پپتیدهای موجود برای هیدرولیز (۱۱/۱ میلی اکی والان/گرم) و α از طریق معادله زیر تعیین شد:

$$\alpha = 10^{pH-pK/1} + 10^{pH-pK}$$

در معادله بالا pK به درجه حرارت هیدرولیز بستگی دارد و لذا از طریق رابطه زیر محاسبه می گردد:

$$pK = 2400(7.8 + 298 - T/298T)$$

مقدار α برای آنزیم آلكالاز با اتخاذ درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد برای هیدرولیز، ۰/۸۷ محاسبه شد.

۴-۲- آنالیز MALDI-TOF/MS

رنج وزن مولکولی پپتیدها توسط تکنیک MALDI-TOF/MS استفاده شد. ژلاتین هیدرولیز (۲ میلی گرم در میلی لیتر) بر روی صفحه MALDI target plate ریخته شده و اجازه داده شد تا در هوا خشک شوند. سپس ۱ میکرولیتر محلول α -cyano-4-hydroxycinnamic تهیه شده در استونیتریل ۸۵٪ به روی نقاط پتیدی خشک شده ریخته شد و دوباره اجازه داده شد تا در هوا خشک شوند. رنج وزن مولکولی پپتیدها با استفاده از دستگاه UltrafleXtreme MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (BrukerDaltonics, Bremen, Germany) انجام و اسپکترهای بدست آمده توسط نرم افزار FlexAnalysis 3.3 software آنالیز شدند.

۵-۲- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های

DPPH

تاثیر مهار رادیکال های DPPH پپتیدهای سوراخ به روش Benjakul و Senphan [۱۹] اندازه گیری شد. پپتید در غلظت های مختلف با آب مقطر مخلوط و سپس ۱ میلی لیتر محلول پپتیدی با ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شدند. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها از طریق

چربی توسط آب و یخ بخوبی شسته شد و توسط قیچی به قطعات کوچک به ابعاد متوسط ۵ میلی متری بریده شد. جهت استخراج ژلاتین در مرحله اول حذف رنگدانه ها و پروتئین های غیر کلاژنی پوست صورت گرفت. جهت این امر، پوست به نسبت ۱ به ۱۰ با محلول هیدروکسید سدیم ۰/۱ مول مخلوط و برای مدت ۶ ساعت توسط دستگاه هم زن اکتريکی در دمای معمولی بهم زده شدند. محلول هیدروکسید سدیم هر ۲ ساعت تعویض گردید. سپس نمونه های پوست بخوبی با آب سرد شسته شده تا پی اچ به نزدیک خنثی رسید. در مرحله بعد نمونه ها با استفاده از الکل ان-بوتانول ۱۰ درصد به مدت ۱۸ ساعت جهت چربی زدایی توسط دستگاه هم زن الکتریکی بهم زده شدند. پس از شستشو به روش فوق، از اسید استیک ۰/۰۵ مول بمدت ۳ ساعت برای فرایند متورم سازی پوست استفاده گردید. ژلاتین در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد طی مدت ۶ ساعت استخراج شد و توسط خشک کن انجمادی به منظور تهیه پودر ژلاتین خشک گردید.

۲-۲- هیدرولیز ژلاتین

از آنزیم آلكالاز (*Bacillus licheniformis*, 2.4 L, 2.4 AU/g; Sigma Co., USA) در غلظت های مختلف (۱٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪، ۵٪) جهت هیدرولیز استفاده گردید. درجه حرارت هیدرولیز در حد شرایط مناسب فعالیت آنزیم (۵۰ درجه سانتی گراد و پی اچ ۸) در طی زمان هیدرولیز ثابت نگهداشته شد. هیدرولیز ژلاتین (۳ درصد) طی زمان ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. جهت ثابت نگه داشتن پی اچ جهت فعالیت اپتیمم آنزیم، از سود ۱ نرمال استفاده گردید. بعد از اتمام هیدرولیز با افزودن اسیدکلریدریکی اچ محلول پپتیدی به ۷ رسانده شده و جهت غیر فعال کردن آنزیم محلول به مدت ۱۰ دقیقه در بن ماری با دمای ۱۰۰ درجه سانتی حرارت داده شد. کلیه محلول ها در دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه بمدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شده و سوپرناتانت های بدست آمده تا زمان خشک کردن در خشک کن انجمادی در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. مقدار پروتئین ژلاتین هیدرولیز به روش بیورتبا استفاده از آلبومین سرم گاوی (BSA) تعیین گردید.

فرمول زیر محاسبه گردید: فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH = جذب کنترل - جذب نمونه/جذب کنترل $\times 100$

۲-۶- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های

ABTS

تاثیر حذف کنندگی رادیکال های ABTS سوراخ به روش Senphan و Benjakul [۱۹] اندازه گیری شد. رادیکال های ABTS از طریق مخلوط نمودن محلول ۷/۴ میلی مول ABTS با محلول ۲/۶ میلی مول پرسولفات پتاسیم به نسبت ۱ به ۱ تهیه گردید. مخلوط حاصل سپس برای مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و سپس با مقدار مناسب متانول مخلوط تا جذب محلول در طول موج ۷۳۴ نانومتر به ۱/۱ برسد. بعد از رسیدن جذب به این عدد، ۱۵۰ میکرولیتر عصاره پیتیدی با ۲۸۵۰ میکرولیتر محلول رادیکالی در لوله آزمایش مخلوط و پس از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه، به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردیدند. برای تهیه نمونه کنترل بجای محلول پیتیدی از آب مقطر استفاده گردید. جذب نمونه ها در طول موج ۷۳۴ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید: فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS = جذب کنترل - جذب نمونه/جذب کنترل $\times 100$

۲-۷- بررسی فعالیت ضدانجمادی ژلاتین

هیدرولیز در خرچنگ دراز آب شیرین

۲-۷-۱- تهیه خرچنگ دراز آب شیرین (*Astacuseptodactylus*)

نمونه های خرچنگ دراز آب شیرین (تعداد ۱۰۰ عدد، میانگین وزنی ۲۰-۵۰ گرم) اواخر فصل تابستان از دریاچه سد ارس تهیه و به صورت زنده در جعبه یونولیت حاوی یخ به آزمایشگاه فرآوری منتقل گردیدند. ناحیه دم خرچنگ ها توسط چاقوی تمیز جدا و پوسته آن توسط قیچی از قسمت گوشتی جدا گردید. نمونه های بدست آمده جهت تهیه مینس بکار برده شدند.

۲-۷-۲- استخراج اکتومیوزین

اکتومیوزین به روش Benjakul و همکاران [۲۰] استخراج گردید. نمونه مینس (۲۰۰ گرم) با مقدار ۱۰ برابر کلرید پتاسیم ۰/۶ مول تهیه شده در بافر فسفات ۲۰ میلی مول (پی اچ ۷) توسط هموژنایزر (Heidolph DIAX900, Germany)

بخوبی هموژن گردیدند. جهت جلوگیری از بالا رفتن حرارت و اکسید شدن نمونه از مخلوط آب و یخ استفاده گردید. اکتومیوزین طی زمان ۴ دقیقه استخراج گردید به طوریکه مینس به مدت ۲۰ ثانیه هموژن و ۲۰ ثانیه بعد استراحت داده می شدند. سپس نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد در دور ۵۰۰۰ جی سانتریفیوژ گردیدند. به سوپرناتانت حاصل مقدار ۳ برابر آب مقطر سرد اضافه تا پروتئین رسوب نماید. اکتومیوزین بوسیله سانتریفیوژ طبق روش ذکر شده جمع آوری گردید. پلت های اکتومیوزین در محلول کلرید پتاسیم ۱/۲ مول سرد (پی اچ ۷) به نسبت ۱:۱ مخلوط و بمدت ۳۰ دقیقه بهم زده شدند. سپس برای جدا سازی پروتئین های غیر محلول، محلول برای مدت ۳۰ دقیقه دیگر طبق شرایط فوق سانتریفیوژ گردید. ژلاتین های هیدرولیز تهیه شده با غلظت های مختلف آنزیم آلکالاز (۱، ۲، ۳، ۴، ۵٪) و همچنین اسید آسکوربیک و EDAT بعنوان کنترل مثبت به اکتومیوزین اضافه شدند.

۲-۷-۳- سیکل انجماد-انجمادزدایی

کلیه نمونه ها پس از آماده سازی در معرض ۶ سیکل انجماد-انجمادزدایی قرار داده شدند بنحویکه ۱۸ ساعت در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری و جهت انجماد زدایی نمونه ها بمدت ۶ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی گراد قرارداده شدند. در زمان های تعیین شده (سیکل ۰ یا نمونه منجمد نشده و سیکل ۶) مقدار لازم نمونه ها برداشته شده و مورد آنالیز قرار گرفتند.

۲-۷-۴- تعیین مقدار تیوباریتوریک اسید (TBARS)

میزان تیوباریتوریک اسید روش بواگه و اوست [۲۱] بدین ترتیب اندازه گیری شد که مقدار ۰/۵ گرم نمونه با ۱۰ میلی لیتر از محلول تیوباریتوریک اسید (شامل ۰/۳۷۵ گرم پودر معرف تیوباریتوریک اسید، ۱۵ گرم تری کلرواستیک اسید و اسید کلریدریک (۰/۲۵ مول) به مدت ۳۰ ثانیه هموژن گردید. سپس نمونه ها در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد در حمام آبی حرارت داده شد و با استفاده از مخلوط آب و یخ خنک گردیدند. سپس نمونه ها در دور ۷۰۰۰ جی برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ و جذب محلول شفاف با استفاده از اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۳۲ نانومتر خوانده شد.

2. C2HCl3O2
3. Supernatant

۲-۸- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) انجام و مقایسه بین میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن صورت خواهد پذیرفت. از نرم افزار SPSS شماره ۱۶ جهت آنالیز آماری استفاده می گردد. معنی داری داده ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < 0.05$) بررسی می گردد.

۳- نتایج

نمودار درجه هیدرولیز پیوندهای پپتیدی ژلاتین پوست فیل ماهی پرورشی در شکل ۱ نشان داده شده است. درجه هیدرولیز پیوندهای پپتیدی تحت تاثیر غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز قرار گرفت. با افزایش غلظت آلکالاز از ۱ تا ۵ درصد، شکستگی پیوند های پپتیدی به میزان بالاتری اتفاق افتاد. در تمامی نمونه ها، حداکثر هیدرولیز پیوند های پپتیدی طی مدت ۳۰ دقیقه اول رخ داد و بعد از آن با کم شدن پیوندهای موجود کلیه نمودارها به شکل افقی قرار گرفته اند. درجه هیدرولیز ژلاتین برای غلظت های مختلف آنزیم (۱٪، ۲٪، ۳٪، ۴٪، ۵٪) به ترتیب ۷/۸۸٪، ۸/۳۶٪، ۱۱/۰۴٪، ۱۰/۰۹٪ و ۱۲/۹۹٪ محاسبه گردید.

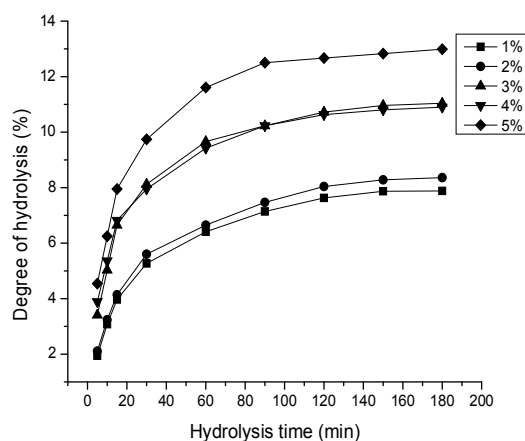


Fig 1 Degree of hydrolysis (DH) of gelatin peptides produced with enzyme-to-substrate ratio of 1:100, 2:100, 3:100, 4:100, and 5:100.

نتیجه آنالیز رنج وزن مولکولی پپتیدهای ژلاتین پوست فیل ماهی توسط MALDI-TOF MS تولید شده توسط سه غلظت ۱٪، ۳٪ و ۵٪ در شکل ۲ نشان داده شده است.

۲-۷-۵- تعیین مقدار سولفیدریل کل

سولفیدریل کل با استفاده از DTNB و به روش Ellman [۲۲] اندازه گیری شد. برای این منظور، مقدار ۰/۵ گرم نمونه را به همراه ۱۰ میلی لیتر بافر فسفات (۵۰ میلی مول، پی اچ ۷/۲) مخلوط و بمدت ۳۰ ثانیه توسط دستگاه هموژنایزر هموژن گردید. سپس ۱ میلی لیتر از محلول هموژن شده با ۹ میلی لیتر بافر فسفات (حاوی ۰/۶ مول کلرید سدیم، ۶ میلی مول EDTA، ۸ مول اوره، پی اچ ۷/۲) مخلوط شده و بمدت ۱۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد با دور ۱۴۰۰۰ در دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن ۳ میلی لیتر از ماده شفاف رویی با ۴۰ میکرو لیتر محلول ۰/۰۱ مول DTNB تهیه شده در محلول ۰/۰۵ مول استات سدیم مخلوط کرده و در درجه حرارت ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه گردید. برای تهیه نمونه کنترل، بجای محلول هموژن مینس از ۱ میلی لیتر بافر فسفات (حاوی ۰/۶ مول کلرید سدیم، ۶ میلی مول EDTA، ۸ مول اوره، پی اچ ۷/۲) استفاده شد. جذب نمونه ها در طول موج ۴۱۲ نانومتر قرائت گردید.

۲-۷-۶- تعیین فعالیت Ca^{2+} -ATPase

فعالیت Ca^{2+} -ATPase طبق روش Wells و همکاران [۲۳] تعیین شد. برای این منظور، اکتومیوزین ها به ۳ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین رقیق شده و مقدار ۰/۲ میلی لیتر از محلول پروتئینی با ۲ میلی لیتر از بافر واکنشی (شامل ۷/۶ میلی مول ATP، ۱۵ میلی مول کلرید کلسیم، ۱۵۰ میلی مول کلرید پتاسیم، ۱۸۰ میلی مول Tris-HCl، پی اچ ۷/۴) مخلوط شدند. بعد از واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای مدت ۱۰ دقیقه، ۱۰ میلی لیتر محلول ۱۰ درصد تری کلرو استیک اسید برای توقف واکنش افزوده شد. سپس نمونه ها در ۲۵۰۰ g برای ۵ دقیقه سانتریفیوژ گردیده و ۱ میلی لیتر از سوپرناتانت با ۳ میلی لیتر از محلول ۰/۶۶ درصد مولیبدات آمونیوم در محلول ۰/۷۵ نرمال اسید سولفوریک وارد واکنش گردید. سپس ۰/۵ میلی لیتر سولفات آهن تهیه شده در اسید سولفوریک ۰/۱۵ نرمال اضافه و برای مدت ۲ دقیقه نمونه ها انکوبه شدند. بعد از آن، جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

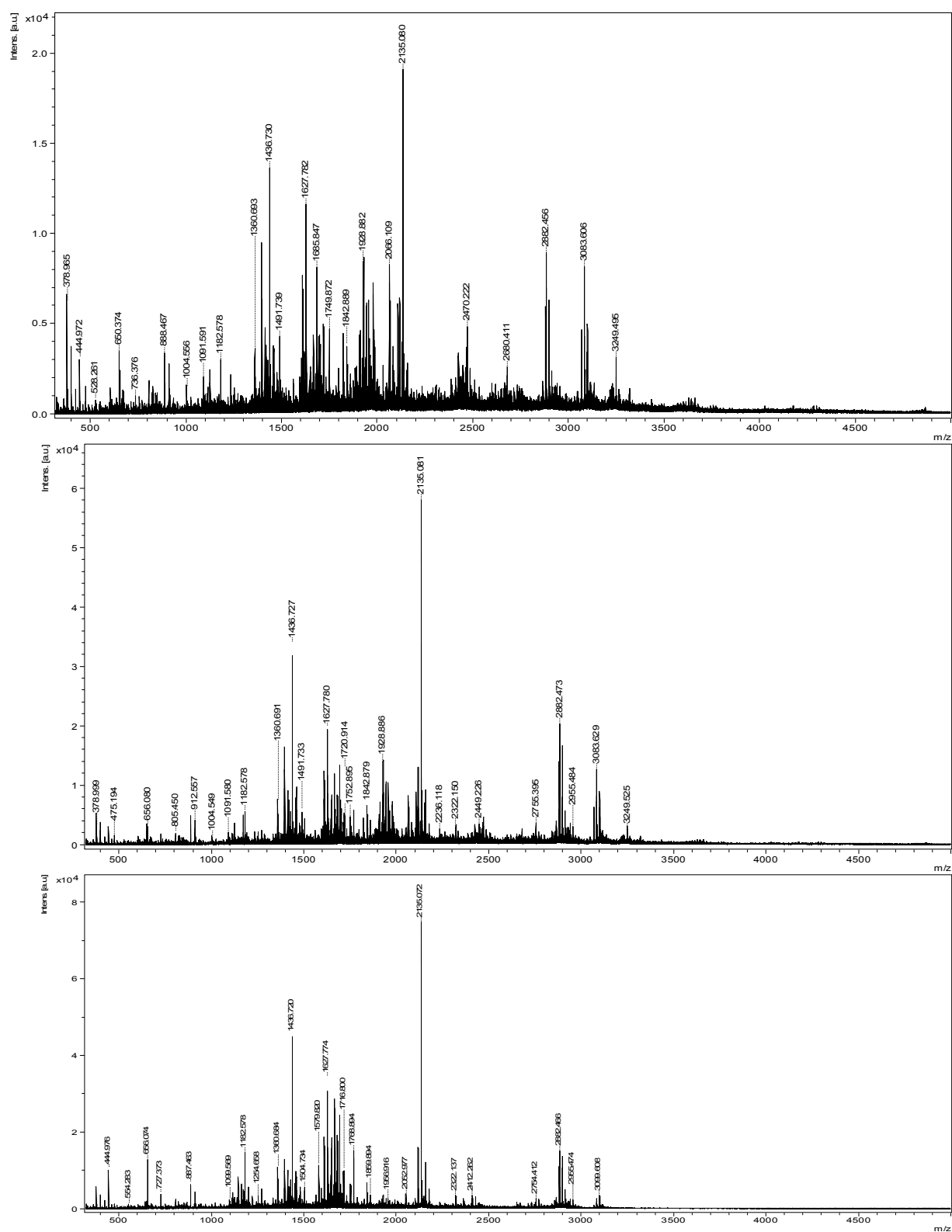


Fig 2 Molecular weight distribution of gelatin peptides produced with enzyme-to- substrate ratio of 1:100 (A), 3:100 (B) and 5:100 (C) by MALDI-TOF MS.

فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH ژلاتین هیدرولیز پوست فیل ماهی در شکل ۵ نشان داده شده است. ژلاتین هیدرولیز بخصوص نمونه های تولید شده با آنزیم در سطح ۲٪، ۳٪ و ۵٪ در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان داد (۹۱/۶۶ تا ۹۱/۹۹ درصد). بجز ژلاتین هیدرولیز تولید شده با غلظت ۵٪ آلکالاز، سایر نمونه ها با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت ($P < 0.05$). کمترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال های DPPH مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده است ($P < 0.05$). نتیجه نشان داد که آلکالاز در غلظت ۵ درصد منجر به بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در ژلاتین هیدرولیز گردید. فعالیت حذف کنندگی رادیکال های $ABTS^{++}$ ژلاتین هیدرولیز پوست فیل ماهی در شکل ۶ نشان داده شده است. ژلاتین هیدرولیز فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال های $ABTS^{++}$ نشان دادند.

نتیجه نشان داد که ژلاتین های هیدرولیز تولید شده در غلظت های مختلف آلکالاز که دارای درجه هیدرولیز ۷/۸۸، ۱۱/۰۴ و ۱۲/۹۹ درصد بوده اند از پپتید های با وزن های مولکولی مختلف تشکیل یافته اند. درصد بالایی از پپتید های موجود در ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط ۱٪ آلکالاز از اندازه بزرگتری در مقایسه با پپتید های تولید شده با غلظت های بالاتر ۳٪ و ۵٪ آلکالاز برخوردار بوده اند. ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط ۱٪ آلکالاز پپتید های با وزن مولکولی ۳۷۸/۹۶، ۱۳۶۰/۶۹، ۱۴۳۶/۷۳، ۱۶۲۷/۷۸، ۱۹۲۸/۸۸، ۲۱۳۵/۰۸ و ۲۸۸۲/۴۵ دالتون پپتید های غالب بوده اند. با افزایش غلظت آنزیم به ۳٪، اندازه پپتید ها کاهش یافت. در ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط ۳٪ آلکالاز، پپتید های با وزن مولکولی ۱۴۳۶/۷۲، ۲۱۳۵/۰۸ و ۲۸۸۲/۴۷ دالتون بیشترین درصد را خود اختصاص داده بودند. روند تغییرات مشابه در خصوص درصد بالاتر آنزیم (۵٪) نیز مشاهده گردید بطوریکه پپتید ها از وزن مولکولی کمتر از ۳ کلودالتون تشکیل یافته بودند.

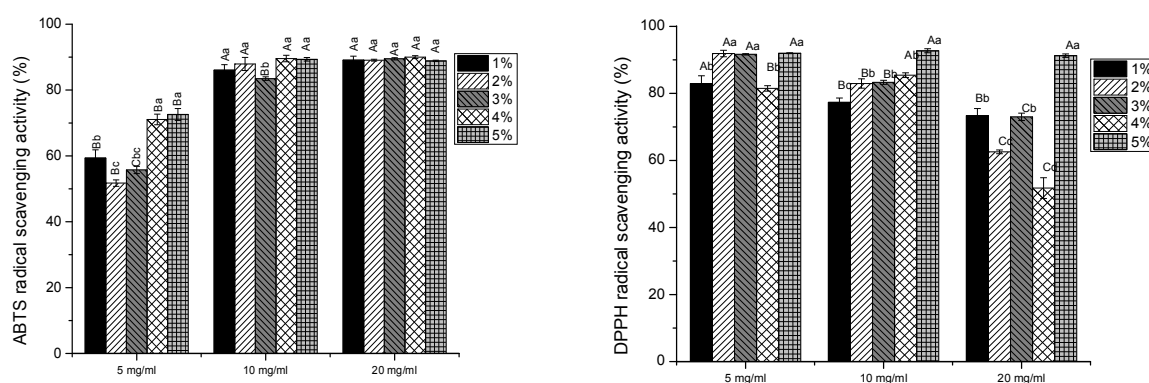


Fig 3 Radical scavenging activities of gelatin hydrolysates produced using different enzyme-to-substrate ratio (1:100, 2:100, 3:100, 4:100, and 5:100) against DPPH and ABTS radicals. Bars (representing SD, n = 3) with different letters have significantly different ($p < 0.05$) mean values.

مقدار TBARS در نمونه های منجمد نشده (سیکل ۰) بین ۱/۰۹ تا ۱/۲۲ میلی گرم معادل مالون دی آلدئید در کیلوگرم نمونه بوده و بجز تیمار ۲ (BSSGH-1) در سایر نمونه ها تفاوت معنی دار وجود نداشت. مقدار TBARS پس از شش سیکل انجماد-انجمادزدایی افزایش یافت. بیشترین افزایش مربوط به نمونه کنترل فاقد ژلاتین هیدرولیز بوده است ($P < 0.05$). مقدار TBARS بین نمونه های اکتومیوزین افزوده شده با ژلاتین هیدرولیز تولید شده با غلظت های ۰.۳٪، ۰.۴٪ و ۰.۵٪ آلکالاز با یکدیگر تفاوت نداشت. کمترین اکسیداسیون چربی مربوط به اکتومیوزین های تیمارهای BSSGH-1 و BSSGH-2 بوده است ($P < 0.05$).

تغییرات مقدار سولفیدریل کل و فعالیت Ca^{2+} -ATPase در نمونه های مختلف اکتومیوزین قرار گرفته در معرض سیکل های انجماد-انجمادزدایی و افزوده شده با ژلاتین هیدرولیز در شکل ۵ نشان داده شده است. بطور کلی مقدار سولفیدریل کل نمونه ها با افزایش سیکل انجماد-انجمادزدایی کاهش یافت. گروه های سولفیدریل کل در اکتومیوزین فاقد ژلاتین هیدرولیز (نمونه کنترل) در مقایسه با سایر نمونه ها به میزان بیشتری کاهش نشان داد ($P < 0.05$). کمترین کاهش سولفیدریل کل و نتیجتاً دناتوراسیون پروتئین مربوط به اکتومیوزین های حاوی ژلاتین هیدرولیز تولید شده با ۰.۴٪ و ۰.۵٪ آلکالاز بوده است ($P < 0.05$). همچنین فعالیت آنزیم Ca^{2+} -ATPase اکتومیوزین با افزایش سیکل انجماد-انجمادزدایی کاهش نشان داد. بیشترین کاهش فعالیت آنزیمی در نمونه کنترل (اکتومیوزین فاقد ژلاتین هیدرولیز) مشاهده شد. در سایر تیمار ها، تفاوتی بین مقدار فعالیت آنزیم Ca^{2+} -ATPase پس از شش سیکل انجماد-انجمادزدایی وجود نداشت ($P < 0.05$).

بطور کلی، غلظت آلکالاز بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ژلاتین هیدرولیز در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر معنی دار بود بطوریکه نمونه های تولید شده با غلظت های ۰.۴٪ و ۰.۵٪ آنزیم، فعالیت حذف کنندگی رادیکال بالاتری در مقایسه با غلظت های ۰.۱٪، ۰.۲٪ و ۰.۳٪ نشان دادند ($P < 0.05$). در غلظت های ۱۰ و ۲۰ میلی گرم ژلاتین هیدرولیز، تأثیر غلظت های آنزیم معنی دار نبود ($P > 0.05$). فعالیت حذف کنندگی رادیکال ها در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در حدود ۹۰ درصد در تمامی نمونه ها بود. در شکل ۴ تغییر مقدار TBARS در نمونه های اکتومیوزین افزوده شده با ژلاتین هیدرولیز پوست فیل ماهی و قرار گرفته در معرض شش سیکل انجماد-انجمادزدایی نشان داده شده است.

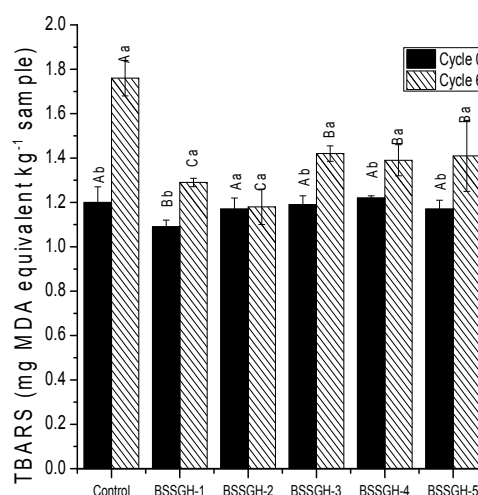


Fig 4 Thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) of freshwater crayfish natural actomyosin (NAM) added with gelatin peptides (enzyme/substrate ratio 1%-5%) and subjected to six freeze-thaw cycles. Different letters and capital letters on the bars within the same freeze-thaw cycle and the same cryoprotectant, respectively, indicate significant differences ($P < 0.05$). Bars represent standard deviation ($n = 3$).

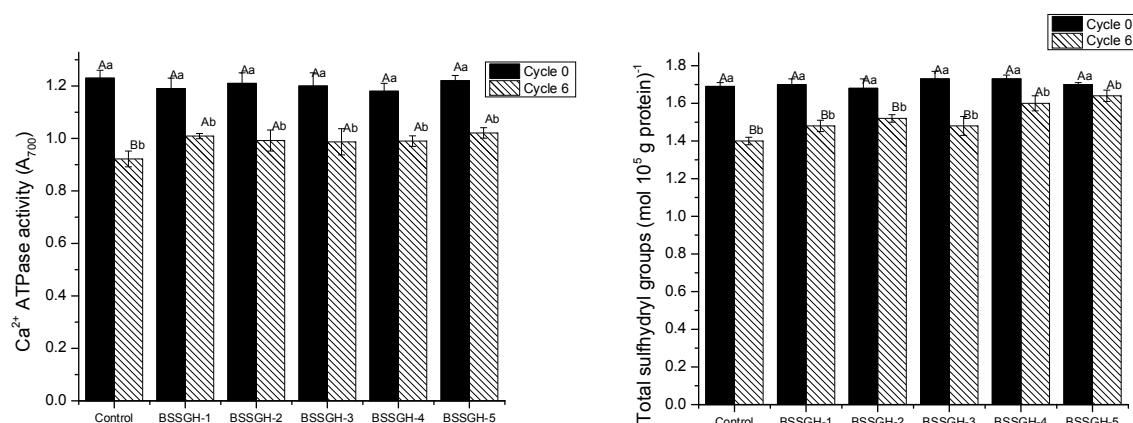


Fig 5 Total sulfhydryl groups and Ca^{2+} -ATPase activity of freshwater crayfish natural actomyosin (NAM) added with gelatin peptides (enzyme/substrate ratio 1%-5%) and subjected to 6 freeze-thaw cycles. Different letters and capital letters on the bars within the same freeze-thaw cycle and the same cryoprotectant, respectively, indicate significant differences ($P < 0.05$). Bars represent standard deviation ($n = 3$).

۴- بحث

در ژلاتین گاوی هیدرولیز شده توسط آنزیم پاپاین، متوسط وزن مولکولی پپتید ها با افزایش غلظت پاپاین از ۱ تا ۱۰ درصد کاهش یافت که نشان دهنده تولید پپتید های با اندازه کوچکتر بوده است [۲۵]. نتیجه نشان داد که غلظت های مختلف آلکالاز در هیدرولیز ژلاتین منجر به تولید پپتید های با اندازه های مختلف گردید. مطالعات پیشین نشان دادند که اندازه پپتیدها یکی از عوامل مهم تاثیرگذار بر خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد انجمادی آن ها در فرآورده های دریایی می باشد [۱۲، ۱۴].

ژلاتین هیدرولیز بخصوص نمونه های تولید شده با آنزیم در سطح ۲٪، ۳٪ و ۵٪ در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان داد (۹۱/۶۶ تا ۹۱/۹۹ درصد). بجز ژلاتین هیدرولیز تولید شده با غلظت ۵٪ آلکالاز، سایر نمونه ها با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی کاهش یافت. کمترین فعالیت مهار کنندگی رادیکال های DPPH مربوط به غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر بوده است. ژلاتین هیدرولیز تولید شده با غلظت ۵ درصد آلکالاز که دارای بالاترین درجه هیدرولیز (حدود ۱۳ درصد) بوده، بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال های DPPH را در تمامی غلظت ها از خود نشان داد. نتیجه مشابه توسط Kittiphatanabawon و همکاران [۱۴] گزارش گردید بطوریکه ژلاتین هیدرولیز پوست کوسه پوزه سیاه با بیشترین درجه هیدرولیز دارای بالاترین مهار

پس از هیدرولیز آنزیمی، پپتید های با ساختار مختلف از حیث اندازه، ترکیب اسید های آمینه و موقعیت قرار گیری آن ها در زنجیره پپتیدی تولید می شوند [۱۵، ۱۶]. نتیجه آنالیز رنج وزن مولکولی پپتید های ژلاتین پوست فیل ماهی نشان داد که ژلاتین هیدرولیز تولید شده در غلظت های مختلف آلکالاز از پپتید های با وزن مولکولی مختلف تشکیل یافته اند. بطور کلی، ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط ۱ درصد آلکالاز شامل شامل درصد بالاتر پپتید های با اندازه بزرگتر در مقایسه با غلظت های ۳٪ و ۵٪ آلکالاز بوده است. در این ژلاتین هیدرولیز پپتید های با وزن مولکولی ۳۷۸/۹۶، ۱۳۶۰/۶۹، ۱۴۳۶/۷۳، ۱۶۲۷/۷۸، ۱۹۲۸/۸۸، ۲۱۳۵/۰۸ و ۲۸۸۲/۴۵ دالتون پپتید های غالب بوده اند. با افزایش غلظت آنزیم، اندازه پپتید ها کاهش یافت. در ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط ۳٪ آلکالاز، پپتید های با وزن مولکولی ۱۴۳۶/۷۲، ۲۱۳۵/۰۸ و ۲۸۸۲/۴۷ دالتون بیشترین درصد را خود اختصاص داده بودند. روند تغییرات مشابه در خصوص درصد بالاتر آنزیم (۵٪) نیز مشاهده گردید بطوریکه پپتید های کوچک زنجیره به میزان بیشتری تولید شدند. نتیجه مشابه توسط اوفیم و همکاران [۲۴] در هیدرولیز ضایعات ماهی سالمون اطلس توسط آنزیم های تجاری و هضمی گزارش گردید بطوریکه ۵۴ تا ۸۰ درصد پپتید ها دارای وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون بوده اند.

رادیکال های DPPH بود. در این مطالعه، با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز تولید شده با آلکالاز در سطوح ۱ تا ۴ درصد فعالیت حذف کنندگی رادیکال ها کاهش یافت. فعالیت حذف رادیکال های $ABTS^{++}$ مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه نشان داد که پپتید های آنتی اکسیدانی در طی زمان هیدرولیز تولید شدند. غلظت آلکالاز بر فعالیت آنتی اکسیدانی نمونه های ژلاتین هیدرولیز در غلظت ۵ میلی گرم در میلی لیتر معنی دار بود بطوریکه نمونه های تولید شده با غلظت های ۴٪ و ۵٪ آنزیم، فعالیت حذف کنندگی رادیکال بالاتری در مقایسه با غلظت های ۱٪، ۲٪ و ۳٪ نشان دادند. فعالیت حذف کنندگی رادیکال ها در غلظت ۲۰ میلی گرم در میلی لیتر در حدود ۹۰ درصد در تمامی نمونه ها بود. فعالیت حذف رادیکال های DPPH و $ABTS^{++}$ توسط آنتی اکسیدان به توانایی آن آنتی اکسیدان در دادن اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال آزاد و تبدیل آن به گونه رادیکال غیر واکنشی می باشد [۲۶]. نتیجه نشان داد که ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط غلظت های ۴ و ۵ درصد آلکالاز که دارای درجه هیدرولیز بالاتری بودند، توانایی مهار رادیکال های آزاد را داشته و لذا می توانند از اکسیداسیون چربی جلوگیری نمایند.

ژلاتین هیدرولیز نقش آنتی اکسیدانی نیز در اکتومیوزین شاه میگوی آب شیرین قرار گرفته در معرض چندین چرخه انجماد-انجمادزدایی نشان داد. اکسیداسیون چربی در اکتومیوزین حاوی ژلاتین هیدرولیز در مقایسه با گروه کنترل کاهش یافت. تاثیر آنتی اکسیدانی ژلاتین هیدرولیز تحت تاثیر غلظت آلکالاز قرار گرفت. ژلاتین های هیدرولیز تولید شده توسط غلظت های مختلف آلکالاز احتمالاً دارای اندازه های مختلف و رنج وزن مولکولی متفاوت بوده که بر فعالیت آنتی اکسیدانی آنها موثر بوده است. Giri و Ohshima [۲۷] بیان داشتند که ترکیب اسید آمینه پروتئین هیدرولیز نقش تعیین کننده بر فعالیت آنتی اکسیدانی آنها دارد. وجود اسید های آمینه آبدوست مانند گلیسین و پرولین در پپتید ژلاتین پوست ماهی کد اطلس و در پپتید ژلاتین حاصل از پوست اسکوئید به میزان زیادی بر فعالیت مهار رادیکال های آزاد آنها تاثیر داشت [۲۸، ۲۹]. اسید های آمینه آروماتیک مانند تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فنیل آلانین و اسید های آمینه هیدروفوب مانند والین، لوسئین، میتونین، گلیسین و آلانین برای

نقش آنتی اکسیدانی پپتید ضروری هستند [۳۰]. وجود اسید های آمینه آبدوست مانند پرولین، آلانین، والین و لوسئین در موقعیت N و اسید های آمینه تیروزین، والین، میتونین، لوسئین، ایزولوسئین، گلوتامین و تریپتوفان در موقعیت انتهایی C در [۱۶]. هیستیدین، لوسین، تیروزین، میتونین و سیستئین از طریق دادن پروتون به رادیکال های آزاد، آن ها را غیرفعال می کنند. اسیدهای آمینه آروماتیک (فنیل آلانین، تریپتوفان و تیروزین) با دادن الکترون، رادیکال های آزاد آن ها را به مولکول های پایدار تبدیل می کنند [۲۴]. ژلاتین بطور کلی غنی از اسید های آمینه گلیسین و پرولین بوده و وجود این اسید های آمینه در ژلاتین هیدرولیز بر خاصیت آنتی اکسیدانی آنها در فرآورده دریایی تاثیر می گذارد [۱۶]. از اینرو ژلاتین های هیدرولیز تولید شده از پوست فیل ماهی به خصوص نمونه های تولید شده با درصد های بالاتر آنزیم احتمالاً دارای پروفیل خاص اسید آمینه ای بوده که به فعالیت آنتی اکسیدانی آنها در اکتومیوزین تاثیر گذاشت. بطور کلی در ژلاتین وجود توالی سه تکراری گلیسین-پرولین-X- که X هریک از ۲۰ اسید آمینه می تواند باشد و توالی گلیسین-X-Z- که Z هر یکی از بیست اسید آمینه می تواند باشد نقش مهمی در تثبیت مولکول های آب مرتبط با پروتئین های میوفیبریل و جلوگیری از حرکت جمعیت های مختلف آبی عضله در زمان نگهداری در انجماد و در نتیجه کاهش تشکیل آب آزاد و دناتوراسیون پروتئین دارد [۱۱، ۱۶].

بررسی تاثیر ضد انجمادی در اکتومیوزین خرچنگ دراز آب شیرین قرار گرفته در معرض چرخه های انجماد-انجمادزدایی نشان داد که اکتومیوزین حاوی ژلاتین هیدرولیز دارای مقدار بالاتر گروه های سولفیدریل پس از شش چرخه انجماد-انجمادزدایی بودند. این تاثیر ژلاتین هیدرولیز تحت تاثیر اندازه پپتید ها ناشی از غلظت آنزیم قرار گرفت بطوریکه اکتومیوزین در حضور ژلاتین هیدرولیز تولید شده توسط با ۴ و ۵ درصد آنزیم دارای بالاترین گروه های سولفیدریل بوده است. کاهش تغییر در گروه های سولفیدریل بدلیل تشکیل پیوندهای دی سولفید از طریق اکسیداسیون گروه های سولفیدریل می باشد [۲]. مولکول میوزین دارای تعداد زیادی گروه های سولفیدریل است که در روی سر و دم مولکول قرار گرفته اند. زمانیکه تغییرات ساختاری

قرار گرفت. پپتیدهای با اندازه های مختلف در هیدرولیزات های مختلف تولید شده که تاثیر متفاوتی از خود نشان دادند. پپتید های ژلاتین هیدرولیز شده توانستند اکسیداسیون چربی را در عضله شاه میگوی آب شیرین کاهش داده و همچنین اکتومیوزین طبیعی حاوی آن دارای گروه های سولفیدریل کل و فعالیت آنزیمی بالاتر در مولکول میوزین داشته اند. این امر سبب کاهش افت کیفیت پروتئین خرچنگ گردید. از اینرو، ژلاتین هیدرولیز پوست فیل ماهی عملکرد دوگانه یعنی آنتی اکسیدان و ضد انجمادی در حفظ کیفیت پروتئین در زمان قرار گیری در معرض تغییرات دمایی در طول انجماد از خود نشان داد.

۶- منابع

- [1] Gonçalves, A.A., Nielsen, J., & Jessen, F. (2012). Quality of frozen fish. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Handbook of Meat, Poultry and Seafood Quality* (pp. 479-509). Ames: John Wiley & Sons, Inc.
- [2] Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2011). Impacts of freezing and frozen storage on quality changes of seafoods. In Devahastin, S. (Ed.), *Physicochemical Aspects of Food Engineering and Processing* (pp. 283-306). New York: CRC Press.
- [3] Lund, M.N., & Baron, C.P. (2010). Protein oxidation in foods and food quality. In L.H. Skibsted, J. Risbo, & M.L. Andersen, (Eds.), *Chemical Deterioration and Physical Instability of Food and Beverages* (pp. 33-69). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- [4] Medina, I., & Pazos, M. (2010). Oxidation and protection of fish. In E. Decker, R. Elias, & D. J. McClements (Eds.), *Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications* (pp. 91-120). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- [5] Estevez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Protein oxidation in frankfurters with increasing levels of added rosemary essential oil: effect on color and texture deterioration. *Journal of Food Science*, 70, C427-C432.
- [6] Boran, G., & Regenstein, J. M. (2010). Fish gelatin. *Advances in Food and Nutrition Research*, 60, 119-143.

در میوزین اتفاق می افتد، گروه های واکنشی سولفیدریل بیشتر در معرض قرار می گیرند. گروه های در معرض قرار سولفیدریل در زمان نگهداری فرآورده در انجماد یا تغییرات دمایی طی نگهداری در انجماد اکسید گردیده و منجر به تشکیل کراس لینک ها می گردد [۲]. افزودن ژلاتین هیدرولیز به اکتومیوزین منجر به کاهش تغییر گروه های سولفیدریل ناشی از چرخه های انجماد-انجمادزدایی گردید. این امر نشان دهنده نقش حفاظتی ژلاتین هیدرولیز پوست فیل ماهی در جلوگیری از اکسیداسیون گروه های سولفیدریل بوده است. Kittiphattanabawon و همکاران [۱۴] نیز نقش حفاظتی ژلاتین هیدرولیز پوست کوسه پوزه سیاه را بر جلوگیری از کاهش گروه های سولفیدریل در سوریمی ماهی سیم دریایی قرار گرفته در معرض شش چرخه انجماد-انجمادزدایی گزارش نمودند.

کاهش فعالیت Ca^{2+} -ATPase اکتومیوزین های خرچنگ دراز آب شیرین با افزایش سیکل انجماد-انجمادزدایی مشاهده گردید. اکتومیوزین بدون ژلاتین هیدرولیز بیشترین کاهش فعالیت آنزیم Ca^{2+} -ATPase را نشان داد. این حالت نشان داد که اکتومیوزین بدون وجود ماده ضد انجماد در برابر دناتوراسیون آسیب پذیر است. تشکیل کریستال های یخ و افزایش قدرت یونی در سیستم سبب دناتوراسیون میوزین و از هم گسیختگی کمپلکس اکتین-میوزین در زمان انجماد می گردد. دناتوراسیون و اگرگیشن در میوزین بخصوص ناحیه سر میوزین اتفاق می افتد که محل فعالیت آنزیم Ca^{2+} -ATPase است [۲]. اکتومیوزین افزوده شده با ژلاتین هیدرولیز از فعالیت Ca^{2+} -ATPase بالاتری بعد از شش سیکل انجماد-انجمادزدایی برخوردار بود که نشان دهنده نقش ضد انجمادی آن بوده است. پپتیدها با مقدار زیاد اسیدهای آمینه هیدروفیل با مولکول های آب اتصال یافته و لذا از مهاجرا مولکول های آب به سوی یکدیگر و تشکیل کریستال های یخ جلوگیری می شود. این امر منجر به ثبات ساختاری در پروتئین های میوفیبریل می گردد [۱۲].

۵- نتیجه گیری

در این مطالعه پوست فیل ماهی پرورشی جهت تولید ژلاتین هیدرولیز با فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد انجمادی مورد استفاده

- peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant. *Journal of Functional Foods*, 19, 753-764.
- [17] Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsani, A., Jing, L., Fengfeng, W., Yang, N., Xu, B., Jin, Z., & Xu, X. (2014). Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*, 7, 609-620.
- [18] Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27, 1256-1262.
- [19] Senphan, T., & Benjakul, S. (2014). Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. *Journal of Functional Foods*, 6, 147-156.
- [20] Benjakul, S., Seymour, T. A., Morrissey, M. T., & An, H. (1997). Physicochemical changes in Pacific whiting muscle proteins during iced storage. *Journal of Food Science*, 62, 729-733.
- [21] Buege, J. A., & Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 52, 302-310.
- [22] Ellman, G.L. (1959). Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 82, 70-77.
- [23] Wells, J. A., Werber, M. M., & Yount, R. G. (1979). Inactivation of myosin subfragment one by cobalt(II)/cobalt(III) phenanthroline complexes 2. Cobalt chelation of two critical SH groups. *Biochemistry*, 18, 4800-4805.
- [24] Opheim M., Slizyte R., Sterten H., Provan F., Larssen E., & Kjos N.P. (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmosalar*) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, doi:10.1016/j.procbio.2015.04.017.
- [25] Wang S.Y., Agyare K., & Damodaran S. (2009). Optimization of hydrolysis conditions and fractionation of peptide cryoprotectants from gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 11, 464 620-630.
- [26] Harnedy, P.A., & FitzGerald, R.J. (2012). Bioactive peptides from marine processing [7] Gomez-Guillen, M. C., Turnay, J., Fernandez-Diaz, M. D., Ulmo, N., Lizarbe, M. A., & Montero, P. (2002). Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: A comparative study. *Food Hydrocolloids*, 16, 25-34.
- [8] Sai-Ut, S., ongjareonrak, A., & Rawdkuen, S. (2012). Re-extraction, recovery, and characteristics of skin gelatin from farmed giant catfish. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 1197-1205.
- [9] Benjakul, S., Kittiphattanabawon, P., & Regenstein, J.M. (2012). Fish gelatin. In B.K. Simpson, L.M.L. Nollet, F. Toldrá, S. Benjakul, G. Paliyath, & Y.H. Hui, (Eds.), *Food Biochemistry and Food Processing* (pp. 388-405). West Sussex: John Wiley & Sons, Inc.
- [10] Karim, A. A., & Bhat, R. (2009). Fish gelatin: Properties, challenges, and prospects as an alternative to mammalian gelatins. *Food Hydrocolloids*, 23, 563-576.
- [11] Damodaran, S. (2007). Inhibition of ice crystal growth in ice cream mix by gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 10918-10923.
- [12] Cheung, I.W.Y., Liceaga, A.M., & Li-Chan, E.C.Y. (2009). Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates as cryoprotective agents in frozen Pacific cod fillet mince. *Journal of Food Science*, 74, 588-594.
- [13] Chen, N.J., Morikawa, J., & Hashimoto, T. (2005). Effect of amino acids on the eutectic behavior of NaCl solutions studied by DSC. *Cryobiology*, 50, 264-272.
- [14] Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W., & Shahidi, F. (2012). Cryoprotective effect of gelatin hydrolysate from blacktip shark skin on surimi subjected to different freeze-thaw cycles. *LWT – Food Science and Technology*, 47, 437-442.
- [15] Benajakul, S., Yarnpakdee, S., Senphan, T., Halldorsdottir, S. M., & Kristinsson, H. G. (2014). Fish protein hydrolysates: production, bioactivities, and applications. In H. G. Kristinsson (Ed.), *Antioxidants and functional components in aquatic foods* (pp. 237-282). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.
- [16] Nikoo, M., & Benjakul, S. (2015). Potential application of sea food-derived

- [29] Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 581–587.
- [30] Aluko, R. (2015). Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. In F. Shahidi (Ed.), *Handbook of antioxidants for food preservation* (pp. 105–140). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4, 6–24.
- [27] Giri, A., & Ohshima, T. (2012). Bioactive marine peptides: Nutraceutical value and novel approaches. *Advances in Food and Nutrition Research*, 65, 73–105.
- [28] Ngo, D., Qian, Z., Ryu, B., Park, J. W. & Kim, S., (2010). In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *Journal of Functional Foods*, 2, 107–117.

Effect of enzyme concentration on cryoprotective activity of gelatin hydrolysates in freshwater crayfish actomyosin subjected to freezing and thawing process

Oladrabiee, A. ¹, Nikoo, M. ^{2*}, Rahmanifarah, K. ³

1. MSc, Urmia Lake Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan

2. Assistant professor, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan

3. Assistant professor, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan

(Received: 2017/09/20 Accepted:2017/10/11)

In this study, gelatin hydrolysates were produced from the skin of farmed beluga sturgeon and their cryoprotective effects on freshwater crayfish actomyosin subjected to six freeze-thaw cycles was investigated. Gelatin was extracted from beluga sturgeon skin and hydrolyzed with alcalase (1-5%). H-5:100 had the higher 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobios-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical scavenging activities compared with H-1:100-4:100 ($P < 0.05$). Lipid oxidation was impeded as evidenced by the lower formation of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS) after six freeze-thaw cycles. The decrease in Ca^{2+} -ATPase activity and total sulfhydryl group content was noticeable in natural actomyosin after six freeze-thaw cycles ($P < 0.05$). Natural actomyosin incorporated with H-5% had higher Ca^{2+} -ATPase activity with the coincidental higher content of total sulfhydryl groups, indicating protection of myosin heavy chain against freeze denaturation. H-5:100 consisted of numerous peptides and those corresponding to molecular mass of 1436.72, 1579.82, 1627.74, 1716.80 and 2135.07 Da were the dominant peptides as determined by MALDI-TOF MS spectrometry. Results indicated the potential of H-5:100 with specific size of peptides in protection of freshwater crayfish natural actomyosin during freeze-thaw cycles.

Keywords: Crayfish, Natural actomyosin, Freeze-thaw cycle, Antioxidant activity, Gelatin hydrolysates

* Corresponding Author E-Mail Address: m.nikoo@urmia.ac.ir