



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

سهیل ریحانی پول^{۱*}، سکینه یگانه^۲

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

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

چکیده	اطلاعات مقاله
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 فلاورزیم 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 کلاته کردن 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 ۸۷/۴۵±۱/۳۸، ۷۹/۲۶±۰/۵۹، ۹۴/۵۶±۱/۶۲ و ۷۱/۴۹±۰/۳۷ درصد اندازه‌گیری شد. در مورد قدرت کاهندگی یون فریک و فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل، بین SPH و FPH اختلاف معنی‌داری ثبت نشد ($p > 0/05$). همچنین از نظر شاخص فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS، FPH و PPH اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند (به ترتیب ۶۹/۱۵±۰/۸۵ و ۶۸/۴۴±۱/۹۳ درصد). بر اساس برابند 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. تقریباً در تمامی آزمون‌ها، کمترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی مربوط به پپتیدهای حاصل از ضایعات مرغ (PPH) بود.	<p>تاریخ های مقاله :</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۴/۳۰</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۲۸</p> <p>کلمات کلیدی:</p> <p>ضایعات میگو، فلاورزیم، پپتیدهای زیست‌فعال، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.</p> <p>DOI: 10.52547/fsct.18.119.307</p> <p>* مسئول مکاتبات: Soheylreyhani@gmail.com</p>

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 ۳۴ 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 متعاقباً 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 فرآورده‌هایی با ارزش افزوده بالاتری مانند سیلاژ [۱] و پپتیدهای زیست‌فعال [۲] تولید کرد. سیلاژ یک فرآورده 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 [۴، 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 (۱۳۹۶) 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، ۱۲، ۱۳، ۱۴] 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 معمولاً 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 کارا تر است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سوپسترا 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^۱ (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^۲ دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تولید پپتیدهای زیست‌فعال (پروتئین‌های آبکافتی)

تولید پروتئین‌های آبکافتی در تحقیق حاضر با استفاده از سه سوپسترا (ضایعات ماهی، مرغ و میگو) انجام شد. به منظور تولید این نوع پروتئین، ابتدا در ارنل ۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه ضایعات قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با $\text{pH}=7/4$ به ارنل اضافه گردید. در مرحله بعد ارنل به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت ضایعات غیرفعال شوند. پس از سپری شدن این زمان به ارنل 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 ارنل اضافه شد. بلافاصله ارنل 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، ارنل به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این دما آنزیم فلاورزایم غیرفعال شد. پس از این مدت و خنک شدن ارنل، محتویات ارنل در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور $g=8000$ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد [۱۲-۱۴]. نتیجه فرایند آبکافت با سه

سوپسترا 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 $g=6700$ در دمای ۴ 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 [۱۶].

= درجه آبکافت (%)

$100 \times (\text{نیتروژن کل نمونه/نیتروژن موجود در محلول } 10 \text{ درصد تری کلرواستیک‌اسید})$
برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

۲-۴- سنجش میزان پروتئین در سه سوپسترا و

پودرهای آبکافتی حاصل

۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین (شامل ۱۰۰ گرم سولفات سدیم یا پتاسیم و ۱۰ گرم سولفات مس و ۱ گرم پودر سلنیوم) و ۲۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک غلیظ را داخل بالن هضم کج‌لداال 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. سپس ۵۰ میلی‌لیتر اسیدبوریک و چند قطره معرف متیل رد را داخل یک ارنل 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 ارنل 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 ارنل توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیترا شد [۱۷] و [۱۸]. میزان پروتئین خام از رابطه زیر به دست آمد.

3. Fish Protein Hydrolyzed
4. Poultry Protein Hydrolyzed
5. Shrimp Protein Hydrolyzed

1. *Litopenaeus vannamei*
2. Novozyme

۲-۵-۳- فعالیت کلاته کردن فلزات

ابتدا محلول ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پیتدهای 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 میلی-مولار 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 ۵۶۲ نانومتر قرائت و فعالیت کلاته‌کردن از طریق رابطه زیر محاسبه گردید [۲۱].

= فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات (%)

$100 \times \left[\frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه}} - 1 \right]$ (جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر-۱)

برای ساخت شاهد، به جای نمونه پروتئینی از آب مقطر استفاده شد. از بوتیل هیدروکسی‌تولون و بوتیل هیدروکسی-آنیزول در غلظت ۲۰۰ ppm برای مقایسه استفاده گردید.

۲-۵-۴- فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-آزینو- بیس - ۳**اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS)**

به منظور اندازه‌گیری این خاصیت در ابتدا محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. پس از سپری شدن این مدت، محلول تا رسیدن به میزان جذب 0.7 ± 0.2 در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (پیتدهای 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

$100 \times \left[\frac{\text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه}} - 1 \right]$ (جذب نمونه- جذب نمونه شاهد)

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS پیتدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولون و بوتیل هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ ppm 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 پیتدهای زیست‌فعال (با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و یک میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار

$100 \times 14 \times$ نرمالیت اسید \times حجم مصرفی برای نمونه = درصد

$1000 \times$ گرم نمونه خشک / نیتروژن

(فاکتور پروتئین) $\times 625$ درصد نیتروژن = درصد خام

۲-۵-۵- آزمون‌های بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی**۲-۵-۱- قدرت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دیفینیل****پیکریل هیدرازیل (DPPH)**

ابتدا پیتدهای زیست‌فعال تا غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب حل شدند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از پیتدهای 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 پیتدها برای مهار رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه شد [۱۹].

= قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

$100 \times \left[\frac{\text{جذب شاهد}}{\text{جذب نمونه}} - 1 \right]$

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پیتدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولون^۶ و بوتیل هیدروکسی‌آنیزول^۷ در غلظت ۲۰۰ ppm مقایسه شد.

۲-۵-۲- قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی

(فریک)

ابتدا یک میلی‌لیتر پیتد با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=6.6$ 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 تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، واکنش خاتمه یافت. در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از این مخلوط با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک کلرید 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 پیتدها است [۲۰]. در اینجا هم برای مقایسه بهتر، از آنتی‌اکسیدان‌های بوتیل هیدروکسی‌تولون و بوتیل هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ ppm استفاده شد.

6. BHT

7. BHA

۶-۲- تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملاً 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 ۱۴/۵ 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 ($p > 0.05$). میزان پروتئین در پودرهای تولیدشده (8.0 ± 1.27 ، 19.1 ± 1.86 و 10.8 ± 0.35 درصد) نسبت به سایر مطالعات انجام شده 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^۱ با استفاده از آنزیم فلاورزایم 69.07 درصد پروتئین داشت [۱۳]. پودر آبکافتی تولیدشده از ضایعات مرغ با استفاده از آلکالاز، 84.66 درصد پروتئین داشت [۲۶]. در تحقیقی ضایعات ماهی با استفاده از فلاورزایم آبکافت و پودری با 73.51 درصد پروتئین تولید شد [۲۷]. پودر آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو با استفاده از آنزیم الکلایز، دارای 42.2 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 تقریباً 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.

($pH=7.4$) مخلوط شدند. در مرحله بعد به این ترکیب، 200 میکرولیتر H_2O_2 (با غلظت 10 میلی‌مول) اضافه و مخلوط حاصل 4 ساعت در دمای 37 درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار گرفت. پس از این زمان، یک میلی‌لیتر TCA $2/8$ درصد و یک میلی‌لیتر TBA 20 میلی‌مول به این مخلوط اضافه شد. این نمونه 15 دقیقه در حمام آبی با دمای 100 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و نهایتاً پس از سرد شدن جذب آن در طول موج 532 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 (%)

$100 \times (\text{جذب شاهد} / \text{جذب نمونه} - 1)$

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پپتیدهای زیست‌فعال، با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی‌تولون و بوتیل هیدروکسی‌آنیزول در غلظت 200 ppm مقایسه شد.

۶-۵-۲- فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید

ابتدا 400 میلی‌گرم از پپتیدهای زیست‌فعال در 10 میلی‌لیتر بافر فسفات 50 میلی‌مول ($pH=7$)، $1/3$ میلی‌لیتر لینولئیک اسید و 10 میلی‌لیتر اتانول $99/5$ درصد حل شد. سپس حجم این محلول با آب مقطر به 25 میلی‌لیتر رسانده شد. این مخلوط در یک لوله آزمایش 30 میلی‌لیتری ریخته (با درپوش پیچی) و در دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 5 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 اندازه‌گیری شد [۲۴]. به 0.1 میلی‌لیتر از مخلوط واکنش، $4/7$ میلی‌لیتر اتانول 0.75 ، 0.1 میلی‌لیتر آمونیوم تیوسیانات 30 درصد و 0.1 میلی‌لیتر فروزکلرید 20 میلی‌مول محول در HCL $3/5$ درصد) اضافه شد. پس از سه دقیقه جذب محلول در طول موج 500 نانومتر قرائت گردید. از بافر فسفات 50 میلی‌مول ($pH=7$) 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 (%)

$100 \times (\text{جذب شاهد} / \text{جذب نمونه} - 1)$

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 ($p>0.05$).

آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک نشان می‌دهد. همانطور که در این جدول مشاهده می‌شود، این شاخص در SPH ($87/45 \pm 1/38$) (درصد) به طور معنی‌داری از دو پروتئین دیگر (PPH و FPH) بیشتر است ($p<0/05$). ضمن اینکه FPH در این زمینه از PPH کارتر و قوی‌تر است ($p<0/05$). فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در SPH آنقدر بالا بود که اختلاف معنی‌داری با BHA (آنتی‌اکسیدان سنتتیک) نداشت ($p>0/05$).

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 می‌دهد. 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

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 ($p<0.05$).

حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین تولیدشده از بافت ماهی تیلاپیا^{۱۱} 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^{۱۲} با استفاده از آنزیم فلاورزایم در بهترین حالت (غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) دارای قدرت مهار معادل ۲۱/۳ درصد بود [۳۲]. پروتئین آبکافتی حاصل از سر و اندرونه ماهی ساردین^{۱۳} 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^{۱۴} 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

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 تقریباً از FPH پژوهش حاضر بیشتر است. در تحقیقی که خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کاتلا^۹ 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^{۱۰} 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

11. *Oreochromis niloticus*
12. *Gallus domesticus*
13. *Sardinella aurata*
14. *Penaeus indicus*

9. *Catla catla*
10. *Salmo salar*

در جدول ۳ فعالیت کلاته کردن 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 (71.49 ± 0.37 درصد) میزان فعالیت کلاته کردن را داراست ($p < 0.05$). در بین این سه پروتئین، FPH از نظر شاخص مذکور در رتبه دوم قرار گرفت و کارایی بالاتری از PPH نشان داد ($p < 0.05$).

حاضر) بسیار کمتر می‌باشد. پروتئین آبکافتی تولیدشده از عضله مرغ با استفاده از آنزیم فلاورزایم در بهترین حالت توانست ۴۰ تا ۶۰ رادیکال‌های DPPH را حذف کند [۳۳]. قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در پروتئین تولیدشده از سینه مرغ (غلطت ۳ تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) بیش از ۸۰ درصد گزارش شد [۳۴].

۳-۲-۲- فعالیت کلاته کردن فلزات

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 ($p < 0.05$).

کاهندگی هر ترکیب، رنگ زرد محلول آزمایش به سایه سبز و آبی تغییر خواهد کرد. جدول ۴ قدرت کاهندگی پروتئین‌های تولیدشده از سه منبع ضایعات را نشان می‌دهد. مطابق جدول زیر، FPH و SPH از نظر این شاخص اختلاف معنی‌داری ندارند ($p > 0.05$). همچنین این دو پروتئین از نظر قدرت کاهندگی، مقادیر برابری با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک ارائه کردند ($p > 0.05$). در بین پروتئین‌ها، کمترین قدرت کاهندگی (جذب ۰/۴۸۴ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) مربوط به PPH بود ($p < 0.05$).

این شاخص در پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کاتلا با آنزیم فلاورزایم حدود ۰/۶ (جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر) گزارش شد [۳]. قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی آزاد با استفاده از آنزیم تریپسین، جذب ۰/۴۲ 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 ۰/۷۶۱ 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

فعالیت کلاته کردن فلزات در پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی گیش زردخط^{۱۵} با استفاده از آنزیم فلاورزایم (درجه آبکافت ۱۵ درصد) بیش از ۸۵ درصد گزارش شد [۴]. 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) کلاته کردن 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 کلاته کردن فلزات توسط پروتئین آبکافتی تهیه شده از فیله ماهی^{۱۶} با استفاده از آنزیم پیپسینی که از ماهی تن اسکمیجک استخراج شده بود، در درجه آبکافت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ درصد به ترتیب ۴۵/۹، ۵۱/۳ و ۵۸/۱ درصد بود [۳۵]. این ارقام تقریباً 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

15. *Selaroides leptolepis*

16. *Nemipterus hexodon*

گزارش شد [۳۲].

تولید شده از استخوان مرغ بود. ضمن اینکه قدرت کاهندگی هر دو پروتئین کمتر از جذب ۰/۲ در طول موج ۷۰۰ نانومتر

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 ($p < 0.05$).

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 (۷۹/۲۶±۰/۵۹ درصد) مربوط به SPH است ($p < ۰/۰۵$). این پروتئین از نظر قدرت مهار رادیکال ABTS با آنتی‌اکسیدان سنتتیک BHT تقریباً برابر است ($p > ۰/۰۵$). FPH و PPH از نظر قدرت مهار رادیکال ABTS اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند ($p > ۰/۰۵$).

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 [۳۴].

۳-۲-۴- 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 نسبتاً پایدار است که به راحتی بوسیله یک آنتی-اکسیدان حذف و یا کاهش می‌یابد [۳۶]. با کاهش رنگ رادیکال ABTS، پروتئین‌های آبکافتی از منابع مختلف به

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 ($p < 0.05$).

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 ۶ 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 (۵۲/۳۴±۱/۰۶ 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.

در مطالعه یگانه و همکاران (۱۳۹۹) پروتئینی که از آبکافت سر ماهی کپور معمولی^{۱۷} با استفاده از آنزیم آلکالاز تولید شد، در مطلوب‌ترین شرایط قدرت مهاری (رادیکال ABTS) معادل ۷۹/۶۴ درصد داشت [۶]. 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

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 ($p < 0.05$).

جدول ۷ فعالیت مهار پراکسیداسیون لیئولیک اسید پروتئین های آبکافتی و آلفاتوکوفرول (به عنوان استاندارد) را نشان می دهد. مطابق جدول هر سه پروتئین از نظر شاخص مورد بررسی اختلاف معنی داری دارند ($p < 0.05$) و SPH بالاترین فعالیت مهار پراکسیداسیون لیئولیک اسید را داراست (94.57 ± 2.18) درصد). FPH (52.34 ± 1.06) درصد) و PPH (82.57 ± 2.18) درصد) در رتبه های بعدی قرار گرفتند. لازم به ذکر است که SPH و a-tocopherol در این زمینه اختلاف قابل ملاحظه ای ارائه نکردند ($p > 0.05$).

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

۳-۲-۶- فعالیت مهار پراکسیداسیون لیئولیک اسید

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 ($p < 0.05$).

تولید شده از ضایعات ماهی (FPH) و مرغ (PPH) تقریباً در تمامی آزمون های سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی مقادیر بیشتری نشان داد و در این زمینه کارا تر بود. FPH و PPH به ترتیب در رتبه های بعدی فعالیت های آنتی اکسیدانی قرار گرفتند.

پروتئین آبکافتی تولید شده از ماهی کاتلا با استفاده از آنزیم فلاورزایم تا حدود ۵۰ درصد توانست پراکسیداسیون لیئولیک اسید را مهار کند [۳]. فعالیت مهار پراکسیداسیون لیئولیک اسید دو پروتئین آبکافتی تولید شده 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]. پروتئین های آبکافتی تولید شده از فیله ماهی با استفاده از سه آنزیم پاپائین، پیسین و تریپسین (در مطلوب ترین حالت) دارای قدرت مهار معادل و کمتر از ۰/۵ در طول موج ۵۰۰ نانومتر بودند [۴۰].

۵- 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*

۴- نتیجه گیری

پروتئین های آبکافتی (پپتیدهای زیست فعال) تولید شده از منابع مختلف ضایعات پروتئینی (ماهی، مرغ و میگو) تحت شرایط یکسان آبکافت (دما، زمان، آنزیم، نسبت آنزیم به سوستر، درجه آبکافت و pH) می توانند فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتی ارائه کنند. در تحقیق حاضر پروتئین آبکافتی تولید شده از ضایعات میگو (سر، پوسته و دم) نسبت به پروتئین های آبکافتی

- [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., Arnaudín, 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. Investigation 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).

- [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.
- 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 antioxidants 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.



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.

ARTICLE INFO

ABSTRACT

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

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 $87.45 \pm 1.38\%$, $79.26 \pm 0.59\%$, $94.56 \pm 1.62\%$, and $71.49 \pm 0.37\%$, 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 ($69.15 \pm 0.85\%$ and $68.44 \pm 1.93\%$ 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).