بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و جداسازی اولیه فرکشن های پپتیدی فرآورده تخمیری سس سوراغ

مهدی نیکو[1]*، حسن احمدی گاولیقی[2]، رامین مناف فر[3]، مهدی ایمانی[4]

۱- استادیار گروه پاتوبیولوژی و کنترل کیفی، پژوهشکده آرتمیا و آبزی پروری، دانشگاه ارومیه
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران
۳- استادیار گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه ارومیه
۴- استادیار گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه

چکیده

سوراغ سس ماهی سنتی تخمیری می باشد که از ماهی ساردین در جنوب کشور تهیه شده و به عنوان چاشنی و طعم دهنده مورد استفاده قرار می گیرد. در این تحقیق، فعالیت های آنتی اکسیدانی سوراغ از طریق مهار رادیکال های آزاد و در مدل زیستی از طریق حفظ زنده مانی و جلوگیری از آسیب DNA اسپرم های موش توسط رادیکال های هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت. سوراغ فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی در مقایسه با اسید آسکوربیک در مهار رادیکال های DPPH، ABTS و هیدروکسیل داشته است. در مدل زیستی، اسپرم های موش در معرض سامانه اکسداسیونی رادیکال هیدروکسیل قرار داده شدند و نتیجه نشان داد که پپتید ها به نحو موثری از آسیب اکسیداتیو DNA موش تحت اثر رادیکال های هیدروکسیل جلوگیری نمود. تشکیل DNAهای تک رشته ای به دلیل استرس اکسیداتیو در حضور پپتیدهای سوراغ به طور معنی داری کاهش یافت. همچنین در حضور پپتید سلول های اسپرمی از درصد زنده مانی بالاتری در مقایسه با گروه کنترل برخوردار بودند. با استفاده از کروماتوگرافی تبادل یونی، ٤ فرکشن پپتیدی جداسازی گردید و فرکشن سوم دارای بالاترین فعالیت مهار رادیکال های ABTS بوده است. فرآورده تخمیری سس سوراغ غنی از پپتید های زیست فعال با فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد.

کلید واژگان: فعالیت آنتی اکسیدانی، نقش محافظت کنندگی DNA، خالص سازی اولیه، پپتید، سس سوراغ.

* مسئول مکاتبات: m.nikoo@urmia.ac.ir

۱- مقدمه

گونه های واکنشگر اکسیژن[1] طی واکنش های نرمال متابولیکی بدن تولید می شوند. تعادل بین سیستم آنتی اکسیدانی بدن و رادیکال های آزاد جهت حفظ عملکرد فیزیولوژیک نرمال بدن ضروریست در غیر اینصورت با بروز استرس اکسیداتیو، مولکول های زیستی در معرض آسیب قرار می گیرند. زمانیکه اجزاء سلولی برای مدت طولانی در معرض آسیب اکسیداتیو قرار گیرند، بیماریهای مزمن بروز می کنند [۱]. در این رابطه رادیکال هیدروکسیل مهمترین رادیکال واکنش گر اکسیژنی می باشد که بلافاصله پس از تشکیل با اجزاء سلولی مانند پروتئین، DNA، فسفولیپید، اسیدهای آمینه و قند واکنش می دهد [۲]. رادیکال های آزاد نه تنها در سیستم های بیولوژیک دارای اهمیت می باشند بلکه همچنین در صنعت غذایی مورد توجه می باشند چون کیفیت مواد غذایی تحت اثر اکسیداسون چربی در زمان فرآوری و نگهداری بسرعت کاهش می یابد. به جهت کنترل اکسیداسیون و کاهش کیفیت فرآورده های غذایی و نیز کاهش استفاده از افزودنی های مصنوعی در مواد غذایی، صنعت غذاهای فراسودمند[2] به سرعت شروع به توسعه نمود [۳]. غذاهای فراسودمند فرآورده هایی هستند که حاوی ترکیبات مختلفی بوده که علاوه بر تامین نیازمندی های غذایی، سبب ارتقاء سلامتی در مصرف کننده نیز می شوند [٤]. به همین دلیل، شناسایی ترکیبات زیست فعال جدید منجر به توسعه بیشتر محصولات فراسودمند گردید [٥]. پپتید های زیست فعال قطعاتی از پروتئین با توالی خاص از اسید آمینه می باشند که در توالی پروتئین مادری فاقد فعالیت زیستی می باشند. این پپتید ها وقتی از زنجیره مادری در اثر آبکافت آنزیمی یا تخمیر آزاد شوند فعالیت زیستی از خود نشان می دهند [٦، ۷]. ویژگی زیست فعالی پپتید ها که بطور معمول از ۲ تا ۲۰ اسید آمینه تشکیل یافته اند، به طول زنجیره پپتید، نوع اسید های آمینه، توالی اسید های آمینه و قرار گیری در موقعیت های انتهایی کربوکسیلیک و آمینو انتهایی زنجیره پپتید یا نزدیک به این موقعیت ها بستگی دارد [۸، ۹]. 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 داشته و دارای اسید های آمینه آبگریز در زنجیره خود می باشند [۱۰، ۱۱]. این پپتید ها دارای قدرت حذف رادیکال های آزاد و توانایی شلاته کردن یون های آهن می باشند [۱۲].

تخمیر یکی از قدیمی ترین روش های محافظت از مواد غذایی به خصوص در قاره آسیا محسوب می شود. شواهد بدست آمده از قرن پنجم در چین نشان می دهد که فرآورده های تخمیری از ماهی تولید و مورد استفاده قرار می گرفته است. این فرآورده ها امروزه از شیر، گوشت، سویا، ماهی و مواد گیاهی تهیه می شوند [۱۳]. فراورده های تخمیری حاوی اسیدهای آمینه و پپتیدهایی هستند که طعم و بوی مخصوصی به محصول می‌دهند. طی فرایند تخمیر، تجزیه پروتئین‌ها توسط آنزیم های تولید شده توسط میکروارگانیزم، آنزیم های دستگاه گوارش و عضله آبزی سبب آزاد شدن پپتید های زیست فعال و اسید هیا آمینه آزاد شده که در افزایش ارزش غذا-دارویی و ماندگاری محصول نقش دارند. مطالعات نشان داده که سس تخمیر شده ماسل[3] [١٤] و خمیر میگو و کریل[4] [١٥، ١٦]. حاوی مقادیر بالایی از پپتیدهای آنتی اکسیدانی می‌باشند. فرآورده های تخمیری آبزیان که به عنوان فرآورده های غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار می گیرند دارای اثرات متعدد زیستی شامل فعالیت آنتی اکسیدانی، ضد سرطان، مهار فعالیت آنزیم مبدل آنژیوتانسین[5] (ضد فشار خون)، کاهش کلسترول و ضد دیابت می باشند [١٤، ١٦-١٩]. سوراغ، سس ماهی سنتی تخمیری ایرانی می باشد که از ماهی ساردین در جنوب کشور تهیه شده و به عنوان چاشنی و طعم دهنده مورد استفاده قرار می گیرد. تا کنون فعالیت های زیستی سس سوراغ مورد بررسی قرار نگرفته است. این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی سس سوراغ را مورد بررسی قرار داده است.

1. Reactive oxygen species (ROS)
2. Functional foods
3. Mussel
4. Krill
5. Angiotensin I converting enzyme (ACE)

۲- مواد و روشها

۲-۱- تهیه نمونه پپتیدی از سس سوراغ

سس سوراغ از فروشگاه محلی شهر بندر عباس (استان هرمزگان) خریداری گردید. جهت تهیه نمونه، ابتدا سوراغ با استفاده از خشک کن انجمادی (مدل ۵۰۰۵، شرکت وکیوم دنا، تهران) خشک شد. سپس نمونه پپتیدی از طریق حل کردن ۱ قسمت پودر با ۵ قسمت آب مقطر تهیه و مخلوط حاصل در حمام آبی با دمای ۳۰ درجه سانتی گراد به مدت ۹۰ دقیقه توسط هم زن الکتریکی بهم زده شد. سپس مخلوط فوق در دور ۱۰۰۰۰ در دقیقه در دمای ٤ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل 1-15PK، شرکت سیگما، آمریکا) گردید [۱۸]. نمونه پپتیدی سپس با استفاده از خشک کن انجمادی خشک و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردیدند. درصد پروتئین نمونه به روش بیورت (Gornall et al., 1949) با استفاده از آلبومین سرم گاوی[6] تعیین گردید.

۲-۲- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH

تاثیر مهار رادیکال های DPPH پپتید های سوراغ به روش Senphan و Benjakul [۲۰] اندازه گیری شد. پپتید در غلظت های مختلف با آب مقطر مخلوط و سپس ۱ میلی لیتر محلول پپتیدی با ۱ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط و به مدت ۱۰ ثانیه هم زده شدند. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی انکوبه شده و جذب نمونه ها در طول موج ۵۱۹ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت شد. فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید ها از طریق فرمول زیر محاسبه گردید: فعالیت حذف کنندگی رادیکال های DPPH = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ۱۰۰

۲-۳- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS

تاثیر حذف کنندگی رادیکال های ABTS سوراغ به روش Senphan و Benjakul [۲۰] اندازه گیری شد. رادیکال های ABTS از طریق مخلوط نمودن محلول ۷/٤ میلی مول ABTS با محلول ۲/٦ میلی مول پرسولفات پتاسیم به نسبت ۱ به ۱ تهیه گردید. مخلوط حاصل سپس برای مدت ۱۲ ساعت در تاریکی و سپس با مقدار مناسب متانول مخلوط تا جذب محلول در طول موج ۷۳٤ نانومتر به ۱/۱ برسد. بعد از رسیدن جذب به این عدد، ۱۵۰ میکرولیتر عصاره پپتیدی با ۲۸۵۰ میکرولیتر محلول رادیکالی در لوله آزمایش مخلوط و پس از ورتکس به مدت ۱۰ ثانیه، به مدت ۲ ساعت در تاریکی انکوبه گردیدند. برای تهیه نمونه کنترل بجای محلول پپتیدی از آب مقطر استفاده گردید. جذب نمونه ها در طول موج ۷۳٤ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر قرائت گردید. فعالیت آنتی اکسیدانی از طریق فرمول زیر محاسبه گردید: فعالیت حذف کنندگی رادیکال های ABTS = جذب کنترل – جذب نمونه/جذب کنترل × ۱۰۰

۲-٤- فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل

توانایی سوراغ در حذف رادیکال های هیدروکسیل به روش Wang و همکاران [۱۰] اندازه گیری شد. یک میلی لیتر محلول ۱/۸٦۵ میلی مول ۱،۱۰-فنانترولین با ۲ میلی لیتر محلول پپتیدی در لوله آزمایش با یکدیگر مخلوط گردیدند. به مخلوط فوق ۱ میلی لیتر محلول ۱/۸٦۵ میلی مول سولفات آهن اضافه و بهم زده شد. با افزودن ۱ میلی لیتر محلول ۰/۰۳ درصد پراکسید هیدروژن واکنش اکسیداسیونی شروع گردید. پس از انکوباسیون برای مدت ۱ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در آون، جذب نمونه ها (As) در طول موج ۵۳٦ نانومتر خوانده شد. مخلوط واکنشی بدون پپتید به عنوان کنترل منفی (An) و مخلوط فاقد پراکسید هیدروژن به عنوان بلانک (Ab) نیز تهیه گردیدند. فعالیت آنتی اکسیدانی سوراغ از طریق فرمول زیر بر حسب درصد محاسبه گردید: فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل = As – An – Ab /An × ۱۰۰

۲-۵- تاثیر سس سوراغ بر خاصیت زنده مانی و آسیب DNA اسپرم های موش در سامانه اکسیداسیونی

بافت بیضه با استفاده از لوپ (بزرگنمایی ۱۰ برابر) از ناحیه اسکروتوم خارج گردید. متعاقباً به سه قطعه‌ی سر، بدنه و دم تقسیم شد. قسمت دم (اپیدیدیم) که محل تجمع اسپرم هاست از

6. BSA

سایر قسمت‌ها جدا و در داخل یک میلی‌لیتر محیط کشت Ham's F10 قرار داده شد و توسط اسکالپل به قطعات کوچک بریده شد. پلیت محتوی محیط کشت در درون انکوباتور CO_2 (دی اکسید کربن ٦ درصد، دمای ٣٦ درجه سانتی گراد) به مدت ٣٠ دقیقه قرار داده شد. متعاقب سی دقیقه قطعات بافتی از درون پلیت برداشته شده و محیط کشت به همراه اسپرم‌ها به داخل میکروتیوب انتقال و با دور ٣٠٠٠ دور در دقیقه به مدت ٥ دقیقه سانتریفیوژ شد. بعد از آن، مایع رویی برداشته شد و پلیت اسپرم با محیط کشت جدید آمیخته شد. در داخل هر میکروتیوب، مقدار ٢٠ میکرولیتر اسپرم موش، ٢٠ میکرولیتر عصاره سوراغ، ٢٠ میکرولیتر پراکسید هیدروژن (١ میلی مول) و ٢٠ میکرولیتر سولفات آهن (٠/٥ میلی مول) به ترتیب ریخته شده و پس از بهم زدن توسط نوک سر سمپلر به مدت ٣٠ ثانیه سانتریفیوژ گردیدند. سپس نمونه ها به مدت ١ ساعت در دمای ٣٧ درجه سانتی گراد در آون انکوبه گردیدند. نمونه های کنترل (شامل فقط سلول های اسپرم) و بلانک (شامل سلول های اسپرم + پراکسید هیدروژن و سولفات آهن) نیز تهیه گردیدند. آسیب DNA توسط رادیکال های آزاد هیدروکسیل به روش رنگ‌آمیزی آکریدین اورنژ بررسی شد که در این روش رنگ‌آمیزی هنگام بررسی لام ها توسط میکروسکوپ فلورسنت، DNA سالم به رنگ سبز و DNA تک‌رشته‌ای به رنگ قرمز دیده می‌شود. درصد زنده مانی اسپرم ها نیز توسط رنگ‌آمیزی ائوزین–نکروزین بررسی شد. در این روش رنگ‌آمیزی در اثر آسیب به غشا پلاسمایی، اسپرم‌ها نسبت به رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. لذا آن دسته از اسپرم‌هایی که هرکدام از قطعات سر، گردن و یا دم آن‌ها رنگ گرفته بود به‌عنوان اسپرم‌های مرده می باشند [٢٢].

٢-٦- خالص سازی اولیه پپتید های سس سوراغ به روش کروماتوگرافی

خالص سازی اولیه سس سوراغ به روش کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون آنیونی HiTrap Q FF و دستگاه FPLC مدل ÄKTAprime plus انجام شد. بافر تریس با پی اچ ٩ به عنوان Binding buffer و بافر تریس پی اچ ٩ حاوی ١ مول کلرید سدیم به عنوان Elution buffer مورد استفاده قرار گرفتند. نمونه پپتید در غلظت ٥ میلی گرم پروتئین در میلی لیتر در binding buffer حل و پس از سانتریفیوژ در دور ١٢٠٠٠ در دقیقه برای مدت ١٠ دقیقه به میزان ٢/٥ میلی لیتر به لوپ ٥ میلی لیتری تزریق گردید. ستون ابتدا با ٥ حجم ستون توسط binding buffer به تعادل رسید و با ٢ حجم ستون شستشو شد تا پیک (های) اتصال نیافته جمع آوری گردند. پیک های اتصال یافته با ستون توسط بافر elution buffer (١٠ حجم ستون) در شدت جریان ٢ میلی لیتر در دقیقه جمع آوری شدند. جذب در حین خالص سازی در طول موج ٢٨٠ نانومتر بوده است. فرکشن ها به مقدار ٢ میلی لیتر توسط کلکتور جمع آوری و فعالیت آنتی اکسیدانی مهار رادیکال های ABTS تمامی پیک ها اندازه گیری شد. بعد از آن ستون با ٥ حجم ستون توسط همین بافر شستشو و با ٢ حجم بافر اولیه به تعادل رسید [١٨].

٢-٧- آنالیز آماری

آنالیز آماری داده ها با استفاده از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) انجام و مقایسه بین میانگین ها توسط آزمون چند دامنه ای دانکن انجام شد. از نرم افزار SPSS شماره ١٦ جهت آنالیز آماری استفاده گردید. معنی داری داده ها در سطح اطمینان ٩٥ درصد ($P<0/05$) بررسی گردید.

٣- نتایج

فعالیت آنتی اکسیدانی سس سوراغ از طریق مهار رادیکال های آزاد DPPH ، ABTS و هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت و نتایج با اسید آسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد مورد مقایسه قرار گرفت. سس سوراغ توانایی آنتی اکسیدانی بالا در مهار رادیکال های DPPH داشت. همچنین با افزایش غلظت پپتید فعالیت آنتی اکسیدانی نیز افزایش یافت. بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در غلظت ٠/٨ و ١ میلی گرم در میلی لیتر بوده ولی تفاوت معنی دار بین این دو غلظت مشاهده نشد (شکل ١). فعالیت آنتی اکسیدانی اسید آسکوربیک در تمامی غلظت ها بالاتر از سس سوراغ بوده است ($P<0/05$). غلظتی از پپتید در سوراغ که توانست نیمی از رادیکال ها را مهار نماید (IC_{50}) معادل ٦٨٤/٥ میکروگرم در میلی بود.

پپتید های سس سوراغ همچنین توانایی بالایی در مهار رادیکال های ABTS از خود نشان دادند. در غلظت ٢٠ میکروگرم در

میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی ۸/۵ درصد بود. با افزایش غلظت تا ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر فعالیت مهار رادیکال به ۹۰ درصد افزایش یافت و بعد از آن افزایش بیشتر غلظت تا ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر تاثیری بر افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی نداشت. غلظت IC_{50} سس سوراغ در مهار این نوع رادیکال معادل ۲۱۹/۵ میکروگرم در میلی لیتر محاسبه شد. در غلظت های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر فعالیت آنتی اکسیدانی در حد ۹۰ درصد و مشابه اسید آسکوربیک بود (شکل ۱).

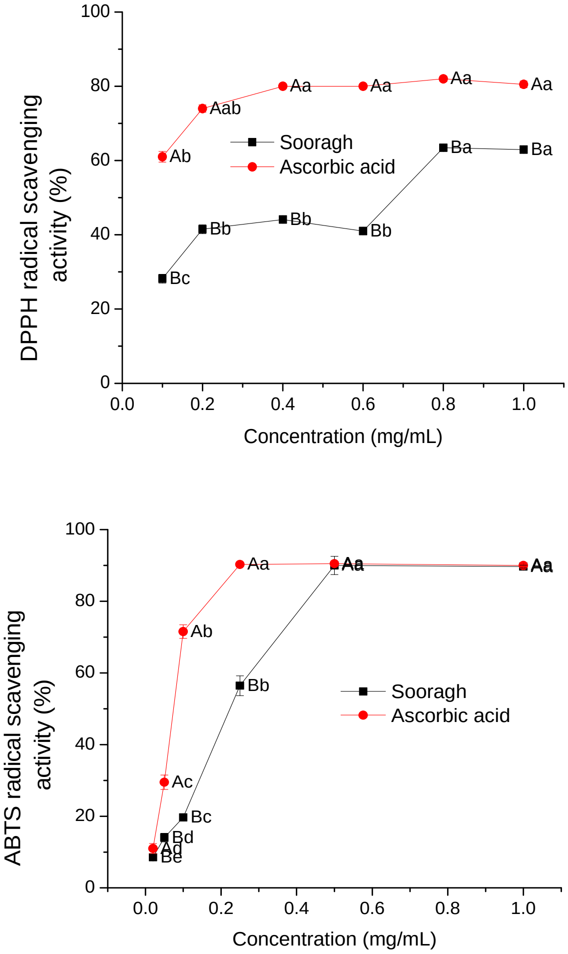


Fig 1 DPPH radical scavenging activity (A) and ABTS radical scavenging activity (B) of sooragh sauce and ascorbic acid. The results are Mean ± SD (n = 3). Different letters within the same parameter indicate the significant differences (P < 0.05).

فعالیت حذف کنندگی رادیکال های هیدروکسیل پپتید های سس سوراغ در غلظت های بین ۲۰ تا ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر مورد بررسی قرار گرفت. پپتید ها توانایی آنتی اکسیدانی در مهار رادیکال های هیدروکسیل نشان دادند به طوریکه در غلظت ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر حدود ۷۳ درصد رادیکال ها مهار شدند در حالیکه اسید اسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد تنها توانست حدود ٦۰ درصد رادیکال ها را مهار نماید (P<۰/۰۵). سس سوراغ دارای حداکثر فعالیت آنتی اکسیدانی (۱۰۰ درصد مهار کنندگی رادیکال ها) در غلظت ۲۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر بود (P<۰/۰۵) نتیجه نشان داد که توانایی پپتید های سس سوراغ در مهار رادیکال های آزاد بالاتر از اسید اسکوربیک بود (P<۰/۰۵). غلظت IC_{50} پپتیدها در مهار این نوع رادیکال معادل ٤۰/٦ میکروگرم در میلی لیتر تعیین شد.

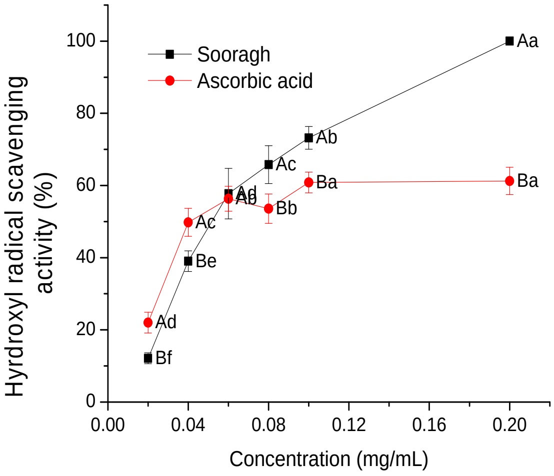


Fig 2 Hydroxyl radical scavenging activity of sooragh sauce and ascorbic acid. The results are Mean ± SD (n = 3). Different letters within the same parameter indicate the significant differences (P < 0.05).

فعالیت آنتی اکسیدانی سس سوراغ در جلوگیری از آسیب DNA سلول های اسپرم موش توسط رادیکال های هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا اسپرم های موش به مدت ۱ ساعت در معرض رادیکال های هیدروکسیل (تولید شده توسط واکنش فنتون) قرار داده شده و سپس درصد اسپرم های دارای DNA تک رشته ای با رنگ آمیزی فلورسنت محاسبه شد. در این روش رنگ‌آمیزی، DNA سالم به رنگ سبز و DNA تکرشته‌ای به رنگ قرمز دیده می‌شود. بعد از انکوباسیون، کمترین آسیب DNA مربوط به گروه کنترل بود (۱۵/۷۵ درصد).

نمونه بلانک در شرایط عدم حضور پپتید بیشترین آسیب را نشان داد (۵۷/۷۵ درصد). پپتید های سس سوراغ در تمامی غلظت ها سبب کاهش آسیب به DNA گردیدند. در غلظت ۲۰۰ تا ۶۰۰ میکروگرم در میلی لیتر کمترین درصد تشکیل DNA تک رشته ای مشاهده شد (بین ۲۲ تا ۲۵ درصد). افزایش بیشتر غلظت پپتید سبب کاهش فعالیت آنتی اکسیدانی گردید بطوریکه در غلظت ۱۰۰۰ میکروگرم در میلی لیتر درصد DNA تک رشته ای ۳۶ درصد بوده است.

همچنین قابلیت زنده مانی اسپرم های در معرض رادیکال های هیدروکسیل قرار گرفته به روش رنگ آمیزی ائوزین–نیگروزین نیز تعیین شد. در این روش رنگ‌آمیزی، اصول کار بر این مبنا استوار است که در اثر آسیب به غشا پلاسمایی، اسپرم‌ها نسبت به رنگ مذکور نفوذپذیر می‌شوند. لذا آن دسته از اسپرم‌هایی که هرکدام از قطعات سر، گردن و یا دم آنها رنگ گرفته باشد به عنوان اسپرم‌های مرده در نظر گرفته می شوند. درصد زنده مانی اسپرم ها در مجموع بین ۳۰ تا ۸۵ درصد بود. نمونه کنترل دارای بالاترین درصد زنده مانی و نمونه حاوی رادیکال هیدروکسیل ولی بدون پپتید کمترین درصد زنده مانی اسپرم ها را نشان داد. در غلظت پپتیدی ۲۰ میکرگرم در میلی لیتر، درصد زنده مانی اسپرم ها حدود ٤٥ درصد تعیین شد. بالاترین درصد زنده مانی مربوط به غلظت های ۲۰۰ تا ٦۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید (بین ٦٤ تا ٦٧/٥ درصد) بوده است.

خالص سازی اولیه پپتید های سس سوراغ توسط روش کروماتوگرافی تبادل یونی با استفاده از ستون آنیونی قوی HiTrap Q FF صورت پذیرفت. به طور کلی، تعداد ٤ پیک در ستون جداسازی شدند که پیک اول مربوط به پپتید های اتصال نیافته بوده است. همزمان با جریان نمک در غلظت ۰ تا ۱ مول در ستون، تعداد ۳ پیک دیگر ظاهر شدند که پیک دوم بزرگتر از سایر پیک ها بوده است. فعالیت آنتی اکسیدانی تمامی پیک ها در مهار رادیکال آزاد ABTS پس از جمع آوری توسط کلکتور بررسی گردید. نتایج نشان داد که تمامی پیک ها فعالیت آنتی اکسیدانی داشته اند. کمترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به پیک های اتصال نیافته و پیک چهارم بوده است. فعالیت آنتی اکسیدانی پیک سوم (Fraction III) بالاتر از سایر نمونه ها بود.

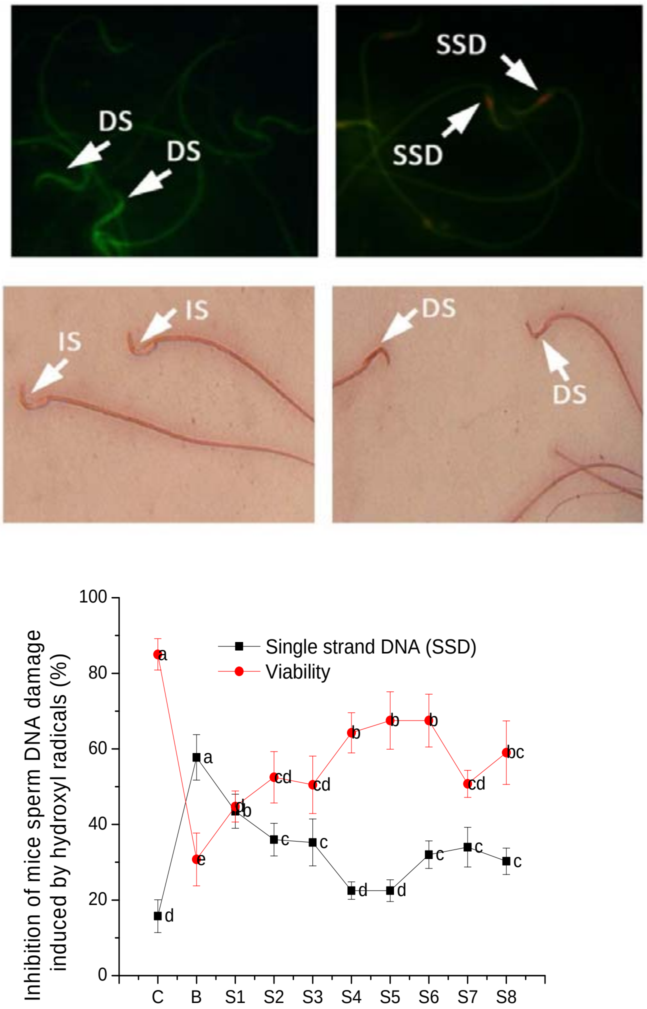
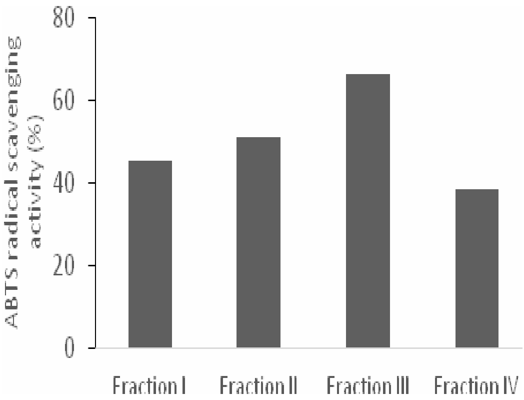


Fig 3 Fluorescent staining for DNA integrity: the normal sperms (double-strand, DS) are presented with light green DNA and the sperms with damaged DNA (single-strand, SSD) are marked with light red stained DNA (1000×). Sperm viability is indicated as percentage of sperms with unstained cytoplasm determined by eosin–nigrosin staining. C: control (Sp); B: blank (Sp + R); S1: (Sp + R + S 20 µg/ mL); S2: (Sp + R + S 50 µg/ mL); S3: (Sp + R + S 100 µg/ mL); S4: (Sp + R + S 200 µg/ mL); S5: (Sp + R + S 400 µg/ mL); S6: (Sp + R + S 600 µg/ mL); S7: (Sp + R + S 1000 µg/ mL); S8: (Sp + R + S 1500 µg/ mL). Sp: sperms; R: hydroxyl radicals; S: sooragh sauce. All data are presented in Mean ± SD (n = 4). Different small letters on columns are representing significant differences (P<0.05).



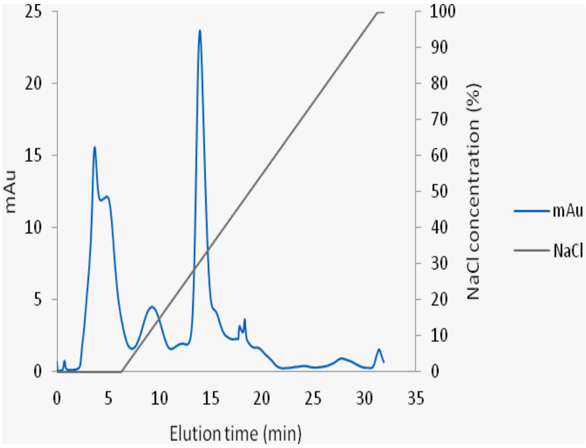


Fig 4 Partial purification of peptides using an anion exchange chromatography column (HiTrap Q FF) coupled with an FPLC system (ÄKTAprime plus).

٤- بحث

پروتئین مواد غذایی از جمله ماهی دارای یکسری توالی زیست فعال[7] در زنجیره خود می باشند که فعالیت زیستی را پس از رها شدن از زنجیره پلی پپتیدی نشان داده اند. این پپتید ها دارای پتانسیل بالقوه برای کابرد در صنایع غذایی و دارویی می باشند [۲۲]. طی آبکافت آنزیمی یا تخمیر پروتئین مواد غذایی، پپتید های زیست فعال که معمولا از۲ تا ۲۰ اسید آمینه تشکیل شده و وزن مولکولی بین ۲۰۰ تا ۱۸۰۰ دالتون دارند آزاد می شوند [۷، ۱۰]. فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید ها به ساختار آنها از حیث اندازه، نوع اسید های آمینه و موقعیت آنها در زنجیره بستگی دارد [٦، ۱۲]. پپتید های زیست فعال تولید شده از منابع مختلف دریایی با فعالیت آنتی اکسیدانی می تواند به عنوان جایگزین سالم آنتی اکسیدان های سنتزی در کنترل اکسیداسیون در فراورده های غذایی و همچنین به عنوان ترکیبات فراسودمند در فرمولاسیون تولید محصولات فراسودمند بکار برده شوند [۳، ۵].

در این مطالعه، فعالیت آنتی اکسیدانی فرآورده تخمیری سوراغ تهیه شده از ماهی ساردین در مهار رادیکال های آزاد مورد بررسی و نتیجه با فعالیت آنتی اکسیدانی اسید آسکوربیک مورد مقایسه قرار گرفت. نتیجه مطالعه نشان دهنده فعالیت بالای سوراغ در مهار رادیکال ها بود. فعالیت مهار رادیکال های DPPH و ABTS پپتید های فرآورده های تخمیری سایر آبزیان نیز گزارش گردید. Kleekayai و همکاران [۱۸] فعالیت مهار رادیکال های ABTS توسط فرآورده تخمیری تایلندی از میگو (Kp-B6 و Kp-R6) را گزارش نمودند. در فرآورده تخمیری ضایعات میگو نشان داده شد که پپتید ها در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر توانستند رادیکال های DPPH را تا ٤۰ درصد مهار نمایند [۲۳]. پپتید های با فعالیت مشابه از سس صدف ماسل آبی [١٤] و فرآورده تخمیری میگو [۱۵] نیز گزارش گردید. همچنین در فرآورده تخمیری گوشت که از استارتر کوجی[8] در تخمیر استفاده شده بود به دلیل فعالیت پروتئازهای موجود در استارتر، پپتید های با فعالیت مهار رادیکال های DPPH طی تخمیر تولید و فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش زمان تخمیر از هفته سوم تا هفته هشتم افزایش یافت [۳]. به طور کلی، فعالیت حذف رادیکال های DPPH و ABTS توسط آنتی اکسیدان به توانایی آن در دادن اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال آزاد و تبدیل آن به گونه رادیکال غیر واکنشی می باشد [٤]. نتیجه این مطالعه نشان داد که پپتید های کوچک زنجیره در سس سوراغ طی زمان تخمیر ماهی ساردین تحت اثر آنزیم های پروتئازی عضله، دستگاه گوارش و میکروارگانیسم ها تولید گردیده و فعالیت بالای آنتی اکسیدانی از خود نشان دادند. از اینرو، سوراغ می تواند به عنوان فراورده غذایی فراسودمند در کنترل فرآیندهای اکسیداتیو در بدن انسان مورد توجه قرار گیرد.

پپتید های تولید شده پس از تخمیر در سس سوراغ توانایی بالایی در مهار رادیکال های هیدروکسیل از خود نشان دادند (IC_{50}

7. Motifs

8. Koji

معادل ۴۰/٦ میکروگرم در میلی لیتر). فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت پپتید افزایش یافت به طوریکه در غلظت ۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر، ۱۰۰ درصد پپتید ها مهار شدند. در این غلظت فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید های سس سوراغ بالاتر از اسید آسکوربیک بوده است (فعالیت آنتی اکسیدانی ٦۱ درصد). پپتید های سس میگو [۲۳] و صدف ماسل آبی [۲٤] نیز توانایی آنتی اکسیدانی بالایی در مهار رادیکال های هیدروکسیل داشته اند. Ohata و همکاران [۳] نشان دادند که سس ماهی بادکنکی دارای بالاترین فعالیت مهار رادیکال های هیدروکسیل (۸۸/٦ درصد) در بین ۷ نوع سس بررسی شده بوده و بعد از آن بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی مربوط به سس تخمیری گوشت بوده است (٦۱/۲ درصد). فعالیت آنتی اکسیدانی سس گوشت در مهار رادیکال های هیدروکسیل بالاتر از سس جوجه (۲٥/۱ درصد) و سس سویا (۲۲/٤ درصد) بوده است. این محققین بیان داشتند که پپتید های آنتی اکسیدانی در هفته ۲٤ تخمیر به میزان زیادی تشکیل شده و در حذف رادیکال های هیدروکسیل شرکت نمودند. رادیکال های هیدروکسیل یکی از مهم ترین رادیکال های گونه های واکنشی اکسیژنی می باشند که سبب ایجاد استرس اکسیداتیو در مواد غذایی و مولکول های زیستی می گردند [۲٥]. این رادیکال ها در بدن انسان بلافاصله پس از تشکیل با ماکرومولکول ها از جمله DNA، پروتئین و اسید های چرب چند غیر اشباع[9] واکنش می دهند و یکی از مهمترین رادیکال ها در اکسیداسیون چربی مواد غذایی می باشند [٤]. از اینرو، پپتید های با فعالیت مهار رادیکال های هیدروکسیل می توانند سبب حفاظت مولکول های زیستی بدن انسان در برابر اثرات مخرب ناشی از این رادیکال ها گردند. نتیجه نشان داده است که سوراغ با فعالیت آنتی اکسیدانی بالا در مهار رادیکال های هیدروکسیل می تواند به عنوان منبع غنی از آنتی اکسیدان طبیعی و فرآورده غذایی فراسودمند مورد استفاده قرار گیرد.

فعالیت آنتی اکسیدانی سس سوراغ در جلوگیری از آسیب DNA سلول های اسپرم موش توسط رادیکال های هیدروکسیل مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا اسپرم های موش در معرض رادیکال های هیدروکسیل قرار داده شده و سپس درصد اسپرم های دارای DNA تک رشته ای با رنگ آمیزی فلورسنت تعیین شد. رنگ آمیزی فلورسنت نشان دهنده آسیب معنی دار به DNA اسپرم های موش در نمونه های فاقد پپتیدهای سس سوراغ بود (٥۷/۷٥ درصد). پپتید های سس سوراغ توانستند به طور معنی داری از آسیب اکسیداتیو DNA در غلظت های مختلف جلوگیری نمایند. کمترین آسیب DNA مربوط به نمونه های حاوی ۲۰۰ و ٤۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید بوده است که دارای کمترین مقدار DNA تک رشته ای بوده است. همچنین پپتید ها توانستند به طور معنی داری سبب حفظ زنده مانی اسپرم ها بعد از طی مدت انکوباسیون گردند. توانایی پپتیدها بر زنده مانی اسپرم ها وابسته به غلظت بوده بطوریکه در غلظت های ۲۰۰ تا ٦۰۰ میکروگرم در میلی لیتر پپتید، درصد زنده مانی بیش از ٦٥ درصد بوده است در حالیکه در نمونه فاقد پپتید درصد زنده مانی تنها ۳۰/۷٥ درصد بود. آسیب اکسیداتیو ناشی از قرار گیری سلول ها در معرض گونه های واکنشی اکسیژنی منجر به آسیب به DNA گردیده که نهایتا در بروز بیماری های متعدد مرتبط با پیری نقش دارند [۱]. این نتیجه نشان داد که پپتید های با ساختار مناسب حین تخمیر ماهی ساردین تولید شده و توانایی جلوگیری از آسیب اکسیداتیو ماکرومولکول ها را داشته و از اینرو مصرف منظم چنین فرآورده هایی می تواند از بروز آسیب به این مولکول ها و بروز بیماری های مرتبط با آنها جلوگیری نماید.

به منظور تایید تولید پپتید در سس سوراغ، خالص سازی اولیه نمونه به روش کروماتوگرافی تبادل یونی صورت پذیرفت. پس از تزریق، تعداد ٤ پیک در ستون جداسازی شدند که پیک اول مربوط به پپتید های اتصال نیافته با ستون بوده است. همزمان با جریان نمک در فاصله ۰ تا ۱ مول در ستون، تعداد ۳ پیک ظاهر شدند و فعالیت آنتی اکسیدانی تمامی پیک ها در مهار رادیکال آزاد ABTS بررسی گردید. تمامی پیک ها فعالیت آنتی اکسیدانی از خود نشان دادند ولی فعالیت مهار رادیکال پیک بزرگ سوم بالاتر از سایر نمونه ها بوده است. مطالعات پیشین نیز توسط ستون های آنیونی یا کاتیونی ضعیف و قوی، فرکشن های پپتیدی فرآورده های تخمیری ماهی و میگو را مورد خالص سازی قرار دادند [۱۸، ۱٤، ۲٤].

---

9. PUFA

۵- نتیجه گیری

این مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی فرآورده تخمیری سس سوراغ را از طریق مهار رادیکال های آزاد و در مدل زیستی مورد بررسی قرار داد. پپتید ها فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی در مقایسه با اسید آسکوربیک به عنوان آنتی اکسیدان استاندارد از خود نشان دادند و در مدل زیستی توانستند از آسیب به DNA سلول های اسپرم موش توسط رادیکال های هیدروکسیل جلوگیری نمایند. خالص سازی اولیه نشان از وجود چهار فرکشن پپتیدی در سس بوده که دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بودند. فرآورده تخمیری سوراغ تولید شده از ماهی ساردین دارای اثرات مثبت آنتی اکسیدانی بوده و به عنوان فرآورده غذایی فراسودمند مطرح می باشد.

٦- منابع

[1] Gabrielsson B., Andersson N., and Undeland I. (2014). Influence of fish consumption and some of its individual constituents on oxidative stress in cells, animals, and humans. pp. 175–217. In: Antioxidants and functional components in aquatic foods. Eds., Kristinsson, H. G. West Sussex, JohnWiley & Sons, Ltd.

[2] Harnedy P.A., and FitzGerald R.J. (2013). Bioactive proteins and peptides from macroalgae, fish, shellfish and marine processing waste. In: Marine proteins and peptides: Biological activities and applications. Eds., Kim, S.-K. West Sussex, John Wiley & Sons, Ltd.

[3] Ohata M., Uchida S., Zhou L., and Arihara K. (2016). Antioxidant activity of fermented meat sauce and isolation of an associated antioxidant peptide. Food Chemistry, 194, 1034–1039.

[4] Chandrasekara A., and Shahidi F. (2011). Bioactivities and antiradical properties of millet grains and hulls. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 9563–9571.

[5] Opheim M., Slizyte R., Sterten H., Provan F., Larssen E., and 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 Biochem., doi:10.1016/j.procbio.2015.04.017.

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

[7] Jemil I., Jridi M., Nasri R., Ktari N., Salem R.B.S.S., Mehiri M., Hajji M., and Masri M. (2014). Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. Process Biochemistry, doi: 10.1016/j.procbio.2014.03.004.

[8] Patil P., Mandal S., Tumar S., and Anand S. (2015). Food protein-derived bioactive peptides in management of type 2 diabetes. European Journal of Nutrition, doi: 10.1007/s00394-015-0974-2.

[9] Giri, A., and Ohshima, T. (2012). Bioactive marine peptides: nutraceutical value and novel approaches. Advances in Food and Nutrition Research, 65, 73–105.

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

[11] 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.

[12] Aluko R. (2015). Amino acids, peptides, and proteins as antioxidants for food preservation. pp. 105–140. In: Handbook of antioxidants for food preservation. Eds., Shahidi, F. Cambridge, Woodhead Publishing Limited.

[13] Tanasupawat, S., and Visessanguan, W. (2014). Fish fermentation. In Boziaris, I.S. (Ed.), *Seafood Processing: Technology, Quality and Safety* (pp. 177-207). West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd.

[14] Rajapakse N., Mendis E., Jung W.K. Je J.Y., and Kim S.K. 2005. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. Food Research International, 38, 175–182.

[15] Peralta E., Hatate H., Watanabe D., Kawabe D., Murata H., and Hama Y. (2005). Antioxidative activity of Philippine salt-fermented shrimp paste and variation of its contents during fermentation. Journal of Oleo Science, 54, 553–558.

[16] Faithong N., Benjakul S., Phatcharat S., and Binsan W. (2010). Chemical composition and antioxidative activity of Thai traditional fermented shrimp and krill products. Food Chemistry, 119, 133–140.

[17] Je J.Y., Park J.Y., Jung W.K., Park P.J., and Kim S.K. (2005). Isolation of angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitor from fermented oyster sauce, *Crassostrea gigas*. Food Chemistry, 90, 809–814.

[18] Kleekayai T., Harnedy P.A., O'Keeffe M.B., Poyarkov A.A., CunhaNeves A., Suntornsuk W., and FitzGerald R.J. (2015). Extraction of antioxidant and ACE inhibitory peptides from Thai traditional fermented shrimp pastes. Food Chemistry, 176, 441–447.

[19] Harada K., Makino Y., Yamauchi T., Fukuda N., Tamara M., Okubo Y., Maeda T., Fukuda Y., and Shiba T. (2007). Efficacy of puffer fish (*Takifugu rubripes*) sauce in reducing hydroxyl radical damage to DNA assessed using the apurinic/apyrimidinic site method. International Journal of Molecular Medicine, 20, 309-314.

[20] Senphan, T., and Benjakul, S. (2014). Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Functional Foods, 6, 147–156.

[21] Rezazadeh-Reyhani, Z., Razi, M., Malekinejad, H., and Sadrkhanlou, R. (2015). Cytotoxic effect of nanosilver particles on testicular tissue: Evidence for biochemical stress and Hsp70-2 protein expression. Environmental Toxicology and Pharmacology, 40, 626–638.

[22] Samaranayaka A.G.P., and 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.

[23] Sachindra N.M., and Bhaskar N. (2008). In vitro antioxidant activity of liquor from fermented shrimp biowaste. Bioresource Technology, 99, 9013–9016.

[24] Jung, W.K., Rajapakse, N., and Kim, S.K. (2005). Antioxidative activity of a low molecular weight peptide derived from the sauce of fermented blue mussel, *Mytilus edulis*. European Food Research and Technology, 220:535–539.

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

Antioxidant activity and partial purification of peptides from fermented sooragh sauce product

Nikoo, M. [1*], Ahmadi Gavlighi, H. [2], Manaffar, R. [3], Imani, M. [4]

1. Assistant professor, Department Pathobiology and Quality Control, Artemia and Aquaculture Research Institute, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran
2. Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran
3. Assistant professor, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran
4. Assistant professor, Faculty of Veterinary science, Urmia University, Urmia, West Azerbaijan, Iran

Sooragh is an Iranian traditional sauce made from sardine in Southern Iran and is consumed as flavoring and condiment. In this study, free radical scavenging activity and antioxidant activity of sooragh in biological model system through the inhibition of mice sperm's DNA from oxidative damage resulting from hydroxyl radicals were determined. Sooragh sauce peptide showed considerable antioxidant activity against DPPH, ABTS and hydroxyl radicals compared to ascorbic acid ($P<0.05$). In biological model system, mice sperms were exposed to hydroxyl radical oxidizing system and results indicated that peptides effectively inhibited mice sperm's DNA from oxidation as evidenced by lowering the formation of single stranded DNA with the coincidental higher viability in sperm cells ($P<0.05$). Using anion exchange chromatography, four peptide fractions were separated and fraction III showed the highest ABTS radical scavenging activity ($P<0.05$). Traditional fermented sooragh sauce is rich in bioactive peptides with antioxidant activity.

Keywords: Antioxidant activity, DNA protecting effect, Partial purification, Peptides, Sooragh

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