مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی با وزن‌های مولکولی مختلف حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر

سید محمود ربیعی[۱]، سکینه یگانه[۲*]، مینا اسمعیلی خاریکی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری. ایران.

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

۳- استادیار، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت:۱۴۰۳/۹/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۹

کلمات کلیدی:

مهار رادیکال آزاد،

ضایعات،

کفال ماهیان،

وزن مولکولی،

الترافیلتر

DOI:10.22034/FSCT.22.162.29.

* مسئول مکاتبات:

skyeganeh@gmail.com;
s.yeganeh@sanru.ac.ir

چکیده

مدیریت ضایعات آبزیان از طریق تولید محصولات دارای ارزش افزوده از اهمیت زیادی برخوردار است. از جمله محصولات دارای ارزش افزوده با خواص بسیار متعدد (از جمله خواص کف‌زایی، امولسیفایری، آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی و ...) می‌توان به پروتئین‌های آبکافتی اشاره کرد. عوامل مختلفی از جمله وزن مولکولی و غلظت پروتئین‌های آبکافتی می‌توانند بر خواص مذکور تاثیرگذار باشند. لذا در پژوهش حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر در محدوده های مختلف وزن مولکولی و غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ابتدا آبکافت ضایعات ماهی با آلکالاز (غلظت ۱٪) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH=۸ به مدت ۱۲۰ دقیقه انجام شد (شرایط بهینه بر اساس پیش‌آزمون). سپس محلول پروتئین آبکافت‌شده با الترافیلترهای ۳ و ۱۰ کیلودالتون به وزن‌های مولکولی کمتر از ۳، بین ۳ تا۱۰ و بیشتر از ۱۰ کیلودالتون تقسیم گردید. به منظور ارزیابی تأثیر وزن مولکولی و غلظت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی، از شاخص‌های قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و قدرت کاهندگی یون فریک استفاده شد. سنجش قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS نشان داد که بین وزن‌های مولکولی مختلف اختلاف معنی‌داری وجود دارد و بیشترین و کمترین میزان به‌ترتیب در وزن مولکولی ۳-۱۰ و کمتر از ۳ کیلودالتون ثبت شد (p<۰/۰۵). کمترین میزان IC_{50} برای قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و ABTS نیز برای نمونه با وزن مولکولی بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون محاسبه گردید (p<۰/۰۵). قدرت مهار رادیکال‌های آزاد و قدرت کاهندگی آهن با افزایش غلظت، در تمامی وزن‌های مولکولی بیشتر شدند (p<۰/۰۵). در بین فرکشن‌های مختلف نیز نمونه با وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون بیشترین قدرت کاهندگی آهن را نشان داد (p<۰/۰۵). با توجه به نتایج، می‌توان اظهار داشت پروتئین آبکافتی تولیدشده در این تحقیق، به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی (به ویژه در وزن مولکولی ۳-۱۰ کیلودالتون) قابل استفاده می‌باشد.

۱-مقدمه

پروتئین‌ها یکی از ترکیبات اساسی و ضروری بافت‌های موجودات زنده هستند که در فعالیت‌های زیستی و فرآیندهای فیزیولوژیک مرتبط با سلول‌ها نقش عمده‌ای را ایفا می‌کنند [۱]. در مواد غذایی نیز پروتئین‌ها یک درشت مغذی مهم به‌عنوان منبع انرژی و اسیدهای آمینه مطرح هستند. بسیاری از خواص فیزیولوژیک و کارکردی پروتئین‌ها با پپتیدهای زیست فعال موجود در ساختارشان مرتبط است. تحقیقات نشان داده است که بیش‌تر پپتیدهای زیست‌فعال در توالی پروتئین اصلی خود غیر فعال هستند [۲] اما پس از آزادشدن طی فرآیند هضم گوارشی یا با استفاده از روش‌های مختلف فرآوری، فعالیت فیزیولوژیک خود را نمایان می‌سازند [۳]. پروتئین‌های آبکافتی حاصل از آبکافت (شیمیایی، بیوشیمیایی و اتولیز) سوبستراهای پروتئینی هستند. یکی از کارآمدترین تکنیک‌ها به منظور تولید این ترکیبات، روش آبکافت آنزیمی است که از تکنیک‌های جالب توجه در جهت اصلاح پروتئین‌ها است [٤]. به طور کلی، آنزیم‌هایی با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم‌ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن‌جمله می‌توان به پایداری بیشتر در حرارت و pH بالا و خصوصیات مناسب پروتئولتیکی اشاره نمود [۵]. پروتئین‌های ناشی از این روش مخلوطی از قسمت‌های مختلف پپتیدی (دی، تری و الیگوپپتید) با محدوده متنوعی از وزن‌های مولکولی می‌باشند که با تولید گروه‌های آبدوست باعث افزایش حلالیت پروتئین می‌شوند و در نتیجه خواص کارکردی و زیست فعالی پروتئین را بهبود می‌بخشند. پروتئین‌های آبکافتی دارای خواص عملکردی (حلالیت، شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی، ظرفیت کف‌زایی و پایداری کف، ظرفیت جذب روغن و ظرفیت نگهداری آب) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند [٦ و ۷]. عوامل مختلفی از جمله نوع منبع پروتئینی و آنزیم [٦ و ۸]، نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، زمان [۹] درجه آبکافت [۸، ۱۰ و ۱۱]، وزن مولکولی پپتیدهای حاصله [۱۲ و ۱۳] و pH می‌توانند خواص عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار دهند.

به دلیل وجود پیوندهای دوگانه در بافت و به خصوص در روغن ماهی، این ماده غذایی به شدت مستعد فساد اکسیداسیونی می‌باشد. از جمله ترکیبات حاصل از فساد اکسیداسیونی می‌توان به رادیکال‌های آزاد و اکسیژن فعال اشاره کرد. این رادیکال‌ها منجر به واکنش‌های شیمیایی نامطلوب و بیولوژیکی می‌شوند. امروزه جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها، بیش‌ترین نگرانی را در صنایع محصولات غذایی به وجود آورده و این امر به مساله‌ای بسیار حائز اهمیت بدل شده است [١٤]. محصولات اکسیداسیون چربی به‌طور بالقوه برای سلامتی انسان مضر هستند و مصرف مکرر از این مواد غذایی ممکن است منجر به سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و آلزایمر شوند. استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی به منظور جلوگیری از فساد اکسیداتیو و کاهش بیماری‌های ناشی از این فرآیند در محصولات غذایی به یکی از اهداف مهم صنعت مواد غذایی تبدیل شده است [۱۵]. بنابراین کنترل مؤثر و حذف سریع رادیکال‌های آزاد اضافی برای حفظ سلامتی موجود زنده و بهبود عملکرد آن بسیار حیاتی است. مکمل‌های غذایی با خصوصیات آنتی‌اکسیدانی می‌توانند موجب بهبود سلامتی موجود زنده شوند [۹].

از آنجا که یکی از اهداف تولید این پروتئین‌ها، تولید موادی با ارزش افزوده بالا است، بنابراین به منظور تجاری‌سازی و کاهش هزینه‌های تولید، انتخاب نوع سوبسترا بسیار مهم است. معمولا برای چنین اهدافی بسته به نوع کارائی مورد نظر، از ضایعات پروتئینی استفاده می‌کنند. بر اساس سالنامه آماری شیلات ایران (۱٤۰۱-۱۳۹۷) در سه استان شمالی ایران در سال ۱٤۰۱ مجموع آمار صید ۳۲۵۱۵ تن بوده است و ۱۳۳۹٦ تن آن را ماهیان استخوانی تشکیل می‌دهند که کفال ماهیان بخشی از این صید را شامل می‌شوند [۱۷]. کفال ماهیان دارای دو گونه حائز اهمیت به نام‌های

کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) و کفال طلایی (*Liza aurata*) هستند که در مدت مهر تا فروردین صید می‌شوند [۱۸]. لذا حجم زیادی از ضایعات از مصرف این ماهیان تولید می‌شود که استفاده بهینه از آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. با توجه به توضیحات ارایه شده تحقیقی با هدف بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تهیه شده از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر انجام شد که در آن، بر اساس درجه آبکافت و خواص آنتی اکسیدانی، بهترین زمان برای آبکافت ضایعات این ماهیان با آنزیم آلکالاز، ۱۲۰ دقیقه به دست آمد (۱۹). و تحقیق حاضر در ادامه‌ی تحقیق ذکر شده با هدف بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تهیه شده از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر در اوزان مولکولی و غلظت‌های مختلف انجام شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱- آماده‌سازی ضایعات ماهیان کفال

۲۰ قطعه ماهی کفال (*Liza aurata* و *Liza saliens*) با میانگین وزنی ۵۰ ± ۳۰۰ گرم از بازار ماهی‌فروشان شهرستان بابل تهیه و در جعبه‌های یونولیتی به همراه یخ (۱: ۳ وزنی/ وزنی) به سرعت به آزمایشگاه محل انجام تحقیق منتقل گردید. پس از شستشو با آب سرد (جهت برطرف کردن آلودگی‌ها و موکوس از سطح ماهیان)، سر زنی، دم‌زنی و تخلیه محتویات درون شکم ماهیان صورت گرفت. در این تحقیق از سر، باله و محتویات درون شکم ماهی کفال به عنوان ضایعات ماهی در ادامه مراحل تحقیق استفاده شد. ضایعات ماهیان با چرخ گوشت به طور کامل چرخ شده و پس از بسته‌بندی، در دمای فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) تا روز آزمایش نگهداری شدند.

۲-۲- آبکافت ضایعات ماهیان کفال

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا برای هر تیمار مقدار ۱۰۰ گرم ضایعات چرخ‌شده کفال‌ماهیان در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و با آب مقطر با نسبت ۱: ۲ (v/w) مخلوط و با هم‌زن به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شدند. جهت غیر فعال‌کردن آنزیم‌های داخلی، نمونه‌ها در حمام آب داغ در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار داده شدند. مقدار آنزیم آلکالاز (2.4 L, Novozymes, Denmark) ۱/۵ درصد (حجمی/وزنی)، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد، pH معادل ۸ و زمان ۱۲۰ دقیقه (شرایط واکنش آبکافت بر اساس حد بهینه مشخص‌شده در مطالعه قبلی نویسندگان (۱۹)) در نظر گرفته شد. پس از پایان واکنش آبکافت، نمونه‌ها به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم آلکالاز، به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی (Memmert WNB 29, Germany) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به‌منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین‌های محلول، تحت عمل سانتریفوژ (۲۰ دقیقه با دور g۸۰۰۰) در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (Sigma, 2-16KL) قرار داده شدند و نهایتا مایعات رویی به وسیله سمپلر جدا و برای آنالیزهای مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردیدند [۱۹]. میزان پروتئین محلول و درجه آبکافت پروتئین آبکافتی به‌ترتیب ۰/۵۸ ± ۱۸/۷۳ میلی‌گرم/میلی‌لیتر و ۰/۷۲ ± ۳۷/۵۳ درصد محاسبه شدند. محصول آبکافت، با استفاده از الترافیلترهای ۳ و ۱۰ کیلودالتون (Amicon Centrifugal Filter, Merck) به بخش‌های کوچکتر از ۳ کیلو دالتون، بین ۳ الی ۱۰ کیلودالتون و بزرگتر از ۱۰ کیلودالتون تقسیم‌بندی شدند. بدین منظور ابتدا محلول پروتئین آبکافت شده بوسیله‌ی الترافیلترهای ۱۰ کیلودالتون و با استفاده از سانتریفیوژ یخچال دار (۵۰۰۰ g، دمای ٤ درجه سانتی گراد و به مدت ٤۰ دقیقه) فیلتر شد. محلول باقی مانده در بالای فیلتر به عنوان نمونه بیشتر از ۱۰ کیلودالتون در نظر گرفته شد. محلول عبور کرده از فیلتر مجددا با الترافیلتر ۳ کیلودالتون و به روش ذکر شده در بالا جداسازی شد. محلول باقی مانده در بالای فیلتر به عنوان فرکشن ۳ تا ۱۰ کیلودالتون در نظر گرفته شد و محلول رد شده از فیلتر به عنوان نمونه کمتر از ۳ کیلودالتون جداسازی شد. و سپس سنجش فعالیت آنتی- اکسیدانی به روش‌های مختلف برای هر کدام از فرکشن‌ها انجام شد.

۲-۳- سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت‌های مختلفی (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه شد و برای انجام این آزمایش به حجم معینی از محلول نمونه، همان میزان از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول اضافه گردید. مخلوط حاصل به خوبی تکان داده و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد. سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer UV-M51 UV/Vis, Italy) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. درصد مهار رادیکال طبق رابطه زیر محاسبه گردید [۹] که در این رابطه Ab جذب شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر و As جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر می‌باشد.

$$DPPH\ (\%) = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100$$

٤-۲- سنجش قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت‌های مختلفی (۱، ۲ و ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه گردید و برای بررسی این ویژگی، ۱ میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی با غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (با pH=٦/٦) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم فری-سیناید ۱ درصد مخلوط شد. سپس ترکیب بدست آمده ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و متعاقبا ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. در مرحله بعد این محلول ۱۰ دقیقه با گردش ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و فاز رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد ترکیب شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. هر چه جذب بیشتر باشد قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی نیز بیشتر است [۲۲].

۵-۲- سنجش قدرت فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه و به منظور سنجش فعالیت مهارکنندگی از روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد [۲۳]. محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/٤٥ میلی‌مولار تهیه و به مدت ١٦ ساعت در دمای محیط و در مکان تاریک نگه‌داری گردید. پس از طی زمان مورد نظر، رقیق‌سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳٤ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق‌سازی‌شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. پس از طی زمان مورد نظر، جذب نمونه‌ها در طول موج ۷۳٤ نانومتر قرائت شد. به منظور مقایسه نیز از غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS بر اساس رابطه زیر محاسبه گردید که در این رابطه Ab جذب شاهد در طول موج ۷۳٤ نانومتر و As جذب نمونه در طول موج ۷۳٤ نانومتر می‌باشد.

$$ABTS\ (\%) = \frac{Ab - As}{Ab} \times 100$$

٦-۲- تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی انجام گردید. تمام شاخص‌ها حداقل با سه تکرار تعیین شدند و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، مقایسه میانگین‌ها برای تعیین تاثیر محدوده وزن مولکولی بر فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین آبکافتی با آنالیز واریانس یک طرفه و برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید. تمامی تجزیه و تحلیل ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام شد.

۳- نتایج

۱-۳- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

نتایج سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در وزن‌های مولکولی کمتر از ۳، بین ۳ الی ۱۰ و بالای ۱۰ کیلودالتون نشان داد (جدول ۱) که با افزایش غلظت، قدرت مهارکنندگی نیز در تمامی وزن‌ها افزایش می‌یابد (p<۰/۰۵). در تمامی غلظت‌ها، بین وزن‌های مختلف مولکولی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین و کمترین میزان به‌ترتیب در وزن مولکولی ۳-۱۰ و کمتر از ۳ کیلودالتون مشاهده شد (p<۰/۰۵). در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، بین تیمارهای با وزن مولکولی ۳-۱۰ و بالای ۱۰ کیلودالتون اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵).

Table1: DPPH radical scavenging activity (%) of protein hydrolysate in different molecular weight

Molecular weight (kDa)	Concentration (mg/ml)				
	0.5	1	1.5	2	2.5
<3	15.05±0.61 ^{Aa}	42.70±1.23 ^{Ba}	55.29±1.27 ^{Ca}	62.31±1.71 ^{Da}	78.48±1.06^{Ea}
3-10	27.92±0.88 ^{Ac}	50.20±1.03 ^{Bb}	70.37±0.63 ^{Cc}	80.65±0.61^{Dc}	97.06±2.97 ^{Ec}
>10	25.04±0.34 ^{Ab}	50.73±0.53 ^{Bb}	62.94±0.61 ^{Cb}	73.98±0.46 ^{Db}	90.12±1.39 ^{Eb}

Different uppercase and lowercase letters in each raw and column show significant difference among different concentrations and molecular weight, respectively (p< 0.05).

نتایج محاسبه IC_{50} نشان داد (جدول ۲) که بین وزن‌های مولکولی مختلف اختلاف معنی‌داری وجود داشت، به طوری که کمترین و بیشترین مقدار پروتئین مورد نیاز برای رسیدن به IC_{50} به‌ترتیب در وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلودالتون و کمتر از ۳ کیلودالتون ثبت شد (p<۰/۰۵).

Table 2: IC_{50} value for DPPH radical scavenging activity

Molecular weight (kDa)	>10	3-10	<3
IC_{50} (mg/ml)	0.99±0.010^{b}	0.90±0.007^{a}	1.27±0.020^{c}

Different letters show significant difference (p<0.05).

۲-۳- قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

نتایج سنجش قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در جدول ۳ نشان داده شده است. مطابق این جدول با افزایش غلظت، قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در تمامی وزن‌های مولکولی افزایش معنی‌داری پیدا کرد، به طوریکه بیشترین میزان در غلظت ۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (p<۰/۰۵). در تمامی غلظت‌ها نیز بین وزن‌های مختلف مولکولی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و با افزایش وزن مولکولی، قدرت کاهندگی به طور معنی‌داری افزایش یافت و بیشترین مقدار در وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون به دست آمد (p<۰/۰۵).

Table 3: ferric ion (Fe^{+3}) reduction power of protein hydrolysate in different molecular weight

Molecular weight (kDa)	Concentration (mg/ml)		
	1	2	3
<3	0.160±0.003^{Aa}	0.262±0.008 ^{Ba}	0.323±0.011 ^{Ca}
3-10	0.267±0.004^{Ab}	0.354±0.004 ^{Bb}	0.432±0.003 ^{Cb}

>10	0.283±0.003 Ac	0.367±0.007 Bc	0.493±0.008 Cc

Different uppercase and lowercase letters in each raw and column show significant difference among different concentrations and molecular weight, respectively (p<0.05).

۳-۳- فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

نتایج سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS در وزن‌های مولکولی کمتر از ۳، بین ۳ الی ۱۰ و بالای ۱۰ کیلودالتون نشان داد (جدول ٤) که با افزایش غلظت، قدرت مهارکنندگی نیز در تمامی وزن‌ها افزایش پیدا کرد و بیشترین میزان در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده شد (p<۰/۰۵). در تمامی غلظت‌ها نیز بین وزن‌های مختلف مولکولی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و بیشترین و کمترین قدرت مهارکنندگی به‌ترتیب در وزن مولکولی ۳-۱۰ و کمتر از ۳ کیلودالتون ثبت شد (p<۰/۰۵).

Table 4: ABTS radical scavenging activity (%) of protein hydrolysate in different molecular weight

Molecular weight (kDa)	Concentration (mg/ml)				
	0.5	1	1.5	2	2.5
<3	3.39±0.92 Aa	24.93±0.71 Ba	34.66±2.00 Ca	54.17±1.08 Da	70.09±0.56 Ea
3-10	13.88±0.43 Ac	38.68±0.70 Bc	62.48±0.08 Cc	76.14±2.88 Dc	82.94±1.41 Ec
>10	9.20±0.57 Ab	30.79±0.43 Bb	54.45±0.07 Cb	68.11±0.85 Db	77.60±1.27 Eb

Different uppercase and lowercase letters in each raw and column show significant difference among different concentrations and molecular weight, respectively (p<0.05).

نتایج بررسی میزان IC_{50} نشان داد که بین وزن‌های مولکولی مختلف اختلاف معنی‌دار وجود دارد (p<۰/۰۵) و وزن مولکولی ۳ الی ۱۰ کیلودالتون کمترین پروتئین مورد نیاز برای رسیدن به IC_{50} را دارا بود (جدول ۵).

Table 5: IC_{50} value for ABTS radical scavenging activity

Molecular weight (kDa)	>10	3-10	<3
IC_{50} (mg/ml)	1.35±0.01[b]	1.10±0.01[a]	1.78±0.02[c]

Different letters in each raw show significant difference (p<0.05).

٤-بحث

حذف رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌گیرد. بنابراین اندازه‌گیری مقدار آن می‌تواند نشان‌دهنده وضعیت آنتی‌اکسیدانی یک ترکیب باشد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار بوده و زمانی‌که از یک آنتی‌اکسیدان الکترون دریافت کند مهار خواهد شد [٢٤]. بنابراین انتظار می‌رود در صورت عملکرد پروتئین آبکافتی ضایعات کفال به عنوان آنتی-اکسیدان، با افزایش غلظت پروتئین آبکافتی در تحقیق حاضر میزان قدرت مهارکنندگی DPPH افزایش و مقدار رادیکال آزاد DPPH کاهش یابد. تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد. پپتیدهای با اندازه کوتاه‌تر تاثیر گسترده‌تری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و با درجه آبکافت بیشتر این امر حاصل می‌گردد. ولی در نهایت توالی پپتیدها، ترکیب و درصد آبگریز بودن آن‌ها خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای جداشده را مشخص می‌کند [۲۵-۲۷]. همانطور که در نتایج حاصل از سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در اوزان مختلف مولکولی مشاهده شد، با افزایش غلظت، قدرت مهارکنندگی نیز در تمامی وزن‌ها افزایش پیدا کرد. همچنین در وزن مولکولی بین ۳-۱۰ کیلودالتون کمترین

پروتئین مورد نیاز برای رسیدن به IC_{50} وجود داشت. در مطالعه‌ای بر روی پروتئین آبکافتی پولاک آلاسکا مشخص شد که بین وزن‌های مختلف مولکولی زیر ۱، ۱ الی ۳، ۳ الی ۵، ۵ الی ۱۰ و ۱۰ الی ۳۰ کیلودالتون خاصیت آنتی‌اکسیدانی حذف رادیکال آزاد در وزن زیر ۱ کیلودالتون بیشترین مقدار است [۲۸]. در تحقیق Gbogouri و همکاران (۲۰۰٤) در آبکافت سر ماهی سالمون با استفاده از آلکالاز، وزن مولکولی پپتیدها ویژگی آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار داد و به طور کلی اوزان ٤/۲ الی ۱۳/۲ کیلودالتون به عنوان وزن بهینه گزارش شد [۲۹]. در آبکافت پروتئین گندم، بررسی مهار رادیکال DPPH نشان داد با افزایش زمان آبکافت و کاهش اندازه پپتیدهای تولیدشده، بر قابلیت حذف رادیکال‌های آزاد پپتیدها افزوده شد [۳۰]. در مطالعه Lahart و همکاران (۲۰۱۱) در مورد آبکافت کازئین نیز با پیشرفت آبکافت، وزن مولکولی پروتئین آبکافتی حاصل کاهش یافت و با کاهش وزن مولکولی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر شد [۳۱]. آنزیم‌های مختلف پیوندهای مختلفی را می‌شکنند و توان ایجاد وزن مولکولی مختلفی را دارند و در نهایت اوزان مختلف اثر مختلفی را بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی خواهند گذاشت که متاثر از خواص پپتیدهای حاصل از آبکافت می‌باشد [۳۱]. به عنوان مثال در تحقیق Li و همکاران (۲۰۰۸) وزن مولکولی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی از جمله مهار رادیکال آزاد را داشتند [۳۲]. در مطالعه Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) بین اوزان کمتر از ۳۵۰۰، ٦۵۰۰ الی ۱۲۲۰۰ و بیشتر از ۱۲۲۰۰ دالتون پپتیدهای حاصل از آبکافت پروتئین عضله کوسه وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون بهترین وضعیت آنتی‌اکسیدانی را نشان داد [۳۳]. علاوه بر این موارد، در مطالعه Dong و همکاران (۲۰۱۳) سه وزن مولکولی کمتر از ۱، ۱ الی ۵ و بالاتر از ۵ کیلودالتون از پروتئین آبکافتی ماهی کپور نقره‌ای استخراج و مشخص شد وزن مولکولی بالاتر از ۵ کیلودالتون بیشترین قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH را دارد. آنها همچنین وزن‌های مختلفی را به عنوان وزن بهینه جهت شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی مختلف از قبیل مهار رادیکال ABTS و قدرت کاهندگی آهن عنوان کردند که نشان‌دهنده ویژگی‌های مختلف پپتیدها در وزن‌های مولکولی مختلف می‌باشد [۳٤].

یون آهن فرو گونه‌ی کلیدی فعال مسئول تشکیل اکسیدان‌ها در سلول‌ها می‌باشد که منجر به افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود [۳۵]. گروه‌های کربوکسیل و آمین پپتیدها در پروتئین‌های آبکافتی با کلاته‌کردن یون فلزی از جمله یون آهن فرو از اکسیداسیون لیپید جلوگیری کرده و از تشکیل اکسیدان‌ها ممانعت بعمل می‌آورند [۳٦]. قدرت کاهندگی یک ترکیب می‌تواند شاخص قابل توجهی به منظور نشان‌دادن پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن ترکیب باشد. قدرت کاهندگی آهن III (فریک) توانایی اهدای الکترون توسط پروتئین آبکافتی به عنوان یک آنتی‌اکسیدان به منظور پایداری رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد [۳٦]. بنابراین قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای پروتئین آبکافتی از طریق تبدیل آهن III به آهن II قابل بررسی است [۳۸]. ویژگی‌های پپتیدهای حاصل از آبکافت به دلیل شرایط آبکافت و نوع آنزیم به کار رفته متغیر هستند. همچنین فعالیت ضداکسیدانی پروتئین آبکافتی وابسته به چندین عامل از جمله نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، حلالیت پروتئین‌ها، پپتیدها و حضور اسید آمینه‌های آزاد است [۳۹]. بنابراین، ممکن است فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی در تحقیقات مختلف مشاهده گردد. افزایش میزان آبکافت همیشه به افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی منجر نخواهد شد و علت کاهش ظرفیت کاهندگی فریک با کاهش وزن مولکولی در مطالعه‌ی حاضر احتمالا به مقدار بیش از حد اسید آمینه آزاد مرتبط می‌باشد. زیرا پپتیدها اثربخشی بیشتری نسبت به اسید آمینه آزاد دارند و با افزایش تبدیل پپتیدها طی فرآیند آبکافت به اسید آمینه آزاد این اثربخشی کاهش می‌یابد. خصوصیات پپتیدهای جداشده از پروتئین آبکافتی مانند توالی و ترکیب آن‌ها در آبکافت‌های مختلف متغیر بوده و ممکن است خاصیت کلاته‌کنندگی یون فلزی از طریق هیدروژن یا دادن الکترون را نداشته باشد. به عنوان مثال اسید آمینه‌های آبگریز از جمله هیستیدین، پرولین، متیونین، سیستئین، تیروزین و فنیل‌آلانین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها را بهبود می‌بخشند

[۲۰، ۲۵، ۲۷ و ٤۰]. از دلایل دیگر کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی، کوچک‌شدن بیش از اندازه پپتیدها می‌باشد که در این تحقیق به آن اشاره شد اما به طور کلی تحقیق حاضر با نتایج پژوهش Bakhshan و همکاران (۲۰۱٤) مغایرت داشت [٤۱]. Nahvi و همکاران (۲۰۱۷) به طور مشابه با تحقیق حاضر نشان دادند با افزایش میزان غلظت پروتئین آبکافتی، قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در شرایط یکسان آبکافت افزایش می‌یابد [٤۲]. همچنین Dey و Dora (۲۰۱۱) ضایعات میگو را آبکافت کردند و نشان دادند ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در پروتئین آبکافتی حاصل، در غلظت‌های بالاتر قدرت کاهندگی بیشتری از خود نشان می‌دهند [۱٤]. نتایج مطالعه Suetsuna (۲۰۰۰) که طی آن عضله میگو با استفاده از پروتئاز آبکافت شد نیز با نتایج این مطالعات همسو و تاییدی بر این موضوع بود [٤۳]. پروتئین آبکافتی شامل مجموعه‌ای از پپتیدها و یا پروتئین‌هاست و با اهداء هیدروژن و واکنش با رادیکال‌ها آن‌ها را به محصولات پایدار تبدیل می‌کند. در نتیجه واکنش زنجیره‌ای رادیکال متوقف می‌گردد [٤٤]. در قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در تحقیق حاضر در تمامی غلظت‌ها بین وزن‌های مختلف مولکولی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد و با افزایش وزن مولکولی، این شاخص به طور معنی‌داری افزایش یافت. وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون در شاخص قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی مناسب‌تر بود. Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) عنوان کردند اندازه پپتیدهای پروتئین آبکافتی ساردین قدرت کاهندگی را تحت تاثیر قرار می‌دهند [۳۸]. در تحقیق Li و همکاران (۲۰۰۸) مشخص شد وزن مولکولی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون بیشترین قدرت کاهندگی را دارد [۳۲]. همچنین در مطالعه Bougatef و همکاران (۲۰۰۹) بین اوزان ۳۵۰۰، ٦۵۰۰ الی ۱۲۲۰۰ و ۱۲۲۰۰ دالتون پپتیدهای حاصل از آبکافت پروتئین عضله کوسه، وزن مولکولی ۳۵۰۰ دالتون بالاترین قدرت کاهندگی آهن را نشان داد [۳۳]. Dong و همکاران (۲۰۱۳) در مقایسه پروتئین آبکافتی ماهی کپور نقره‌ای در سه دامنه‌ی وزن مولکولی کمتر از ۱، ۱ الی ۵ و بالاتر از ۵ کیلودالتون، وزن ۱ الی ۵ کیلودالتون را وزن بهینه به منظور افزایش قدرت کاهندگی آهن گزارش کردند [۳٤]. این تحقیقات این موضوع را تایید می‌کنند که وزن‌های مولکولی مختلف پپتیدها، ویژگی‌های مختلفی را ایجاد کرده که در نهایت منجر به بروز خاصیت آنتی‌اکسیدانی متفاوت می‌گردد.

شاخص مهار رادیکال آزاد ABTS به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های دهنده هیدروژن (مهار رادیکال‌های فاز آبی) و شکستن زنجیره آنتی‌اکسیدان‌ها (مهار رادیکال‌های پروکسیل چربی) مورد استفاده قرار می‌گیرد [٤۵]. با توجه به نتایج پژوهش حاضر، وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلودالتون بیشترین قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد ABTS را نشان داد و با افزایش و کاهش وزن مولکولی پپتید، در قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS، کاهش مشاهده شد. همچنین کمترین پروتئین مورد نیاز برای رسیدن به IC_{50} در همین بازه وزنی مشاهده گردید که نشان‌دهنده محدوده وزن مولکولی بهینه پروتئین آبکافتی حاصل از آبکافت ضایعات کفال توسط آنزیم آلکالاز جهت استفاده به عنوان آنتی‌اکسیدان می‌باشد. در مطالعه حاضر افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS تحت تاثیر غلظت‌های بالاتر پروتئین آبکافتی می‌تواند به این دلیل باشد که با افزایش دسترسی و در معرض قرار گرفتن گروه‌های آبدوست کربوکسیلی و آمینی پروتئین‌ها با مولکول‌های آب، میزان پیوندهای بیشتری بین پپتیدها و آب تشکیل می‌شود و در نهایت حلالیت پروتئین نیز افزایش پیدا می‌کند. این نتایج با نتایج مطالعه Nahvi و همکاران (۲۰۱۷) مطابقت داشت به طوری که در این تحقیق نیز با افزایش غلظت پروتئین آبکافت‌شده ماهی کیلکا تا ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر، درصد مهار رادیکال ABTS افزایش پیدا کرد [٤۲]. پروتئین آبکافتی با ترکیب‌شدن با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات بی‌خطر و همچنین با شکستن برخی واکنش‌ها، از سلول‌ها در مقابل اکسیداسیون محافظت می‌کند [٤٦]. در تحقیق Ramezanzadeh و همکاران (۲۰۱٦) ژلاتین پوست ماهی

قزل‌آلا با استفاده از آنزیم آلکالاز آبکافت شد و بین غلظت‌های ۱، ۲، ۵ و ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی حاصله به عنوان غلظت بهینه از لحاظ خاصیت مهارکنندگی رادیکال ABTS پیشنهاد گردید [۴۷] که با سایر تحقیقات از جمله Pires و همکاران (۲۰۱۳) [۴۸]، Godinho و همکاران (۲۰۱۳) [۴۹] و Intarasirisawat و همکاران (۲۰۱۲) [۵۰] مشابهت داشت. پپتیدهای مختلف با اندازه مولکولی و توالی‌های آمینواسیدی متفاوت، ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی نیز از خود نشان دهند [۱۳]. از طریق فرآیند الترافیلتراسیون می‌توان توالی آمینواسیدها را بر اساس وزن مولکولی جدا کرد. درجه آبکافت بالاتر نشان‌دهنده این است که پیوندهای پپتیدی بیشتری شکسته شده و پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین‌تر تولید شده است. در نهایت افزایش درجه آبکافت منجر به افزایش سر آزاد گروه‌های آبدوست کربوکسیلی و آمینی می‌شود که حلالیت بیشتر پپتیدها را بدنبال دارد. اگرچه در تحقیق حاضر با کاهش وزن مولکولی به کمتر از ۳ کیلودالتون قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS کاهش یافت. بنابراین با توجه به این نتیجه می‌توان در شرایط موجود در مطالعه حاضر اظهار داشت که کاهش وزن مولکولی پپتیدی به معنای اثربخشی مناسب‌تر نمی‌باشد و پپتیدها در محدوده وزنی به خصوصی، اثرات آنتی‌اکسیدانی مطلوب‌تری را نشان می‌دهند.

بنابراین تفاوت قدرت احیا کنندگی، شلاته کنندگی و مهارکنندگی رادیکال‌ها بین پروتئین‌های آبکافتی را می‌توان به دلیل حضور پپتیدهای خاص با توالی آمینواسیدی خاص و وزن مولکولی معین دانست. به عنوان مثال گزارش شده است که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با وزن مولکولی ۵۰۰ تا ۱۵۰۰ دالتون قوی‌تر از پپتیدها با وزن مولکولی بالاتر از وزن مولکولی ۱۵۰۰ و پپتیدهای پایین تر از ۵۰۰ دالتون می‌باشد [۳۲]. در مطالعه Chai و همکاران (۲۰۱۵) فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS در وزن‌های ۳ الی ۱۰، کمتر از ۳ و بیشتر از ۱۰ کیلودالتون در پپتیدهای حاصل از آبکافت ماهی Blue spotted stingray (*Taeniura lymma*) ارزیابی شد و نتایج نشان داد وزن مولکولی ۳ الی ۱۰ کیلودالتون قدرت بیشتری برای مهار رادیکال آزاد ABTS دارد [۵۱]. Dong و همکاران (۲۰۱۳) نیز در مقایسه فعالیت مهار ABTS بین سه وزن مولکولی کمتر از ۱، ۱ الی ۵ و بالاتر از ۵ کیلودالتون از پروتئین آبکافتی ماهی کپور نقره‌ای، وزن کمتر از ۱ کیلودالتون را وزن بهینه به منظور افزایش قدرت مهار ABTS گزارش نمودند [۳۴].

۵-نتیجه‌گیری

از آنجایی‌که دامنه وزن مولکولی و اندازه پپتیدهای حاصل از آبکافت از اهمیت بالایی برخوردار بوده و مرتبط با میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی است، در این مطالعه پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال‌ماهیان دریای خزر با استفاده از الترافیلترهای مختلف به محدوده‌های مختلف وزن مولکولی دسته‌بندی و سپسس ارزیابی شد. مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی با وزن‌های مولکولی مختلف نشان داد که وزن مولکولی ۳ الی ۱۰ کیلودالتون در مورد دو شاخص حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون در شاخص قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی مناسب‌تر بودند.همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی تمامی نمونه‌ها وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت روند افزایشی مشاهده گردید. در مجموع به نظر می‌رسد استفاده از پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر بویژه با وزن مولکولی ۳ الی ۱۰ کیلودالتون بتواند به استفاده بهینه از ضایعات این ماهیان منجر شود.

۵-منابع

[1] Bhaskar, N., and Mahendrakar, N. S. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Bioresource Technology*. 2008; 99(10), 4105-4111.

[2] Kim, J.-A. and Kim, S.-K. Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics. *Current Protein and Peptide Science*. 2013; 14(3), 177-182.

[3] Ahn, C.B., Lee, K.H. and Je, J.Y. Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. *International Journal of Food Science and Technology*. 2010; 45(3), 562-568.

[4] Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R. and Motamedzadegan, A. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) head using Alcalase and Protamex. *International Aquatic Research*. 2010; 2, 87-95.

[5] Diniz A.M. and Martin A.M. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 1997; 48, 191– 200.

[6] Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B.A. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*. 2014; 38(3), 1207-1214.

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

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

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

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

[11] Yeganeh, S. and Reyhani Poul, S. Nanoencapsulation of bioactive peptides from shrimp wastes enzymatic hydrolysis with combined coating of nanoliposome-chitosan and evaluation of antibacterial, antioxidant and antihypertensive activity of the product. *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 2022; 30(6), 83-95 [In Persian].

[12] Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*. 2003; 36(9-10), 949-957.

[13] Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*. 2011; 124(4), 1354-1362.

[14] Dey, S.S. and Dora, K.C. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste *(Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science and Technology*. 2014; 51(3), 449-457.

[15] Surai, P.F. Selenium in poultry nutrition. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *World's Poultry Science Journal*. 2002; 58(3), 333-347.

[16] Castex, M., Lemaire, P., Wabete, N. and Chim, L. Effect of probiotic *Pediococcus acidilactici* on antioxidant defences and oxidative stress of *Litopenaeus stylirostris* under *Vibrio nigripulchritudo* challenge. *Fish and Shellfish Immunology*. 2010; 28(4), 622-631.

[17] Statistical Year Book of the Fisheries Organization. 2018-2022. Deputy Director of Planning and Planning Management. Pp, 33 [In Persian].

[18] Bamshad, M., Askari Hesni, M., Teimory, A. and Madjdzadeh, S.M. Morphology of the sagittal otolith in *Liza aurata* (Risso, 1810) from coastal habitats of Caspian Sea southern basin. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2016; 4(1), pp.33-48 [In Persian].

[19] Rabiei, S.M., Yeganeh, S. and Esmaeili Kharyeki, M. Investigation of antioxidant properties of protein hydrolysate derived from Caspian Sea Mullet by-products. *Journal of Marine Scinence and Technology*. 2021; 22(4), pp. 44-56 [In Persian].

[20] Esmaeili Kharyeki, M., Rezaei, M., Khodabandeh, S. and Motamedzadegan. A.

Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna Head. *Journal of Fisheries Science and Technology*. 2018; 7(1), 57-64 [In Persian].

[21] Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N.K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry*. 2012; 130, 1036-1043.

[22] Oyaizu, M. Studies on products of browning reactions: Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese Journal of Nutrition*. 1986; 44(6), 307–315.

[23] Alemán, A., Giménez, B., Montero, P., and Gómez-Guillén, M. C. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT-Food Science and Technology*. 2011; 44(2), 407-413.

[24] Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1992; 40(6), 945-948.

[25] Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., and Kim, S.K. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2007; 42(5), 840-846.

[26] Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W.K. and Kim, S.K. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*. 2004; 219(1), 20-26.

[27] Ren J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y. and Xue, S.J. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry*. 2008; 108: 727-736.

[28] Je, J.-Y., Park, P.-J. and Kim, S.-K. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. *Food Research International*. 2005; 38, 45-50.

[29] Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J. and Parmen, A.M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *Journal of Food Science*. 2004; 69, 615–622.

[30] Karami, Z., Peighambardoust, S.H., Hesari, J. and Akbari-Adergani, B. Isolation and Identification of Antioxidant Peptides from Wheat Germ Protein by Pepsin Enzyme. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 2019; 13(4), 39-50 [In Persian].

[31] Lahart, N., O'Callaghan, Y., Aherne, S.A., O'Sullivan, D., FitzGerald, R.J. and O'Brien, N.M. Extent of hydrolysis effects on casein hydrolysate bioactivity: Evaluation using the human Jurkat T cell line. *International Dairy Journal*. 2011; 21 (10), 777-82.

[32] Li, X.-X., Han, L.-J. and Chen, L.-J., C. In vitro antioxidant activity of protein hydrolysates prepared from corn gluten meal. *Journal* of the *Science* of *Food* and *Agriculture*. 2008; 88(9), 1660-6.

[33] Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., and Nasri, M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*. 2009; 114(4), 1198–1205.

[34] Dong, S-Y., Zhao, Y.-H., Xu, D.-X., Liu, Z.-Y. and Zeng, M.-Y. Assessing the antioxidant activity of the ultrafiltration fractions from silver carp protein hydrolysate by different antioxidant methods. *Journal of Aquatic Food Product and Technology*. 2013; 22(6), 573-583.

[35] Huang, X., Dai J., Fournier J., Ali A.M., Zhang Q. and Frenkel K. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*. 2002; 32(1), 84–92.

[36] Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2003; 51(12), 3661–3667.

[37] Kumar, N.S.S, Nazeer, R.A. and Jaiganesh, R. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*. 2011; 32(7), 1496–1501.

[38] Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. and Nasri, M. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*. 2010; 118, 559–565.

[39] Galla, N.R., Pamidighantam, P.R., Akula, S. and Karakala, B. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry*. 2012; 135(3), 1479-1484.

[40] You, L., Zhao, M., Regenstein, J. M. and Ren, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*. 2010; 43, 1167–1173.

[41] Bakhshan, A.V., Alizadeh Doughikollaee, E. and Taheri, A. Investigation of antioxidative properties of protein hydrolysate obtained from waste, in the Salmon (*Salmo salar*) filleting operation. *Journal of Comparative Pathobiology.* 2014; 11(44), 1143 – 1152 [In Persian].

[42] Nahvi, Z., Hosseini, S.F. and Zandi, M. Production of hydrolyzed protein from Kilka by enzymatic hydrolysis and evaluation of its bioactive properties. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*. 2017; 5(3), 39-58 [In Persian].

[43] Suetsuna, K. Antioxidant peptides from the protease digest of prawn (*Penaeus japonicus*) muscle. *Marine Biotechnology*. 2000; 2(1), 5–10.

[44] Khantaphant, S., and Benjakul, S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B. Biochemistry and Molecular Biology*. 2008; 151 (4), 410-419.

[45] Leong, L.P. and Shui, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food Chemistry*. 2002; 76(1), 69–75.

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

[47] Ramezanzadeh, L., Hosseini, S. F. and Nikkhah, M. Enzymatic hydrolysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin gelatin and evaluation of its antioxidant properties. *Fisheries Science and Technology*. 2016; 5(2), 29-44.

[48] Pires, C., Clemente, T., and Batista, I. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2013; 93(4), 771-780.

[49] Godinho, I.S.M. Production of fish protein hydrolysates by a marine proteolytic strain, Lisboa: ISA, 87 p. 2013.

[50] Intarasirisawat, R., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Wu, J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonous pelamis*) roe. *Food Chemistry*. 2012; 135(4), 3039-3048.

[51] Chai, T.T., Tong, S.R., Law, Y.C., Ismail, N.I.N. and Wong, F.C. Anti-oxidative, metal chelating and radical scavenging effects of protein hydrolysates from blue-spotted

[52] stingray. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2015; 14(8), 1349–1355.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Investigating the antioxidant properties of hydrolyzed protein with different molecular weights obtained from Caspian Sea mullet wastes

Seyed Mahmoud Rabiei[1], Sakineh Yeganeh[2*], Mina Esmaeili Kharyeki[3]

1- M.Sc. graduated, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

2- Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

3- Assistant Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2024/12/3

Accepted:2025/1/18

Keywords:

Free radical scavenging,

Waste,

Mullet Fish,

Molecular weight,

Ultrafilter

DOI: 10.22034/FSCT.22.162.29.

*Corresponding Author E-

skyeganeh@gmail.com;
s.yeganeh@sanru.ac.ir

ABSTRACT

Aquatic wastes management through the production of value-added products is very important. Among these products with many properties (including foaming, emulsifying, antioxidant, antibacterial, etc.), hydrolyzed proteins can be mentioned. Various factors, including molecular weight and concentration of hydrolyzed proteins, can affect the mentioned properties. Therefore, in the present study, the antioxidant properties of hydrolyzed protein obtained from Caspian Sea mullet wastes were investigated in different ranges of molecular weight and different concentrations. For this purpose, fish waste was first hydrolyzed with alcalase (1% concentration) at 55°C and pH = 8 for 120 minutes (Optimum conditions based on pre-test). Then, the hydrolyzed protein solution was divided into molecular weights of less than 3, between 3 and 10 kDa, and more than 10 kDa with 3 and 10 kDa ultrafilters. In order to evaluate the effect of molecular weight and concentration on the antioxidant activity of hydrolyzed protein, the indices of DPPH and ABTS free radicals scavenging power and ferric ion reducing power were used. Evaluation of DPPH and ABTS radicals scavenging activities showed that there is a significant difference between different molecular weights, and the highest and lowest values were recorded in molecular weights of 3-10 and less than 3 kDa, respectively (p<0.05). The lowest IC50 values for DPPH and ABTS radicals scavenging power were also obtained for sample with molecular weight between 3 and 10 kDa (p<0.05). The free radical scavenging power and the ferric ion reduction power increased with increasing concentration in all molecular weights (p<0.05). Among the different fractions, the sample with a molecular weight of more than 10 kDa showed the highest ferric ion reducing power (p<0.05). According to the results, it can be stated that hydrolyzed protein produced in this research can be used as an antioxidant compound (especially in the molecular weight of 3-10 kDa).