مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

مقایسه جامع فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده از ضایعات ماهی، مرغ و میگو با استفاده از آنزیم فلاورزیم

سهیل ریحانی پول[1*]، سکینه یگانه[2]

۱- دانش آموخته دکتری تخصصی، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸

کلمات کلیدی:

ضایعات میگو،

فلاورزایم،

پپتیدهای زیست‌فعال،

فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.307

* مسئول مکاتبات:

Soheylreyhani@gmail.com

چکیده

با توجه به نگرانی‌های موجود در زمینه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در صنایع غذایی، شناسایی و بهره‌گیری از موادی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ضروری به نظر می‌رسد. ضایعات پروتئینی یکی از این مواد هستند که با روش‌های مختلف می‌توان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی از آن‌ها استخراج کرد. هدف از تحقیق حاضر نیز مقایسه و ارزیابی جامع فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده از سه منبع ضایعات شامل ماهی (FPH)، مرغ (PPH) و میگو (SPH) با آنزیم فلاورزایم است. لذا پپتیدهای زیست‌فعال پس از تولید از این سه منبع از نظر تمام آزمون‌های آنتی‌اکسیدانی رایج و غیر رایج در صنعت غذا مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفتند. نتایج نشان داد پپتیدهای تولیدشده از این سه منبع (با آنزیم و درجه آبکافت یکسان) از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت هستند. در آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS، قدرت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید و کلاته‌کردن فلزات، SPH نسبت به دو پروتئین دیگر به صورت معنی‌داری در بالاترین سطح قرار داشت ($p<0/05$). مقادیر این چهار شاخص در SPH به ترتیب ۱/۳۸±۸۷/۴۵، ۰/۵۹±۷۹/۲۶، ۱/۶۲±۹۴/۵۶ و ۰/۳۷±۷۱/۴۹ درصد اندازه‌گیری شد. در مورد قدرت کاهندگی یون فریک و فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل، بین SPH و FPH اختلاف معنی‌داری ثبت نشد ($p>0/05$). همچین از نظر شاخص فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS، FPH و PPH اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند (به ترتیب ۰/۸۵±۶۹/۱۵ و ۱/۹۳±۶۸/۴۴ درصد). بر اساس برایند آزمون‌های مورد بررسی، در تحقیق حاضر پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده از ضایعات میگو (SPH) دارای بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی بودند. پپتیدهای حاصل از آبکافت ضایعات ماهی (FPH) در رتبه دوم قرار گرفتند. تقریبا در تمامی آزمون‌ها، کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به پپتیدهای حاصل از ضایعات مرغ (PPH) بود.

۱- مقدمه

در مراکز تولید و فراوری دام، طیور و آبزیان، ضایعات جز جدانشدنی مراحل فراوری می‌باشند. در کشتارگاه‌های طیور جهت بسته‌بندی و پاک‌کردن مرغ حدود ۳٤ درصد [۱] از وزن از این جاندار شامل امعا و احشا، سر، پر و ... دور ریز می‌شود. همچنین در مراکزی که مرغ را فیله و بسته‌بندی می‌کنند، روزانه حجم زیادی از استخوان و پوست نیز به عنوان ضایعات تولید می‌شود. در مورد ماهی، به ویژه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان، با افزایش میزان مصرف جامعه به سمت فیله بسته‌بندی‌شده و متعاقبا افزایش مراکز فراوری، روزانه مقادیر زیادی از ضایعات شامل سر، امعا و احشا، پوست و... تولید می‌شود که در مجموع حدود ۲۰ درصد وزن جاندار را تشکیل می‌دهند. در مورد میگو هم چنین است و در مراکزی که این جاندار فراوری و بسته‌بندی می‌شود، ضایعات زیادی از جمله پوسته، سر، دم و... تولید می‌گردد.

این ضایعات در بدترین حالت مدیریت، ممکن است دورریز شده و محیط زیست را آلوده کنند. در حالت دیگر ممکن است به صورت خام در تغذیه حیوانات خانگی مورد استفاده قرار گیرند. اما طی چند سال اخیر این ضایعات به شکل پودر در می‌آیند و در صنعت تغذیه دام، طیور و آبزیان تحت عنوان پودر ماهی و ... مورد استفاده قرار می‌گیرند. اما می‌توان با استفاده از تکنولوژی روز، از این ضایعات فراورده‌هایی با ارزش افزوده بالاتری مانند سیلاژ [۱] و پپتیدهای زیست‌فعال [۲] تولید کرد. سیلاژ یک فراورده تخمیری است که به واسطه قیمت پائین‌تر و محتوی پروتئین مناسب می‌تواند به عنوان جایگزینی برای پودر ماهی در صنعت تغذیه دام، طیور و آبزیان مطرح باشد. پپتیدهای زیست‌فعال حاصل آبکافت ضایعات پروتئینی به دو روش شیمیایی و یا بیوشیمیایی هستند. طی این فرایند پروتئین‌ها به پپتیدها و آمینواسیدهای آزاد تبدیل می‌شوند. در روش بیوشیمیایی از آنزیم‌های با منشا میکروبی (آلکالاز، فلاورزایم، پروتامکس، نئوتراز)، حیوانی (پپسین، تریپسین، کیموتریپسین) و گیاهی (بروملاین، پاپائین) استفاده می‌شود که در این بین آنزیم‌های میکروبی به دلیل خواص پروتئولیتیکی مطلوب، پایداری در دما و pH های بالاتر نسبت به سایر آنزیم‌ها برتری دارند. پپتیدهای زیست‌فعال خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی مناسبی از خود نشان می‌دهند [۲-۸].

بسته به مطلوبیت خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها، کارائی آن‌ها در صنایع غذایی انسانی و دامی مشخص می‌شود. فارغ از شرایط فرایند آبکافت (دما، نوع آنزیم، pH، نسبت آنزیم به سوبسترا و...)، از مواردی که خواص این پپتیدها را تحت تاثیر قرار می‌دهند، نوع سوبسترا و درجه آبکافت می‌باشد [٤، ۵ و ۹].

طی دهه اخیر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال بسیار مورد پژوهش و توجه قرار گرفته است. چرا که این پپتیدها یک آنتی‌اکسیدان طبیعی هستند و مضرات و نگرانی استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک را به دنبال ندارند. تاکنون در کشور و جوامع بین‌الملل از منابع مختلف پروتئینی و ضایعات، پپتیدهای زیست‌فعال تولید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها مورد سنجش قرار گرفته است. در مطالعه شعبان‌پور و همکاران (۱۳۹٦) فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولیدشده از ضایعات میگو مورد بررسی قرار گرفت و نتایج مطلوبی گزارش گردید [۱۰]. در مطالعات بسیاری فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولیدشده از ضایعات آبزیان [۱۱،۸،٦،۳،۲] بررسی و نتایج نشان داده این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در سطح مناسبی قرار دارند.

در پژوهش‌های انجام‌شده، تاکنون پژوهشی همه آزمون‌های بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی را برای یک نوع پپتید انجام نداده و معمولا به دو یا سه آزمون بسنده کرده‌اند. ضمن اینکه در هیچ مطالعه‌ای فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولیدشده از چند منبع پروتئینی (در درجه آبکافت یکسان) با هم قیاس نشده است. لذا پژوهش حاضر قصد دارد در این تحقیق به صورت جامع همه آزمون‌های ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، فعالیت کاهندگی یون فریک، فعالیت کلاته‌کردن فلزات، فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS، فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل، فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید) پپتیدهای تولیدشده از سه منبع ضایعات یعنی ماهی، مرغ و میگو را با یکدیگر مقایسه کند (در درجه آبکافت‌های یکسان). تا مشخص شود آیا تغییر منبع موجب تغییر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال می‌شود یا خیر. و در صورت مثبت‌بودن پاسخ، معلوم شود کدام منبع در این زمینه کاراتر است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سوبسترا و آنزیم

ضایعات مرغ (سر، امعا و احشا) و ماهی قزل‌الای رنگین‌کمان (سر، امعا و احشا) از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ساری و ضایعات میگو وانامی[1] (سر، پوسته، دم) از یکی از مراکز فراوری این آبزی در استان گلستان تهیه و در مجاورت زنجیره سرد به آزمایشگاه فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. آنزیم مورد استفاده در این پژوهش، آنزیم میکروبی فلاورزایم (میزان فعالیت: ۱/۵ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم) است که از نمایندگی شرکت نووزایم[2] دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تولید پپتیدهای زیست‌فعال (پروتئین‌های آبکافتی)

تولید پروتئین‌های آبکافتی در تحقیق حاضر با استفاده از سه سوبسترا (ضایعات ماهی، مرغ و میگو) انجام شد. به منظور تولید این نوع پروتئین، ابتدا در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه ضایعات قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷/٤ به ارلن اضافه گردید. در مرحله بعد ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت ضایعات غیرفعال شوند. پس از سپری‌شدن این زمان به ارلن اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شود. در مرحله بعد، آنزیم فلاورزایم (به میزان ۳۰ واحد آنسون به ازای یک کیلوگرم) به محتویات ارلن اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (مناسب برای فعالیت آنزیم فلاورزایم) منتقل و یک ساعت در این شرایط انکوبه شد تا فرایند آبکافت پروتئین‌ها انجام شود. بعد از این زمان‌ها، به منظور قطع واکنش آبکافت، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این دما آنزیم فلاورزایم غیرفعال شد. پس از این مدت و خنک‌شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد [۱۲-۱٤]. نتیجه فرایند آبکافت با سه سوبسترا تولید سه نوع پودر آبکافتی بود (FPH[3]، PPH[4] و SPH[5]). تولید این پودرها از هر منبع در سه تکرار انجام شد.

۲-۳- درجه آبکافت فرایند

بعد از پایان فرایند آبکافت (یک ساعت)، محلول تری‌کلرو-استیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد با نسبت برابر به مایع رویی افزوده شد و محلول حاصل با دور g ٦۷۰۰ در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید به روش بیورت [۱۵] سنجیده شد. درجه آبکافت فرایند از رابطه زیر محاسبه گردید [۱٦].

درجه آبکافت (٪) =

(نیتروژن کل نمونه/نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک‌اسید) ×۱۰۰

برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

۲-٤- سنجش میزان پروتئین در سه سوبسترا و پودرهای آبکافتی حاصل

۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات‌سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم‌شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی-لیتر آب مقطر و سود ۵۰ درصد اضافه گردید و روی حرارت قرار داده شد. سپس۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به طوری که انتهای لوله متصل به رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ور گردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع شده و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. در مرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچگونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشد. در پایان محتوای ارلن توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد [۱۷ و ۱۸]. میزان پروتئین خام از رابطه زیر به دست آمد.

1. *Litopenaeus vannamei*
2. Novozyme
3. Fish Protein Hydrolyzed
4. Poultry Protein Hydrolyzed
5. Shrimp Protein Hydrolyzed

۱۰۰ × ۱٤× نرمالیته اسید× حجم اسید مصرفی برای نمونه = **درصد نیتروژن**
۱۰۰۰ × گرم نمونه خشک /
(فاکتور پروتئین) ٦/۲۵ × درصد نیتروژن = **درصد خام**

۲-۵- آزمون‌های بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۲-۵-۱- قدرت مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دیفینیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

ابتدا پپتیدهای زیست‌فعال تا غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب حل شدند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از پپتیدهای محلول به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار رادیکال DPPH در اتانول ۹۹/۵۰ اضافه گردید. محلول حاصل با سرعت بالا هموژن شد و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه و متعاقب جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سرانجام قدرت پپتیدها برای مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد [۱۹].

= قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH
۱۰۰× (جذب شاهد/ جذب نمونه)

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پپتیدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولوئن[6] و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول[7] در غلظت ۲۰۰ppm مقایسه شد.

۲-۵-۲- قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک)

ابتدا یک میلی‌لیتر پپتید با غلظت ٤۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=٦/٦ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱٪ وزنی – حجمی پتاسیم فریسیانید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه شد و بعد از این مدت با اضافه‌کردن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد، واکنش خاتمه یافت. در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از این مخلوط با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک‌کلرید ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بالاتر پپتیدها است [۲۰]. در اینجا هم برای مقایسه بهتر، از آنتی‌اکسیدان‌های بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

۲-۵-۳- فعالیت کلاته‌کردن فلزات

ابتدا محلول ٤۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پپتیدهای زیست‌فعال تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن به ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس به محلول حاضر ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب محلول در طول موج ٥٦۲ نانومتر قرائت و فعالیت کلاته‌کردن از طریق رابطه زیر محاسبه گردید [۲۱].

= فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات (٪)
۱۰۰× [جذب شاهد/ (جذب نمونه در طول موج ٥٦۲ نانومتر-۱)]

برای ساخت شاهد، به جای نمونه پروتئینی از آب مقطر استفاده شد. از بوتیل هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm برای مقایسه استفاده گردید.

۲-٤-۵- فعالیت مهار رادیکال ۲،۲- آزینو- بیس- ۳- اتیل بنزوتیازولین-٦-سولفونیک‌اسید (ABTS)

به منظور اندازه‌گیری این خاصیت در ابتدا محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/٤۵ میلی‌مولار تهیه و به مدت ۱٦ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. پس از سپری‌شدن این مدت، محلول تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳٤ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (پپتیدهای زیست‌فعال با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه زیر تعیین و بر حسب درصد گزارش شد [۲۲].

= قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS
۱۰۰× [جذب نمونه شاهد/ (جذب نمونه– جذب نمونه شاهد)]

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS پپتیدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm مقایسه شد.

۲-۵-۵- قدرت دفع رادیکال آزاد هیدروکسیل

ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن آبدار (با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۲۰۰ میکرولیتر دی‌اکسی‌ریبوز (با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پپتیدهای زیست‌فعال (با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و یک میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار

6 . BHT
7. BHA

(pH=۷/٤) مخلوط شدند. در مرحله بعد به این ترکیب، ۲۰۰ میکرولیتر H_2O_2 (با غلظت ۱۰ میلی‌مول) اضافه و مخلوط حاصل ٤ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار گرفت. پس از این زمان، یک میلی‌لیتر TCA ۲/۸ درصد و یک میلی‌لیتر TBA ۲۰ میلی‌مول به این مخلوط اضافه شد. این نمونه ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و نهایتا پس از سردشدن جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. نتایج به شکل درصد مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد. لازم به ذکر است که در نمونه شاهد به جای پپتید از آب مقطر استفاده شد [۲۳].

=قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (٪)

۱۰۰× (جذب شاهد/جذب نمونه– ۱)

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پپتیدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm مقایسه شد.

۲-۵-٦- فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید

ابتدا ٤۰۰ میلی‌گرم از پپتیدهای زیست‌فعال در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مول (pH=۷)، ۱/۳ میلی‌لیتر لینولئیک‌اسید و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۵ درصد حل شد. سپس حجم این محلول با آب مقطر به ۲۵ میلی‌لیتر رسانده شد. این مخلوط در یک لوله آزمایش ۳۰ میلی‌لیتری ریخته (با درپوش پیچی) و در دمای ٤۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. شرایط اتاق تاریک با بسته‌بندی با فویل آلومینیوم و کاغذ ضخیم‌تر حفظ شد. درجه اکسیداسیون اسید لینولئیک با استفاده از روش تیوسیانات فریک اندازه گیری شد [۲٤]. به ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوظ واکنش، ٤/۷ میلی‌لیتر اتانول ۰/۷۵، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم تیوسانات ۳۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر فروزکلرید ۲۰ میلی‌مول محول در HCL (۳/۵ درصد) اضافه شد. پس از سه دقیقه جذب محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مول (pH=۷) به عنوان شاهد و از آلفاتوکوفرول به عنوان آنتی‌اکسیدان استاندارد استفاده شد. از رابطه زیر جهت محاسبه فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک-اسید استفاده گردید [۲۵].

= فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید (٪)

۱۰۰× (جذب شاهد/جذب نمونه) –۱

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی اجرا و به منظور آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) آنالیز شدند و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت.

۳- نتایج

۳-۱- درجه آبکافت و میزان پروتئین سوبسترا و پودرهای آبکافتی

مطابق جدول ۱، سوبستراهای مورد استفاده (ضایعات ماهی، مرغ و میگو) از حدود ۱٤/۵ تا ۱۵ درصد پروتئین داشتند. این مقدار پروتئین با استفاده از روش آنزیمی جدا و پودرهای آبکافتی تولید شدند. این پودرها از نظر میزان پروتئین و درجه آبکافت اختلاف معنی‌داری ارائه نکردند ($p>۰/۰۵$). میزان پروتئین در پودرهای تولیدشده (۱/٤۸±۸۰/۲۷، ۱/۱۹±۷۹/۸٦ و ۰/۸٤±۷۹/۳۵ درصد) نسبت به سایر مطالعات انجام‌شده از مطلوبیت مناسبی برخوردار است. میزان نیتروژن (پروتئین) در پودرهای آبکافتی تا حد زیادی تحت تاثیر میزان پروتئین سوبسترا و شرایط واکنش آبکافت (دما، زمان، pH، نوع آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا) قرار دارد. پودر آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی خاویاری[8] با استفاده از آنزیم فلاورزایم ٦۹/۰۷ درصد پروتئین داشت [۱۳]. پودر آبکافتی تولیدشده از ضایعات مرغ با استفاده از آلکالاز، ۸٤/٦٦ درصد پروتئین داشت [۲٦]. در تحقیقی ضایعات ماهی با استفاده از فلاورزایم آبکافت و پودری با ۷۳/۵۱ درصد پروتئین تولید شد [۲۷]. پودر آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو با استفاده از آنزیم الکالاز، دارای ٤۲/۲ درصد پروتئین بود [۲۸]. با توجه به شرایط یکسان فرایند آبکافت هر سه منبع (دما، زمان، pH، نوع آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا) و همچنین مقادیر تقریبا برابر پروتئین در سوبستراها، تولید سه پودر پروتئین آبکافتی با درصد برابر نیتروژن (پروتئین) و درجه آبکافت دور از انتظار نیست و در تحقیق حاضر چنین موردی ثبت شد.

8. *Acipenser persicus*

Table 1 Composition of substrates and proteins

	Protein (%)	DH (%)
Fish wastes	14.35±0.23	
Poultry wastes	15.03±0.41	
Shrimp wastes	14.59±0.76	
FPH	80.27±1.48[a]	10.53±0.67[a]
PPH	79.86±1.19[a]	10.34±1.26[a]
SPH	79.35±0.84[a]	10.82±1.55[a]

*The same letters indicate that there is no significant difference between the data in each column ($p>0.05$).

۳-۲- بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی (پپتیدهای زیست‌فعال)

۳-۲-۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که حداکثر جذب را در ۵۱۷ نانومتر در اتانول نشان می دهد. وقتی که این رادیکال با یک ماده دهنده پروتون مواجه می‌شود، با تغییر رنگ از بنفش به زرد از بین می‌رود و جذب آن کاهش می‌یابد. جدول ۲، فعالیت مهار رادیکال DPPH را در سه پروتئین آبکافتی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، این شاخص در SPH (۱/۳۸±۸۷/۴۵ درصد) به طور معنی‌داری از دو پروتئین دیگر (PPH و FPH) بیشتر است ($p<0/05$). ضمن اینکه FPH در این زمینه از PPH کاراتر و قوی‌تر است ($p<0/05$). فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در SPH آنقدر بالا بود که اختلاف معنی‌داری با BHA (آنتی‌اکسیدان سنتتیک) نداشت ($p>0/05$).

Table 2 DPPH radical inhibition activity in FPH, PPH and SPH

Proteins and Antioxidants	DPPH radical inhibition activity (%)
FPH	72.51±1.16[c]
PPH	53.29±0.19[d]
SPH	87.45±1.38[a]
BHA	88.36±0.62[a]
BHT	82.02±1.04[b]

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

در پژوهشی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو با آنزیم آلکالاز بررسی شد، بالاترین درصد قدرت دفع رادیکال مذکور، ۹۷/۹ درصد گزارش شد که حدود ۱۰ درصد از قدرت دفع SPH در تحقیق حاضر بیشتر است [۷]. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلا با استفاده از آنزیم فلاورزایم (با درجه آبکافت ۲۳/۱۲ درصد)، ۷۶/۳۳ درصد گزارش شد [۲۹] که تقریبا از FPH پژوهش حاضر بیشتر است. در تحقیقی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کاتلا[9] با آنزیم فلاورزایم مورد ارزیابی قرار گرفت، شاخص مهار رادیکال آزاد DPPH، ۷۰/۴۵ درصد ثبت شد [۳]. پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات (سر و دم) ماهی آزاد[10] با استفاده از آنزیم تریپسین که درجه آبکافتی معادل ۶۱/۷۳ درصد داشت، توانست ۹۳/۹۹ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را حذف کند [۳۰]. قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین تولیدشده از بافت ماهی تیلاپیا[11] با استفاده از آنزیم فلاورزایم معادل ۷۰/۲ درصد بود که در مقایسه با قدرت حذف رادیکال FPH و SPH (تحقیق حاضر) کمتر می‌باشد [۳۱]. پروتئین آبکافتی تولیدشده از استخوان مرغ[12] با استفاده از آنزیم فلاورزایم در بهترین حالت (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) دارای قدرت مهاری معادل ۲۱/۳ درصد بود [۳۲]. پروتئین آبکافتی حاصل از سر و اندرونه ماهی ساردین[13] با استفاده از آلکالاز که درجه آبکافت آن معادل ۱۰/۱۶ درصد بود، توانست ۴۱ درصد از رادیکال‌های آزاد DPPH را مهار کند [۵]. در تحقیقی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگوی سفید هندی[14] با آنزیم فلاورزایم بررسی شد، فعالیت مهار رادیکال DPPH این پروتئین، ۳۶/۳ درصد گزارش گردید [۱۱] که در مقایسه با این قدرت در SPH (تحقیق

9. *Catla catla*
10. *Salmo salar*
11. *Oreochromis niloticus*
12 . *Gallus domesticus*
13. *Sardinella aurita*
14 *Penaeus indicus*

حاضر) بسیار کمتر می‌باشد. پروتئین آبکافتی تولیدشده از عضله مرغ با استفاده از آنزیم فلاورزایم در بهترین حالت توانست ٤٠ تا ٦٠ رادیکال‌های DPPH را حذف کند [۳۳]. قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در پروتئین تولیدشده از سینه مرغ (غلظت ۳ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیش از ۸۰ درصد گزارش شد [۳٤].

۳-۲-۲- فعالیت کلاته کردن فلزات

در جدول ۳ فعالیت کلاته‌کردن فلزات پروتئین‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک ارائه شده است. مطابق این جدول بین سه نوع پروتئین از نظر این شاخص اختلاف معنی‌داری وجود دارد و SPH بیشترین (۰/۳۷±۷۱/٤۹ درصد) میزان فعالیت کلاته‌کردن را داراست ($p<۰/۰۵$). در بین این سه پروتئین، FPH از نظر شاخص مذکور در رتبه دوم قرار گرفت و کارائی بالاتری از PPH نشان داد ($p<۰/۰۵$).

Table 3 Metals chelating activity in FPH, PPH and SPH

Proteins and Antioxidants	Metals chelating activity (%)
FPH	62.33 ± 0.14^{c}
PPH	45.91 ± 2.26^{d}
SPH	71.49 ± 0.37^{b}
BHA	86.11 ± 1.53^{a}
BHT	85.62 ± 1.12^{a}

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

فعالیت کلاته‌کردن فلزات در پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی گیش زردخط[15] با استفاد از آنزیم فلاورزایم (درجه آبکافت ۱۵ درصد) بیش از ۸۵ درصد گزارش شد [٤]. در تحقیق ریحانی پول و همکاران (۱۳۹۵) از بین سه نوع پروتئین آبکافتی تولیدشده با سه آنزیم (سوبسترا: ضایعات ماهی قزل-آلا)، پروتئین آبکافتی تولیدشده با آنزیم فلاورزایم بیشترین فعالیت (۹۱/۱۸ درصد) کلاته‌کردن فلزات را داشت [۲۹]. در تحقیق بخشان و همکاران (۱۳۹۳)، پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی آزاد با آنزیم تریپسین دارای فعالیت کلاته‌کنندگی معادل ۱۲/۸ درصد بود [۳۰] که بسیار کمتر از این فعالیت در پروتئین‌های تولیدشده در تحقیق حاضر است. فعالیت کلاته‌کردن فلزات توسط پروتئین آبکافتی تهیه‌شده از فیله ماهی[16] با استفاده از آنزیم پپسینی که از ماهی تن اسکیپجک استخراج شده بود، در درجه آبکافت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به ترتیب ٤۵/۹، ۵۱/۳ و ۵۸/۱ درصد بود [۳۵]. این ارقام تقریبا با شاخص کلاته‌کنندگی PPH و FPH در تحقیق حاضر معادل هستند.

۳-۲-۳- قدرت کاهندگی یون فریک

ظرفیت کاهندگی یک ترکیب معین ممکن است به عنوان شاخص قابل توجهی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه آن باشد. در این تست، حضور آنتی‌اکسیدان موجب کاهش کمپلکس یون فریک/فریسیانید به شکل یون فروز شده و بسته به قدرت کاهندگی هر ترکیب، رنگ زرد محلول آزمایش به سایه سبز و آبی تغییر خواهد کرد. جدول ٤ قدرت کاهندگی پروتئین‌های تولیدشده از سه منبع ضایعات را نشان می‌دهد. مطابق جدول زیر، FPH و SPH از نظر این شاخص اختلاف معنی‌داری ندارند ($p>۰/۰۵$). همچنین این دو پروتئین از نظر قدرت کاهندگی، مقادیر برابری با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک ارائه کردند ($p>۰/۰۵$). در بین پروتئین‌ها، کمترین قدرت کاهندگی (جذب ۰/٤۸٤ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) مربوط به PPH بود ($p<۰/۰۵$).

این شاخص در پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کاتلا با آنزیم فلاورزایم حدود ۰/٦ (جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر) گزارش شد [۳]. قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی آزاد با استفاده از آنزیم تریپسین، جذب ۰/٤۲ در طول موج ۷۰۰ نانومتر بود [۳۰] که نسبت به این شاخص در پروتئین‌های FPH، PPH و SPH (تحقیق حاضر) در سطح پائین‌تری قرار دارد. در تحقیقی که ضایعات ماهی قزل‌آلا با استفاده از آنزیم فلاورزایم آبکافت شد، پودر حاصل، قدرت کاهندگی معادل جذب ۰/۷٦۱ در طول موج ۷۰۰ نانومتر داشت [۲۹].

این میزان قدرت کاهندگی از PPH بیشتر و از قدرت کاهندگی FPH و SPH پژوهش حاضر کمتر می‌باشد. در تحقیقی که قدرت کاهندگی دو پروتئین تولیدشده از استخوان مرغ و ماهی با استفاده از آنزیم فلاورزایم مقایسه شد، این قدرت در پروتئین تولیدشده از استخوان ماهی بیشتر از پروتئین

15. *Selaroides leptolepis*
16. *Nemipterus hexodon*

تولیدشده از استخوان مرغ بود. ضمن اینکه قدرت کاهندگی هر دو پروتئین کمتر از جذب ۰/۲ در طول موج ۷۰۰ نانومتر گزارش شد [۳۲].

Table 4 Reducing power of FPH, PPH and SPH

Proteins and Antioxidants	Reducing power (absorption at a 700 nm)
FPH	0.899 ± 0.018^{a}
PPH	0.484 ± 0.021^{b}
SPH	0.908 ± 0.012^{a}
BHA	0.911 ± 0.029^{a}
BHT	0.905 ± 0.04^{a}

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

قدرت کاهندگی پروتئینی که از آبکافت سینه مرغ با استفاده از پاپائین تولید شد (در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر می‌لیتر) معادل جذبی بیشتر از ۰/۵ در طول موج ۷۰۰ نانومتر بود [۳٤].

۳-۲-٤- قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS

بررسی قدرت مهار رادیکال ABTS به عنوان شاخصی از میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور گسترده‌ای برای آنتی‌اکسیدان‌های مختلف استفاده می‌شود. ABTS یک رادیکال آزاد نسبتا پایدار است که به راحتی بوسیله یک آنتی-اکسیدان حذف و یا کاهش می‌یابد [۳٦]. با کاهش رنگ رادیکال ABTS ، پروتئین‌های آبکافتی از منابع مختلف به عنوان آنتی‌اکسیدان‌های بالقوه شناخته شده‌اند [۳۷ و ۳۸]. جدول ۵ فعالیت مهار رادیکال ABTS پروتئین‌ها و آنتی-اکسیدان‌های سنتتیک را نشان می‌دهد. مطابق جدول در بین پروتئین‌ها، بالاترین میزان این شاخص (۰/۵۹±۷۹/۲٦ درصد) مربوط به SPH است ($p<۰/۰۵$). این پروتئین از نظر قدرت مهار رادیکال ABTS با آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT تقریبا برابر است ($p>۰/۰۵$). FPH و PPH از نظر قدرت مهار رادیکال ABTS اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند ($p>۰/۰۵$).

Table 5 ABTS free radical scavenging activity (%)

Proteins and Antioxidants	ABTS free radical scavenging activity (%)
FPH	69.15 ± 0.85^{c}
PPH	68.44 ± 1.93^{c}
SPH	79.26 ± 0.59^{b}
BHA	92.18 ± 1.11^{a}
BHT	80.35 ± 1.74^{b}

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

در مطالعه یگانه و همکاران (۱۳۹۹) پروتئینی که از آبکافت سر ماهی کپور معمولی[17] با استفاده از آنزیم آلکالاز تولید شد، در مطلوب‌ترین شرایط قدرت مهاری (رادیکال ABTS) معادل ۷۹/٦٤ درصد داشت [٦]. بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS در پروتئینی که از امعا و احشا ماهی کپور معمولی تولید شد، ۷۷/۳ درصد گزارش گردید [۸]. پروتئینی که از آبکافت بافت ماهی تیلاپیا با استفاده از فلاورزایم تولید شد، قدرت مهار رادیکال ABTS آن معادل ۸۸/۱۳ درصد ثبت شد [۳۱] که از قدرت هر سه پروتئین تحقیق حاضر بیشتر می‌باشد.

۳-۲-۵- فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل

رادیکال هیدروکسیل یک اکسیدان بسیار قوی برای لیپیدهاست. به نظر می‌رسد توانایی خنثی‌سازی رادیکال‌های هیدروکسیل توسط آنتی‌اکسیدان به طور مستقیم با جلوگیری از انتشار فرآیند پراکسیداسیون لیپید ارتباط دارد [۳۹]. جدول ٦ قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین‌های آبکافتی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک را نشان می‌دهد. همانطور که در جدول زیر مشاهده می‌شود، در بین پروتئین‌های آبکافتی کمترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (۱/۰٦±۵۲/۳٤ درصد) مربوط به PPH است ($p<۰/۰۵$). SPH و FPH از نظر این شاخص فاقد اختلاف معنی‌دار بودند ($p>۰/۰۵$) و در سطوحی بالاتر از PPH قرار داشتند.

17. *Cyprinus carpio*

Table 6 OH free radical scavenging activity (%)

Proteins and Antioxidants	OH free radical scavenging activity (%)
FPH	81.63±1.22[c]
PPH	52.34±1.06[d]
SPH	82.57±2.18[c]
BHA	94.59±1.31[a]
BHT	90.21±1.96[b]

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

پروتئینی که از استخوان مرغ با آنزیم فلاورزایم تولید شد، در مطلوب‌ترین حالت قدرت مهاری معادل (حدود) ۱۲ درصد داشت که نسبت به PPH (تحقیق حاضر) دارای قدرت مهار کمتری می‌باشد [۳۲]. پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از دو منبع یعنی فیله مرغ و ماهی با استفاده از آنزیم فلاورزایم به ترتیب قدرت مهاری معادل ۳ تا ۱۲ درصد و ۳۰ تا ۵۵ درصد داشتند [۳۳].

۳-۲-٦- فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید

جدول ۷ فعالیت مهار پراکسیداسیون لیئولئیک‌اسید پروتئین‌های آبکافتی و آلفاتوکوفرول (به عنوان استاندارد) را نشان می‌دهد. مطابق جدول هر سه پروتئین از نظر شاخص مورد بررسی اختلاف معنی‌داری دارند ($p<۰/۰۵$) و SPH بالاترین فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید را داراست (۹٤/٥٦±۱/٦۲ درصد). FPH (۷۵/٤۲±۲/۳۱ درصد) و PPH (٤۹/٦۸±۳/۱۱ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که SPH و a-tocopherol در این زمینه اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند ($p>۰/۰۵$).

Table 7 Linoleic acid peroxidation inhibition activity (%)

Proteins and Antioxidants	Linoleic Acid Peroxidation Inhibition Activity (%)
FPH	75.42±2.31[b]
PPH	49.68±3.11[c]
SPH	94.56±1.62[a]
a-tocopherol	95.59±2.94[a]

*Different letters indicate a significant difference between the data ($p<0.05$).

پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کاتلا با استفاده از آنزیم فلاورزایم تا حدود ۵۰ درصد توانست پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید را مهار کند [۳]. فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید دو پروتئین آبکافتی تولیدشده از دو منبع یعنی استخوان مرغ و ماهی با استفاده از آنزیم فلاورزایم (در بهترین حالت) به ترتیب جذبی حدود ۰/۳ و کمتر از ۰/۲ در طول موج ۵۰۰ نانومتر داشتند [۳۲]. پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از فیله ماهی با استفاده از سه آنزیم پاپائین، پپسین و تریپسین (در مطلوب‌ترین حالت) دارای قدرت مهاری معادل و کمتر از ۰/۵ در طول طول موج ۵۰۰ نانومتر بودند [٤۰].

٤- نتیجه‌گیری

پروتئین‌های آبکافتی (پپتیدهای زیست‌فعال) تولیدشده از منابع مختلف ضایعات پروتئینی (ماهی، مرغ و میگو) تحت شرایط یکسان آبکافت (دما، زمان، آنزیم، نسبت آنزیم به سوبسترا، درجه آبکافت و pH) می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی ارائه کنند. در تحقیق حاضر پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو (سر، پوسته و دم) نسبت به پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی (FPH) و مرغ (PPH) تقریبا در تمامی آزمون‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی مقادیر بیشتری نشان داد و در این زمینه کاراتر بود. FPH و PPH به ترتیب در رتبه‌های بعدی فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی قرار گرفتند.

٥- منابع

[1] Safari, R., Yaghoubzadeh, Z., Bankehsaz, Z., Reyhani Poul, S., &… 2020. Production of biosilage from chicken waste. Research Project, Caspian Sea Ecology Research Institute (In Persian).

[2] Reyhani Poul, S., Jafarpour, A., and Safari, R. 2018. Study of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 14 (1), 162-176 (In Persian).

[3] Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., & Shamasundar, B. A. 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla*

[12] Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R., & Motamedzadegan, A. 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using alcalase and protamex. *International Aquatic Research*, 2, 87-95.

[13] Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., & Shabanpour, B. 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2), 460-465.

[14] Guerard, F., Guimas, L., & Binet, A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis* B: Enzymatic, 19, 489-498.

[15] Layne, E. 1957. [73] Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology, 3, 447-454.

[16] Hoyle, N. T., & Merritt, J. O. H. N. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59(1), 76-79.

[17] Iranian National Standard No. 924, 1993. Measurement of total protein in meat and its products. Iran Institute of Standards and Industrial Research (In Persian).

[18] AOAC .2005. Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.

[19] Yen, G. C., & Wu, J. Y. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. *Food Chemistry*, 65(3), 375-37.

[20] Oyaiza, M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of nutrition*. 44, 307–315.

[21] Decker, E. A., & Welch, B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(3), 674-677.

[22] Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, *44*(4), 1044-1051.

[23] Chung, S.K., Osawa, T., and Kawakishi, S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown *Catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1207-1214.

[4] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food chemistry*, *102*(4), 1317-1327.

[5] Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2007). Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2), 187.

[6] Yeganeh, S., Esmaeili, M., and Ahmadi, H. 2021. Effect of hydrolysis time on the antioxidant activity of Common carp (*Cyprinus carpio*) head protein hydrolysate. Iranian Scientific Fisheries Journal, 29 (6), 29-42 (In Persian).

[7] Shabanpour, B., Kordjazi, M., and Nazari, Khatereh. 2013. Optimization of enzymatic hydrolysis conditions of shrimp (*Penaeus semisulcatus*) waste protein using the response surface methodology. *Aquatics exploitation and farming*, 4 (3), 29-50 (In Persian).

[8] Ahmadi, A., Yeganeh, S., and Smaili, M. 2020. nvestigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Journal of Fisheries*, 73 (4), 593-606 (In Persian).

[9] Reyhani Poul, S and Jafarpour, A. 2016. Effects of degree of hydrolysis on functional properties and antioxidants activity of hydrolysate from head and frame of common carp (*Cyprinus carpio*) fish. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 68 (14), 113-124 (In Persian).

[10] Shabanpour, B., Kordjazi, M., Nazari, Kh., and Smaeili, M. 2017. Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 62(14), 31-45 (In Persian).

[11] Taheri, A., Jalalinejad, S., and Anvar, A. 2012. Antihypertensive and antioxidant properties of five types of hydrolyzed proteins from shrimp waste (*Penaeus indicus*). *Comparative pathology,* 9 (1), 599-608 (In Persian).

Mustard (*Brassica nigra*). *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 61, 118–123.

[24] Mitsuda, H. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to shokuryo*, 19, 210-221.

[25] Osawa, T., & Namiki, M. 1985. Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *33*(5), 777-780.

[26] Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., & Fogliano, V. 2013. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1), 154-169.

[27] Muzaifa, M., Safriani, N., & Zakaria, F. 2012. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis. *International Journal of the Bioflux Society*, 5, 36-39.

[28] Dey, S. S., & Dora, K. C. 2014. 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.

[29] Reyhani Poul, S., Jafarpour, A., and Safari, R. 2017. Functional and antioxidant properties of fish protein hydrolysate from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by enzymatic method. *Scientific - Research Journal*, 5 (4), 13-28 (In Persian).

[30] Bakhshan, A., Alizade dughikalayi, A., & Taheri, A. 2014. Study of antioxidats properties of hydrolyzate from waste of Salmon (*Salmo salar*) in filleting process. *Comparative pathobiology*, 11 (1), 1152-1143 (In Persian).

[31] Foh, M. B. K., Amadou, I., Foh, B. M., Kamara, M. T., & 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.

[32] Centenaro, G. S., Centenaro, M. S., & Hernandez, C. P. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Advance Journal of Food Science and Technology,* 3(4), 280-288.

[33] Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L., & Prentice, C. 2014. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6), 2877-2893.

[34] Sun, Y., Pan, D., Guo, Y., & Li, J. 2012. Purification of chicken breast protein hydrolysate and analysis of its antioxidant activity. *Food and Chemical Toxicology*, 50(10), 3397-3404.

[35] Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H., & 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.

[36] Miller, N. J., Rice-Evans, C., Davies, M. J., Gopinathan, V., & Milner, A. (1993). A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clinical science*, 84(4), 407-412.

[37] Rossini, K., Norena, C. P., Cladera-Olivera, F., & Brandelli, A. 2009. Casein peptides with inhibitory activity on lipid oxidation in beef homogenates and mechanically deboned poultry meat. LWT-*food Science and Technology*, 42(4), 862-867.

[38] Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. 2004. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.

[39] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N. M., & Nunes, M. L. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochemistry*, *45*(1), 18-24.

[40] Naqash, S. Y., & Nazeer, R. A. 2013. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (*Nemipterus japonicus*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*, *50*(5), 972-978.

Iranian Journal of Food Science and Technology

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Comprehensive comparison of antioxidant activity of bioactive peptides produced from fish, poultry and shrimp wastes using Flavourzyme enzyme

Reyhani Poul, S. [1]*, Yeganeh, S. [2]

1. PhD, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

ARTICIE INFO

Article History:

Received 2019/ 07/ 21
Accepted 2021/ 09/ 19

Keywords:

Shrimp wastes, Flavourzyme, Bioactive peptides, Antioxidant activity.

DOI: 10.52547/fsct.18.119.307

*Corresponding Author E-Mail: Soheylreyhani@gmail.com

ABSTRACT

Given the concerns regarding the use of synthetic antioxidants in the food industry, it seems necessary to identify and use substances containing natural antioxidants. Protein-containing wastes are one of these substances from which antioxidant compounds can be extracted in various ways. The aim of this study was to compare and comprehensively evaluate the antioxidant activity of bioactive peptides produced from three sources of waste including fish (FPH), poultry (PPH) and shrimp (SPH) with flavourzyme enzyme. Therefore, post-production bioactive peptides from these three sources were compared in term of all common and uncommon antioxidant tests in the food industry. The results showed that the peptides produced from these three sources (with the same enzyme and degree of hydrolysis) were different in terms of antioxidant activity. In free radical scavenging activity tests of DPPH and ABTS, linoleic acid peroxidation inhibition and metal chelating power, SPH was significantly higher than the other two proteins ($p<0.05$). The values of these four indices in SPH were measured 87.45±1.38%, 79.26±0.59%, 94.56±1.62%, and 71.49±0.37 %, respectively. There was no significant difference between SPH and FPH regarding ferric ion reducing power and hydroxyl free radical scavenging activity ($p>0.05$). Also, FPH and PPH did not show significant differences in terms of ABTS free radical scavenging activity index (69.15±0.85% and 68.44±1.93% respectively). In general, based on the results of the tests, in the present study, bioactive peptides produced from shrimp wastes (SPH) had the highest antioxidant activity. Peptides from fish wastes hydrolysis (FPH) was ranked second. In almost all tests, the lowest antioxidant activity was related to poultry wastes peptides (PPH).