تاثیر شستشو با آب مقطر، اسید سیتریک و کلرید کلسیم بر ترکیب شیمیایی پروتئین ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد دیابت پروتئین هیدرولیز

مهدی نیکو[1*]، حسن احمدی گاولیقی[2]، مهران یاسمی[3]

۱- استادیار پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه، ارومیه، آذربایجان غربی
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- دانشیار موسسه علمی کاربردی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۵/۰۲ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۱٤)

چکیده

در این مطالعه تاثیر پیش تیمارهای مختلف شامل: روش ۱- مینس ضایعات (BP-FPI)، روش ۲- شستشوی مینس ضایعات با آب (WBP-FPI)، روش ۳- شستشوی مینس ضایعات با اسید سیتریک + کلرید کلسیم (CaCi-BPFPI)، روش ٤- شستشوی مینس ضایعات با اسید سیتریک + کلرید کلسیم + شستشوی دوم با آب (CaCi-W- BPFPI) و روش ۵- شستشوی مینس ضایعات با آب + شستشوی دوم با اسید سیتریک + کلرید کلسیم(W-CaCi-BPFPI) بر ترکیب شیمیایی پروتئین ایزوله از ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*)بررسی گردید. شستشو با آب مقطر (روش ۲) و با آب مقطر + مخلوط اسید سیتریک و کلرید کلسیم (روش ۵) تاثیر زیادی بر کاهش آهن هم و فسفولیپید داشت ($P<$ ۰/۰۵). روش شستشو تاثیر معنی داری بر راندمان استخراج پروتئین ایزوله داشت بطوریکه کمترین درصد استخراج (۹/٤ درصد) مربوط به روش ۵ بوده است ($P<$ ۰/۰۵). پروتئین های حاصل از روشهای ۲ تا ۵ از روشنایی بالاتری نسبت به پروتئین تولید شده بطور مستقیم از ضایعات داشتند ($P<$ ۰/۰۵). روش ۱ منجر به بالاترین قرمزی (۹/۳٦) در پروتئین گردید ولی نمونه ۵ دارای کمترین رنگ قرمزی (۱/۱۹) بود ($P<$ ۰/۰۵). پروتئین هیدرولیز تولید شده از پروتئین روش ۵ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت های مختلف بوده است. همچنین، وجود پپتید های کوچک در پروتئین هیدرولیز سبب فعالیت ضد دیابت در آن گردید. نتیجه نشان داد که شستشو با آب مقطر به تنهایی (روش ۲) و یا در ترکیب با اسید سیتریک +کلرید کلسیم (روش ۵)برای تهیه پروتئین ایزوله با مقدار کمتر ترکیبات پرواکسیدانی از ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان مناسب می باشد.

کلید واژگان: قزل آلای رنگین کمان، ضایعات، روش های شستشو، ترکیب شیمیایی، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد دیابت

* مسئول مکاتبات: m.nikoo@urmia.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

۱- مقدمه

تولید آبزی پروری غذاهای دریایی در مقیاس جهانی رو به افزایش است بطوریکه در سال ۲۰۱٤ رقم تولید به بیشتر از ۱٦۰ میلیون تن رسید [۱] که به دلیل افزایش جمعیت جهان و نیاز به تقاضای غذای بالاتر می باشد. از فرآوری صنعتی ماهی، حدود ۳۵۰ تا ٦۰۰ کیلوگرم ضایعات جامد از هر تن تولید می شود که عمدتا در تولید کود و خوراک آبزیان (ماهی ومیگوی پرورشی) استفاده می شود [۲]. با در نظر گرفتن محتوی ارزشمند پروتئینی ضایعات و در صورت هندلینگ و نگهداری صحیح، می توانند جهات مصارف انسانی کاربرد داشته باشند و لذا به عنوان ترکیبات با ارزش افزوده در تامین پایدار منابع غذایی مناسب باشند [۳]. طبق گزارشات FAO، تولید جهانی قزل آلای رنگین کمان در سال ۲۰۱٤ معادل ۸۱٤ هزار تن بوده و ایران یکی از بزرگترینتولید کننده بزرگ این ماهی سردآبی می باشد. مقادیر زیادی از ضایعات (حدود ۳۰ درصد وزن) شامل سر، امعاء و احشاء، استخوان و باله پس از تهیه فیله ازقزل آلا تولید می شود.

علاوه بر غنی بودن از پروتئین ، پروتئین های آبزیان دارای پپتید های زیست فعال[1] در توالی اسید آمینه خود می باشند. مطالعات انجام شده طی سال های اخیر نشان داد که پروتئین هیدرولیز و پپتید های آبزیان دارای اثرات مثبت بر سلامتی[2] بوده و پتانسیل استفاده به عنوان ترکیبات فراسودمند در مواد غذایی را دارند[٤، ۵]. پپتید های آبزیان نشان داده شده که که از طریق کنترل بیماری های قلبی-عروقی، سرطان، چاقی و دیابت سبب حفظ سلامتی انسان خواهند شد[٦].

یکی از مشکلاتی که در زمان تولید پروتئین هیدرولیز اتفاق می افتند، اکسیداسیون بدلیل وجود ترکیبات پرواکسیدانی مانند فسفولیپید، آهن هم، میوگلوبین و ترکیبات نامطلوب چربی است. اکسیداسیون چربی منجر به خواص ارگانولپتیک نامطلوب و عدم ثبات اکسیداتیو و نهایتا کاهش مشتری پسندی و قابلیت کاربرد در فرآورده های غذایی می شود [۷]. کاهش چربی، خصوصا فسفولیپید، و آهن هم منجر به تولید پروتئین هیدرولیز با خواص زیستی بهتر خواهد شد. استفاده از کلرید کلسیم و اسید سیتریک جهت کاهش ترکیبات پرواکسیدانی از مینس ماهی مورد بررسی قرار گرفت. تیمار مینس ماهی کد و هرینگ با کلرید کلسیم و اسید سیتریک سبب قطع اتصال چربیهای غشایی و پروتئین های سیتواسکلتی و نهایتا تولید تجمعات غشایی گردید که با سانتریفیوژ جدا شد [۸]. شستشوی ضایعات ماهی هیک[3] با کلرید کلسیم و اسید سیتریک نیز سبب کاهش سطح فسفولیپید محلول قلیایی پروتئین شد [۹]. ولی پروتئین هیدرولیز حاصل دارای روشنایی کمتر و قرمزی بالاتر در مقایسه با پروتیئن تولید شده از ضایعات شسته نشدهبود. دلیل این امر به محلول شدن همزمان پروتئین های هم در زمان شستشو با کلرید کلسیم و اسید سیتریک نسبت داده شد که نهایتا در پروتئین هیدرولیز وجود خواهند داشت.

تاثیرشستشو با آب مقطر به تنهایی و یا در ترکیب با کلرید کلسیم و اسید سیتریک در زمان حلالیت قلیایی پروتئین برای جداسازی چربی، فسفولیپید، و ترکیبات پرواکسیدانی محلول در آب بررسی شد. مینس ماهی ساردین که با آب مقطر قبل یا بعد از تیمار با کلرید کلسیم و اسید سیتریک شستشو داده شد، دارای مقدار کمتری آهن هم و میوگلوبین بود [۷]. جهت بهبود رنگ پروتئین و کاهش ترکیبات پرواکسیدانی از ضایعات ماهی، شستشو با آب مقطر در جریان تیمار با کلرید کلسیم و اسید سیتریک می تواند مفید باشد. با این وجود، مطالعه ای در رابطه با روش های شستشو بر پایه آب مقطر در ترکیب با کلرید کلسیم و اسید سیتریک در ضایعات ماهی و بخصوص ضایعات قزل آلای رنگین کمان وجود ندارد. هدف این مطالعهارزیابی تاثیر شستشوی ضایعات هموژن شده قزل آلای رنگین کمان با آب مقطر در مراحل قبل و یا بعد ازتیمار با کلرید کلسیم و اسید سیتریک بر ترکیب شیمیایی، و فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد دیابت پروتئین هیدرولیز ضایعات بوده است.

۲- مواد و روشها

۲-۱- مواد مورد استفاده

2,2'-azinobios-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)، 2,2-diphenyl-1- (ABTS)

1. Bioactive peptides
2. Health benefits
3. *Merlucciusmerluccius*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

3-(2-Pyridyl)-5,6- ،picrylhydrazyl (DPPH) diphenyl-1,2,4-triazine-4′,4″-disulfonic acid p -nitrophenyl α-D- ،sodium salt (ferrozine) glucopyranoside، Rat intestinal acetone powder، Alcalase 2.4L (Proteinase from *Bacillus licheniformis*) از شرکت سیگما (آمریکا) خریداری شدند. سایر مواد آزمایشگاهی شامل کلرید کلسیم، اسید سیتریک، کربنات سدیم، اسید کلریدریک، هیدروکسید سدیم، کلرید آهن و متانول از نوع گرید آزمایشگاهی بودند.

۲-۲- استخراج پروتئین ضایعات به روشهای مختلف

روش ۱: ضایعات شامل سر (۳٦ درصد)، امعاء و احشاء (۲٦/۸۵ درصد)، باله (۷/٤ درصد) و استخوان ستون فقرات (۲۹/٦۲ درصد) توسط چرخ گوشت با قطر سوراخ ۳ میلی متری به شکل یکنواخت در آمده و سپس با ۵ حجم آب سرد به مدت ۲ دقیقه هموژن (Heidolph DIAX900, Germany) گردید. ضایعات هموژن شده برای مدت ۱۵ دقیقه توسط هم زن الکتریکی (FTDS-11, SciFinetech Co., South Korea) بهم زده شد و تا زمان تهیه پروتئین هیدرولیز در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

روش ۲: ضایعات هموژن شده طبق روش ۱ تولید و سپس توسط محلول قلیایی با پی اچ ۱۱ (pH 7110, Xylem Analytics Germany GmbH, Weilheim, Germany) پروتئین به شکل محلول در آورده شد. محلول به مدت ۳۰ دقیقه توسط هم زن الکتریکی بهم زده شد و سپس در دور ٦۰۰۰ در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید (Z 326 K, HERMLE Labortechnik GmbH, Germany). پروتئین محلول توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به پی اچ ٤/۵ رسانده شده و پس از هم زدن به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ پروتئین ترسیب و جدا گردید.

روش ۳: ضایعات هموژن شده طبق روش ۱ تولید و با محلول اسید سیتریک (۵ میلی مول) + کلرید کلسیم (۸ میلی مول) به نسبت ۱ به ۵ مخلوط و به مدت ۲ دقیقه هموژن شد و قبل از آنکه پی اچ آن به ۱۱ رسانده شود ، به مدت ٦۰ دقیقه توسط هم زن الکتریکی بهم زده شد. در پی اچ ۱۱ محلول به مدت ۱۰ دقیقه مجددا بهم زده شد و سپس طبق روش ۲ سانتریفیوژ گردید. پروتئین محلول توسط اسید کلریدریک ۱ نرمال به پی اچ ٤/۵ رسانده شده و پس از هم زدن به مدت ۱۰ دقیقه با سانتریفیوژ پروتئین ترسیب و جدا گردید.

روش ٤: در این روش ضایعات هموژن شده طبق روش ۱ تولید و با محلول اسید سیتریک (۵ میلی مول) + کلرید کلسیم (۸ میلی مول) به نسبت ۱ به ۵ مخلوط و به مدت ۲ دقیقه هموژن شد و قبل از آنکه پی اچ آن به ۱۱ رسانده شود ، به مدت ٦۰ دقیقه توسط هم زن الکتریکی بهم زده شد. در پی اچ ۱۱ محلول به مدت ۱۰ دقیقه مجددا بهم زده شد و سپس طبق روش ۲ سانتریفیوژ گردید. سوپرناتانت دور ریخته شده و پلت توسط آب مقطر سرد برای مدت ۱۵ دقیقه بهم زده شد و در دور ٦۰۰۰ در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. پلت حاصل برای تولید پروتئین به روش حلالیت قلیایی-رسوب اسیدی طبق روش ۳ استخراج گردید.

روش ۵:در این روش ضایعات هموژن شده طبق روش ۱ تولید و توسط آب مقطر سرد برای مدت ۱۵ دقیقه بهم زده شد و در مرحله بعد ر دور ٦۰۰۰ در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. بعد از آن پلت توسط محلول اسید سیتریک (۵ میلی مول) + کلرید کلسیم (۸ میلی مول) به نسبت ۱ به ۵ مخلوط و به مدت ۲ دقیقه هموژن شد و برای مدت دقیقه توسط هم زن الکتریکی بهم زده شد. بعد از سانتریفیوژ طبق بالا، پلت برای تولید پروتئین به روش حلالیت قلیایی-رسوب اسیدی طبق روش ۳ بکار برده شد. کلیه نمونه های پروتئین ایزوله وسط فریز درایر (type 102042, Christ, Germany) برای مدت ۲٤ ساعت خشک شدند.

۲-۳- هیدرولیز آنزیمی

جهت انجام هیدرولیز محلول ۳ درصد پروتیئن ایزوله از آنزیم آلکالاز استفاده شد. غلظت آنزیم به پروتئین ۱ به ۲۰ و هیدرولیز به مدت ۱۸۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه دسانتی گراد صورت پذیرفت. طی زمان هیدرولیز، جهت ثابت نگه داشتن PH از هیدروکسید سدیم ۱ نرمال استفاده گردید. بعد از اتمام واکنش، محلول پپتیدی در دمای ۱۰۰درجه‌سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

جوشانده شد تا آنزیم غیر فعال گردد. بعد از سرد شدن، در دور ٦ هزار دور در دقیقه و به مدت ١٠ دقیقه سانتریفیوژ و توسط دستگاه فریز درایر خشک شدد.

٢-٤- تعیین رنج وزن مولکولی پپتید ها

رنج وزن مولکولی پپتید ها در پروتئین هیدرولیز توسط ستون TSKgel 2500 PWXL (7.8 × 300 mm, Tosoh, Tokyo, Japan) متصل به دستگاه HPLC (Agilent 1100, USA) اندازه گیری شد. فاز متحرک شامل آب/ استونیتریل/ تری فلورواستیک اسید با نسبت ٧٠/٣٠/٠/١ بود. جذب در طول موج ٢٢٥ نانومتر قرائت شد و شدت جریان ٠/٥ میلی لیتر در دقیقه بوده است. Cytochrome C (١٢٣٨٤ دالتون) ، bacitracin (١٤٢٣ دالتون) ، Gly-Gly-Try-Arg (٤٥١ دالتون) و Gly-Gly-Gly (١٨٩ دالتون) به عنوان استانداردهای وزن مولکولی مورد استفاده قرار گرفتند.

٢-٥- تعیین میزان آهن هم و فسفولیپید

آهن هم به روش Cheng و Ockerman اندازه گیری شد [١١]. مقدار ٢ گرم نمونه با ٩ میلی لیتر اسید استون (حاوی ٢ درصد اسید کلریدریک) مخلوط و پس از ورتکس برای مدت ١ ساعت در دمای اتاق انکوبه گردید و سپس با کاغذ واتمن شماره ٤٢ فیلتر شد. جذب نمونه ها در طول موج ٦٨٠ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. عدد بدست آمده با ٦٨٠ ضرب شد تا مقدار کل رنگدانه بر حسب میکروگرم در گرم بدست آید. آهن هم (میلی گرم در ١٠٠ گرم) با ضرب مقدار کل رنگدانه در ٠/٠٠٨٨٢ محاسبه شد. مقدار فسفولیپید نیز به روش Khantaphant و همکاران [٧]بر حسب میلی گرم در ١٠٠ گرم تعیین شد.

٢-٦- سنجش فعالیت ضد دیابت

فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوسید از مخمری فعالیت ممانعت کنندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیدازی به روش Yu و همکاران [١٢] صورت پذیرفت. آلفا-گلوکوسیداز مخمری در بافر فسفات ٠/١ میل مول (پی اچ ٦/٨) بعنوان منبع آنزیم استفاده گردید. سوبسترا p -nitrophenyl α-D-glucopyranoside در غلظت ١٠ میلی مول در بافر فسفات ٠/١ مول (پی اچ ٦/٨) حل گردید. ٢٥٠ میکرولیتر نمونه با ١٥٠ میکرولیتر محلول آنزیمی به مدت ١٠ دقیقه انکوبه گردید. بعد از آن، ١٠٠ میکرولیتر محلول سوبسترا اضافه و مخلوط برای ٥ دقیقه دیگر در دمای اتاق نگهداری شد. با افزودن ١ میلی لیتر محلول کربنات سدیم ٠/٢ مول واکنش متوقف گردید و جذب نمونه ها در طول موج ٤٠٥ نانومتر قرائت شد. درصد بازدارندگی فعالیت آنزیم توسط فرمول زیر محاسبه گردید: بازدارندگی فعالیت آلفا-گلوکوسیداز = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ١٠٠.

٢-٧- فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیداز پستانداران

فعالیت بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیداز پستانداران با استفاده از پودر استونی روده موش[4] به عنوان محلول آنزیمی (22 mU/mL) و p-nitrophenyl-α-D-glucopyranoside (٥ میلی مول) تهیه شده در بافر ٠/١ مول فسفات (pH 6.9) به عنوان سوبسترا تعیین شد. فعالیت بازدارندگی از طریق آزادسازی ترکیب p-nitrophenyl در طول موج ٤٠٥ نانومتر توسط میکروپلیت ریدر (BioTek Instruments Inc., VT) به روش Connolly و هکاران [١٣] اندازه گیری شد.

٢-٨- جداسازی فرکشن های پپتیدی به روش ژل فیلتراسیون

به منظور جداسازی فرکشن های پپتیدی از کروماتوگرافی غربال مولکولی با کاربرد Sephadex G-15 استفاده شد. برای جداسازی پپتید های ضایعات قزل آلا، پروتئین هیدرولیز زمان ١٨٠ دقیقه در غلظت ١٠ میلی گرم در میلی لیتر تهیه گردید. ستون (به طول ١ متر و عرض ١/٢ سانتی متر) توسط ژل سفادکس پر و توسط آب مقطر بخوبی مورد شستشو قرار گرفت. شدت جریان آب مقطر در حد ١ میلی لیتر در دقیقه تنظیم و پس از عبور پپتید ها از Sephadex G-15، فرکشن ها (هر کدام ٣ میلی لیتر) جمع آوری شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی این فرکشن ها در مهار رادیکال های DPPH، ABTS و شلاته کنندگی یون آهن سنجش گردید.

٢-٩- فعالیت مهار رادیکال DPPH

4Rat intestinal acetone powder

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

توانایی مهار رادیکال‌های DPPH با استفاده از روش Benjakul و Senphan [۱٤] انجام شد. از محلول ۰/۱ میلی مول DPPH برای سنجش فعالیت آنزیمی استفاده شده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر خوانده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر برحسب درصد محاسبه می‌گردد:(جذب کنترل- جذب نمونه / جذب کنترل × ۱۰۰)

۲-۱۰- فعالیت مهار رادیکال ABTS

تعیین فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های ABTS به روش Benjakul و Senphan[۱٤]انجام شد. محلول واکنشی از ترکیب ۷/٤ میلی‌مول ABTS و ۲/٦ میلی‌مول پتاسیم پرسولفات به نسبت ۱ به ۱ تهیه و توسط متانول جذب آن به ۱/۱۰۰ در طول موج ۷۳٤ نانومتر رسانده شد. نمونه ها قبل از خواندن جذب نمونه ها به مدت ۲ ساعت در تاریکی نگهداری شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر برحسب درصد تعیین گردید:(جذب کنترل- جذب نمونه / جذب کنترل × ۱۰۰)

۲-۱۱- فعالیت شلاته کنندگی یون آهن

فعالیت شلاته کنندگی یون آهن به روش Benjakul و Senphan[۱٤]اندازه گیری شد.پس از واکنش ۳۰۰ میکرولیتر نمونه با ۳۵/۵ میکرولیتر کلرید آهن و انکوباسیون مجدد برای مدت ۳ دقیقه، با مقدار مناسب فروزین (۵ میلی مول) مخلوط و برای ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری گردیدند. جذب نمونه در طول موج ۵٦۲ نانومتر قرائت شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی از طریق فرمول زیر برحسب درصد تعیین گردید:(جذب کنترل- جذب نمونه / جذب کنترل × ۱۰۰)

۲-۱۲- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس (One-way ANOVA) انجام و مقایسه بین میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. از نرم افزار SPSS شماره ۱٦ جهت آنالیز آماری استفاده گردید. معنی داری داده ها در سطح اطمینان ۹۵ درصد ($P < ۰/۰۵$) بررسی گردید.

۳- نتایج

پروتئین های ایزوله حاصل از ضایعات (روش ۱)، ضایعات شسته شده با آب مقطر (روش ۲)، ضایعات شسته شده با اسید سیتریک + کلرید کلسیم (روش ۳)،)، ضایعات شسته شده با مخلوط اسید سیتریک (۵ میلی مول) وکلرید کلسیم (۸ میلی مول) + آب مقطر (روش ٤) و ضایعات شسته شده با آب مقطر + مخلوط اسید سیتریک وکلرید کلسیم (روش ۵) ترکیب شیمیایی مختلفی از خود نشان دادند. روش شستشو تاثیر معنی داری بر راندمان استخراج پروتئین ایزوله داشت بطوریکه کمترین درصد استخراج (۹/٤ درصد) مربوط به روش ۵ بوده است ($P< ۰/۰۵$) (شکل ۱).شستشو با آب مقطر (روش ۲) و با آب مقطر + مخلوط اسید سیتریک و کلرید کلسیم (روش ٤) تاثیر زیادی بر کاهش آهن هم و فسفولیپید داشت(شکل ۲) ($P< ۰/۰۵$).بالاترین میزان آهن هم و فسفولیپید مربوط به روش ۳ بوده است ($P< ۰/۰۵$). پروتئین های حاصل از روشهای ۲ تا ۵ از روشنایی بالاتری نسبت به پروتئین تولید شده بطور مستقیم از ضایعات داشتند (جدول ۱) ($P< ۰/۰۵$). روش ۱ منجر به بالاترین قرمزی (۹/۳٦) در پروتئین گردید ولی نمونه ۵ دارای کمترین رنگ قرمزی (۱/۱۹) بود ($P< ۰/۰۵$).

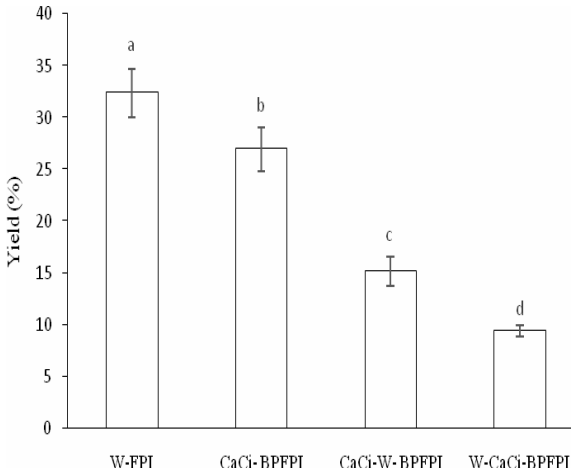
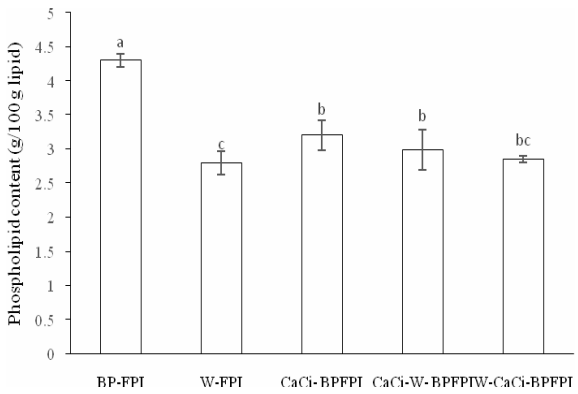


Fig 1 Yield of rainbow trout by-product protein isolate with different pretreatments.Bars represent the standard deviation from triplicate determinations. Different letters indicate significant differences ($P<$ 0.05).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]



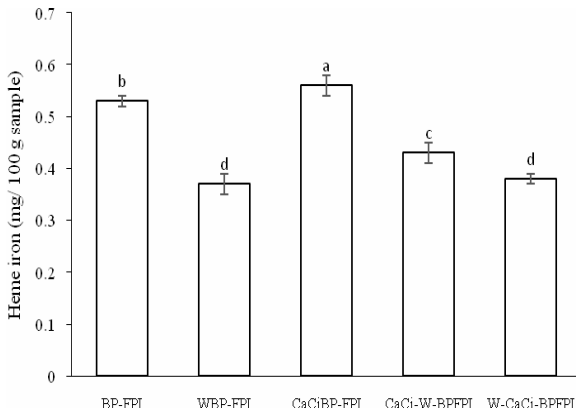


Fig 2 Heme iron (a) and phospholipid contents (b) of rainbow trout by-product protein isolate with different pretreatments. Method 1 (homogenized by-product, BP-FPI), Method 2 (washed by-product-alkaline solubilized isolate, WBP-FPI), Method 3 ($CaCl_2$-citric acid treated-alkaline solubilized isolate, CaCi- BPFPI), Method 4 ($CaCl_2$-citric acid treated-washed- alkaline solubilized isolate, CaCi-W-BPFPI), Method 5 (washed- $CaCl_2$-citric acid treated-alkaline solubilized isolate, W-CaCi-BPFPI). Bars represent the standard deviation from triplicate determinations. Different letters indicate significant differences (P< 0.05).

Table 1 Color parameters of rainbow trout protein isolates obtained from different processes.

Protein isolates	L^*	a^*	b^*
BP-FPI	30.86 ± 1.61^{c}	9.36 ± 0.74^{a}	11.34 ± 0.21^{d}
W-FPI	46.57 ± 2.01^{ab}	7.52 ± 0.30^{b}	43.36 ± 1.72^{a}
CaCi- BPFPI	44.59 ± 2.73^{b}	3.89 ± 0.21^{c}	28.06 ± 1.27^{b}
CaCi-W- BPFPI	49.82 ± 0.90^{a}	1.23 ± 0.32^{d}	25.09 ± 1.05^{c}
W-CaCi-BPFPI	46.51 ± 3.41^{ab}	1.19 ± 0.04^{d}	24.43 ± 1.67^{c}

Values represent M ± SD (n = 5). Different superscript letters (a-d) denote significant differences among protein isolates prepared suing different processes (P< 0.05).

نتیجه آنالیز وزن مولکولی پپتید ها نشان داد که ۳۷/۱۱ درصد ترکیب پروتئین هیدرولیز به شکل اسید آمینه آزاد و ۲۶/۹۴ درصد از نوع دی- و تری-پپتید با تعداد ۲ و ۳ اسید آمینه بوده است (جدول ۲). همچنین پپتید های با وزن بالاتر از ۵ و ۱۰ کیلودالتون نیز در ترکیب پروتئین هیدرولیز وجود داشت.

Table 2 Molecular weight distribution of peptides in rainbow trout protein hydrolysate

Molecular weight distribution (Da)	% Peptide fraction
>10000	5.98
10000-5000	1.51
5000-3000	2.38
3000-2000	3.20
2000-1000	9.02
1000-500	13.87
500-180	26.94
<180	37.11

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

درصد بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیداز مخمری توسط پروتئین هیدرولیز در شکل ۳ نشان داده شده است. بطور کلی درصد بازدارندگی با افزایش غلظت پپتید از ۱۰ تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر افزایش یافت و بین ۲/۸ تا ۹۹ درصد بود. بالاترین فعالیت بازدارنگی این انزیم مربوط به غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود ($P<$ ۰/۰۵). قدرت بازدارنگی ۵۰ درصدی آلفا-گلوکوسیداز مخمری (IC_{50}) توسط پپتید ها حدود ۲۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. از اینرو، پروتئین هیدرولیز حداقل ۲/۵ برابر قوی تر از آکاربوز در مهار آلفا-گلوکوسیداز مخمری بوده است. فعالیت بازدارنگی آنزیم آلفا-گلوکوسیداز پستانداران توسط آکاربوز در غلظت ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در حدود ۸۰ درصد بود که از این جهت در مقایسه با پروتئین هیدرولیز در غلظت ۱۰ میلی گرم در میلی لیتر بالاتر بود ($P<$ ۰/۰۵).

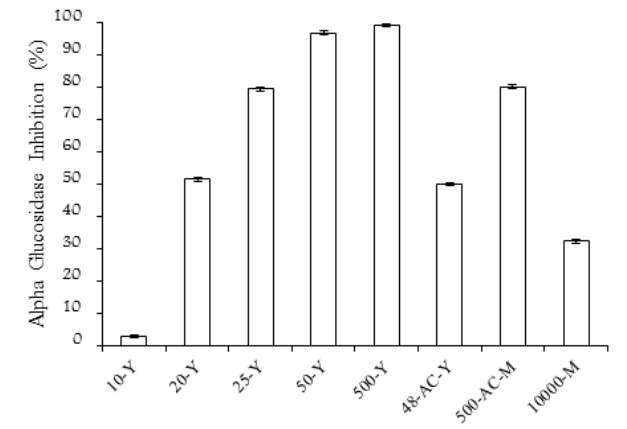


Fig 3 Yeast and mammalian α-glucosidase inhibitory activity of hydrolysate from rainbow trout by-product. AC: Acarbose; Y: Yeast; M: Mammalian

پس از جدا سازی اولیه پپتید ها، تعداد ۲۹ فرکشن پپتیدی جمع آوری و فعالیت آنتی اکسیدانی هر کدام سنجش گردید (شکل ٤). فرکشن های بدست آمده فعالیت آنتی اکسیدانی بالایی نشان دادند. فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید های بزرگ زنجیره در مهار رادیکال های DPPH بالاتر از پپتید های کوچکتر با RT[5] بیشتر بوده است. فرکشن شماره ۵ دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی (٤۹/۷٦ درصد) بوده است. نتایج حاکی از وجود دو پیک پس از جداسازی بوده است. با این وجود، نتیجه فعالیت مهار رادیکال های ABTS و شلاته کردن یون آهن عکس نتایج مهار رادیکال های DPPH بود. پپتید های کوچک زنجیره در مقایسه با انواع بزرگتر توانایی آنتی اکسیدانی بالایی نشان داده بطوریکه منجر به جداسازی کامل دو پیک از یکدیگر گردید. فرکشن شماره ۲٤ بالاترین خاصیت شلاته کنندگی یون آهن را در غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر داشته است (۸۸/۷۹ درصد). فرکشن های ۱٦ و ۱۷ کمترین فعالیت شلاته کنندگی در بین فرکشن ها را داشته اند. الگوی مهار رادیکال های ABTS مشابه شلاته کنندگی یون آهن بود بطوریکه فرکشن های ۲۱ ال ۲۳ بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان دادند (۸۵/۵ درصد).

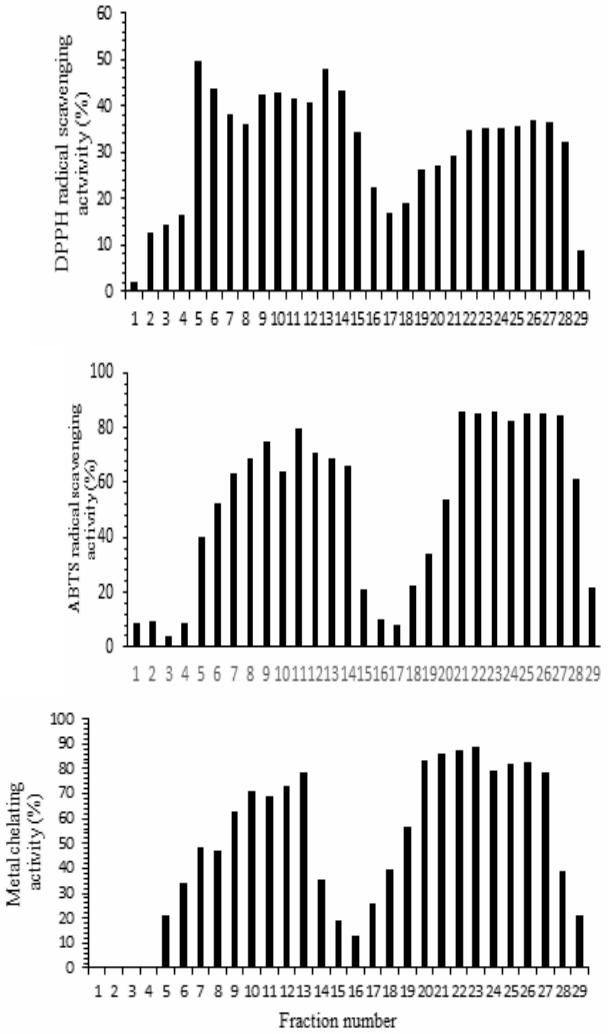


Fig 4 DPPH, ABTS and metal chelating activity of peptide fractions obtained from Sephadex G-15 gel filtration column equilibrated and eluted with distilled water (1 mg/mL).

5. Retention time

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

٤- بحث

ترکیب شیمیایی پروتئین ضایعات هموژن شده ماهی قزل آلای رنگین کمان تحت تاثیر روش های مختلف شستشو قرار گرفت. مقدار آهن هم و فسفولیپید در پروتئین حاصل از شستشو به روش های ۲ و ۵ در مقایسه با سایر روشها کمتر بوده و همچنین ترکیب اسید سیتریک و کلرید کلسیم به تنهایی یا در ترکیب با آب مقطر توانستند سبب کاهش آهن هم و فسفولیپید شوند. شستشو روشی به منظور حذف پروتئین های محلول در آب (سارکوپلازمیک) و ترکیبات پرواکسیدانی که بطور طبیعی در ماهی وجود دارند می باشد. برخی مطالعات نشان دادند که شستشو می تواند سب کاهش میزان فسفولیپید مینس ماهی گردد [۸]. به دلیل سر قطبی فسفولیپید که مرتبط با غشای سلولی است در زمان شستشو تا حدی می تواند حذف شود. غشای فسفولیپیدی از طریق جذب الکترواستاتیک بین فسفولیپیدهای اسیدی غشاء و اسیدهای آمینه بازی پروتئین های سیتواسکلتی به آن متصل می باشد. زمانیکه مینس ماهی برای جداسازی غشاء در معرض محلول اسید سیتریک و کلرید کلسیم قرار می گیرد برهم کنش بین کلسیم با سر قطبی فسفولیپید و همچنین رقابت بین اسید سیتریک با فسفولیپیدهای اسیدی غشاء متصل به اسیدهای آمینه بازی پروتئین های سیتواسکلتی اتفاق می افتد. در نتیجه جداشدگی غشاء فسفولیپیدی از پروتئین های سیتواسکلتی رخ می دهد [۷]. این روش توانست به نحو موثری سبب کم شدن فسفولیپید از ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان گردد که با مطالعه صورت گرفته در ضایعات ماهی هیک که البته فقط از ترکیب اسید سیتریک و کلرید کلسیم (بدون کاربرد آب مقطر) استفاده نمودند مطابقت دارد [۹]. همچنین این فرایند سبب کاهش آهن هم در پروتئین ضایعات گردد که به دلیل خاصیت قطبی محلول شستشو، آهن هم می تواند به شکل محلول درآید. از اینرو، کاربرد روشهای ۲ و ۵ برای استفاده از ضایعات قزل آلای رنگین کمان در استخراج پروتئین پیشنهاد می گردد. این پروتئین (روش ۵) دارای ویژگی های رنگی بهتری (روشنایی بالاتر و قرمزی کمتر) در مقایسه با پروتئین استخراج شده بطور مستقیم از ضایعات هموژن شده بود. البته شستشوهای متوالی سبب کاهش معنی دار درصد استخراج پروتئین گردید بطوریکه در روش ۵ علیرغم اینکه دارای ترکیب شیمیایی مناسبی بود ولی درصد استخراج کمتر از سایر نمونه ها بود. ولی بدون در نظر گرفتن فاکتور رنگی قرمزی در روش ۲ که بالاتر از روش ۵ بود، به لحاظ سایر ویژگی های ترکیب شیمیایی و راندمان استخراج، روش ۲ می تواند روش مناسبی برای استخراج پروتئین در نظر گرفته شود.

پس از هیدرولیز ضایعات ماهی قزل آلا توسط آلکالاز،پپتید هایی با اندازه های مختلف تولید گردیدند. این امر نشان دهنده شکستگی پیوند های پپتیدی و تولید قطعات کوچکتری از زنجیره پلی پپتید می باشد. حدود ۵۵ درصد پپتید ها در پروتئین هیدرولیز ضایعات ماهی قزل آلا دارای وزن مولکولی کمتر از ۵۰۰ دالتون بودند. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز و پپتید به طول زنجیره پپتید، نوع اسید های آمینه در زنجیره پپتید، توالی اسید های آمینه و قرار گیری در موقعیت های انتهایی کربوکسیلیک و آمینو زنجیره یا نزدیک به این موقعیت ها بستگی دارد [۱۵، ۱٦]. اغلب پپتید های آنتی اکسیدانی دارای ویژگی های ساختاری مشابه می باشند بطوریکه از از ۳ تا ۱٦ اسید آمینه تشکیل یافته، وزن مولکولی بین ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ دالتون دارند و معمولا دارای اسید های آمینه آبگریز در زنجیره خود می باشند [۱۷، ۱۸، ۱۹].این پپتید ها دارای قدرت حذف رادیکال های آزاد و توانایی شلاته کردن یون های آهن می باشند [۲۰]. پپتید های کوچک زنجیره فعالیت آنتی اکسیدانی بالاتریدر مقایسه با پپتید های بزرگتر دارند[۱۵]. پروتئین هیدرولیز ضایعات قزل آلا با توجه به ترکیب خاص پپتیدی خود می تواند فعالیت آنتی اکسیدانی در کنترل فرآیندهای اکسیداتیوداشته باشد.

نتایج بازدارندگی آنزیم آلفا-گلوکوسیداز نشان داد که پروتئین هیدورولیز ماهی می تواند یکی از موثرترین ترکیبات طبیعی در کنترل آنزیم های مرتبط با تجزیه کربوهیدرات باشد. پروتئین هیدرولیز عضله ماهی ساردین که از تخمیر باکتری *باسیلوس لیچنی فورمیس*[6] و یا تریپسین هیدرولیز گردید نشان داده شد که می تواند سبب توقف فعالیت آنزیم آلفا-گلوکوسیداز با IC_{50} برابر با ٤۸/۷ و ۱۲٤/۱ میلی گرم در میلی لیتر باشد [۲۱]. مقایسه توانایی پروتئین هیدرولیز ضایعات قزل آلا با سایر ترکیبات

6. *Bacillus licheniformis*

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

طبیعی مهار کننده آلفا-گلوکوسیداز نشان داد که عصاره چای اولونگ و چای سبز به ترتیب دارای IC_{50} برابر با ۱۱/۱ و ۱۱/۳ میلی گرم در میلی لیتر بودند [۲۲]. تاکنون هیچ مطالعه ای فعالیت ضد دیابت پروتئین هیدرولیز ضایعات قزل آلای رنگین کمان را بررسی ننموده است. با این وجود، قدرت بازدارندگی آن در برابر آنزیم آلفا-گلوکوسیداز پستانداران کمتر از آکاربوز بود. این امر تا حدی قابل پیش بینی می باشد زیرا آکاربوز داروی ضد دیابت سنتتیک و خالص می باشد در حالیکه پروتئین هیدرولیز ضایعات از مخلوطی از پپتید ها و پلی پپتید ها و ترکیبات غیر پروتئینی تشکیل یافته است.

یکی از مسیر های کلیدی فساد مواد غذایی، اکسیداسیون چربی می باشد که عاملی برای تشکیل ترکیبات فرار[۷] و بروز بوی نامطلوب در ماده غذایی می باشد. یون های عبوری مانند یون آهن از مهم ترین کاتالیست های اکسیده شده چربی بوده و می تواند به عنوان یک دهنده الکترونبه هیدروپراکسیدهای ناپایدار عمل نموده که حاصل تشکیل رادیکال های آلکوکسیل است[۲۳]. تشکیل ترکیبات فرار، حاصل از تجزیه هیدروپراکسیدها،بطور منفی بر طعم و بوی فرآوده تاثیر می گذارد. از اینرو، شلاته کردن آنها توسط یک ماده می تواند نقش مهمی بر تاثیر آنتی اکسیدانی آن در جلوگیری از اکسیداسیون مواد غذایی داشته باشد [۲٤]. فرکشن های پپتیدی پروتئین هیدرولیز ضایعات قزل آلا با مقدار بالای دی- و تری-پپتید و اسید های آمینه آزاد ، یونهای فلزی را شلاته نموده که می تواند منجر به کاهش اکسیداسیون گردد. همچنین فرکشن های پپتیدی توانایی مهار رادیکال های آزاد را از خود نشان دادند. مهار رادیکال های آزاد یکی از مکانیسم هایی است که آنتی اکسیدان از فرآیند های اکسیداسیون جلوگیری می نماید [۱۵]. لذا پروتئین هیدرولیز ضایعات قزل آلا با توانایی مهار رادیکال های آزاد میتواند سبب توقف اکسیداسیون چربی از طریق توقف واکنش زنجیره ای گردد.

در مجموع این مطالعه نشان داد که ترکیب شیمیایی پروتئین ضایعات قزل آلای رنگین کمان تحت تاثیر روشهای مختلف شستشو قرار می گیرد. روش ۵ از روشنایی بالاتر و زردی و قرمزی کمتری برخوردار بود با یان وجود روش ۲ مقدار آهن هم و فسفولیپید از روش ۵ نیز کمتر بوده است. ولی با در نظر گرفتن راندمان بالاتر روش ۲، و بدون در نظر گرفتن فاکتور رنگی قرمزی در این روش که بالاتر از روش ۵ بود، روش ۲ می تواند روش مناسب و کم هزینه برای استخراج پروتئین از ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان پیشنهاد شود.

۵- تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (طرح شماره ۹٤۰۱۳۳۷٤) صورت پذیرفت.

٦- منابع

[1] FAO. (2016). The state of world fisheries and aquaculture 2016. Contributing to food security and nutrition for all. In (pp. 200). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.

[2] Pérez-Gálvez, R., Espejo-Carpio, F. J., Morales-Medina, R., García-Moreno, P. J., Guadix-Escobar, A., &Guadix-Escobar, E. (2018). Fish discards as source of health-promoting biopeptides. In *Alternative and Replacement Foods* (pp. 177-204).

[3] Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., &Rustad, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (Gadusmorhua) by-products. *Process Biochemistry*, *40*(6), 2021-2033.

[4] Norris, R., Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2013). Antihypertensive peptides from marine origin. In B. Hernández-Ledesma & M. Herrero (Eds.), Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources (pp. 27-56): Wiley-Blackwell.

[5] Opheim, M., Šližytė, R., Sterten, H., Provan, F., Larssen, E., &Kjos, N. P. (2015). Hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar) rest raw materials—Effect of raw material and processing on composition, nutritional value, and potential bioactive peptides in the hydrolysates. *Process Biochemistry*, *50*(8), 1247-1257.

[6] Harnedy, P. A., & FitzGerald, R. J. (2013). Bioactive proteins and peptides from macroalgae, fish, shellfish and marine processing waste. In S.-K. Kim (Ed.), *Marine proteins and peptides: Biological activities*

7. Volatiles

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

and applications (pp. 5–39). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

[7] Khantaphant, S., Benjakul, S., &Ghomi, M. R. (2011). The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (Lutjanusvitta). *LWT-Food Science and Technology*, *44*(4), 1139-1148.

[8] Liang, Y., &Hultin, H. O. (2005). Separation of membranes from acid-solubilized fish muscle proteins with the aid of calcium ions and organic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*(8), 3008-3016.

[9] Pires, C., Teixeira, B., Cardoso, C., Mendes, R., Nunes, M. L., & Batista, I. (2015). Cape hake protein hydrolysates prepared from alkaline solubilised proteins pre-treated with citric acid and calcium ions: Functional properties and ACE inhibitory activity. *Process Biochemistry*, *50*(6), 1006-1015.

[10] Cheng, E. H., &Ockerman, H. W. (2004). Effect of ascorbic acid with tumbling on lipid oxidation of precooked roast beef 1. *Journal of Muscle Foods*, *15*(2), 83-93.

[11] Clark, E. M., Mahoney, A. W., & Carpenter, C. E. (1997). Heme and total iron in ready-to-eat chicken. *Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45,* 124-126.

[12] Yu, Z., Yin, Y., Zhao, W., Liu, J., & Chen, F. (2012). Anti-diabetic activity peptides from albumin against α-glucosidase and α-amylase. *Food Chemistry*, *135*(3), 2078-2085.

[13] Connolly, A., Piggott, C. O., & FitzGerald, R. J. (2014). In vitro α-glucosidase, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory properties of brewers' spent grain protein hydrolysates. *Food Research International*, *56*, 100-107.

[14] 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,*147–56.

[15] 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.

[16] Kim, S., &Wijesekara, I. (2010). Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. *Journal of Functional Foods, 2,* 1–9.

[17] Li-Chan, E.C.Y. (2015). Bioactive peptides and protein hydrolysates: research trends and challenges for application as nutraceuticals and functional food ingredients. *Current Opinion in Food Science, 1,* 28–37.

[18] Nikoo, M., &Benjakul, S. (2015). Potential application of seafood-derived peptides as bifunctional ingredients, antioxidant-cryoprotectant: A review. *Journal of Functional Foods, 19,* 753-764.

[19] Wang, B., Gong, Y. D., Li, Z. R., Yu, D., Chi, C. F., & Ma, J. Y. (2014). Isolation and characterisation of five novel antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of spotless smoothhound (*Mustelusgriseus*) muscle. *Journal of Functional Foods*, *6*, 176–185.

[20] Samaranayaka, A.G.P., & Li-Chan, E.C.Y. (2011). Food-derived peptidic antioxidants: A review of their production, assessment, and potential applications. *Journal of Functional Foods, 3,* 229–254.

[21] Matsui, T., Oki, T., &Osajima, Y. (1999). Isolation and identification of peptidic α-Glucosidase inhibitors derived from sardine muscle hydrolysate.*Z. Naturforsch, 54,*259-263.

[22] Oki, T., Matsui, T., &Osajima, Y. (1999). Inhibitory effect of α-glucosidase inhibitors varies according to its origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *47*(2), 550-553.

[23] Shahidi, F., &Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods,18,* 757–781.

[24] Yarnpakdee, S., Benjakul, S., Nalinanon, S., &Kristinsson, H. G. (2012). Lipid oxidation and fishy odour development in protein hydrolysate from Nile tilapia (*Oreochromisniloticus*) muscle as affected by freshness and antioxidants. *Food Chemistry*, *132*(4), 1781-1788.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]

Effect of washing with distilled water, citric acid and calcium ionon composition of protein isolates from rainbow trout by-product and antioxidantand anti-diabetic activitiesof hydrolysate

Nikoo, M. [1*], Ahmadi Gavlighi, H. [2], Yasemi, M. [3]

1. Department of Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
3. Institute of Technical and Vocational Higher Education & Skills Training of Agriculture Jihad, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran

(Received: 2018/07/24 Accepted:2019/01/04)

In this study, the effect of different treatments including method 1- homogenized by-product (BP-FPI), method 2- washing of homogenized by-product by distilled water (WBP-FPI), method 3-washing of homogenized by-product by $CaCl_2$-citric acid (CaCi-BPFPI), method 4- $CaCl_2$-citric acid treated – washing by distilled water (CaCi-W- BPFPI), method 5- washing by distilled water- $CaCl_2$-citric acid treatment(W-CaCi-BPFPI)on composition of protein isolate from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by-product were investigated. Washing by distilled water (method 2) and distilled water + combination of $CaCl_2$ + citric acid (method 5) had significant effect on heme iron and phospholipid ($P < 0.05$). Washing methods influenced protein yield and the lowest yield (9.4%) was obtained using method 5 ($P < 0.05$). Washing-derived proteins were lighter in color compared with that obtained from by-product. Method 1 resulted in higher redness (9.36) while that obtained with method 5 showed the lowest redness (1.19) ($P < 0.05$). Protein hydrolysate produced from method 5 protein isolate had high antioxidant activity in a dose-dependent manner.Additionally, the presence of small peptides in hydrolysate contributed to its anti-diabetic activities. Results indicated that washing by distilled water (method 2) or combined with $CaCl_2$ + citric acid (method 5) is necessary for production of protein isolate from rainbow trout processing by-product.

Keywords: Rainbow trout, By-product, Washing methods, Composition, Antioxidant activity, Anti-diabetic activity

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

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2023-06-10]