استخراج پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان(Oncorhynchus mykiss) با تاکید بر خواص آنتی اکسیدانی

زهرا یعقوب زاده*[1] – رضا صفری[1]

۱- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، فرح آباد، ایران ، صندوق پستی ۹۶۱

تاریخ پذیرش : ۱۳۹۸/۱۰/۷

Za_yaghoub@yahoo.com *

چکیده

آنتی اکسیدان‌های طبیعی به دلیل سلامت مصرف کننده و ایمنی مواد غذایی مورد توجه زیادی قرارگرفته است. امروزه این آنتی اکسیدان‌ها در گیاهان، میوه‌ها و پپتیدهای زیست فعال مورد جستجو قرار می‌گیرند. مطالعه حاضر به استخراج پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان(*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم های آلکالاز و فلاورزایم و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آن می‌پردازد. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آزمون های قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیا کنندگی یون آهن محاسبه شد. طبق نتایج بدست‌آمده، پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز و فلاورزایم دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و آنزیم فلاورزایم در مقایسه با آنزیم آلکالاز قادر به تولید پودر پروتئینی با درجه هیدرولیز بالاتری شد. پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز به طور معنی داری بیشتر از فلاورزایم دارای قدرت مهار رادیکال DPPH بود (p<۰/۰۵). مطالعه در مورد قدرت احیاکنندگی آهن نشان داد که قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بالاتر از آلکالاز بوده است (p<۰/۰۵). به این ترتیب پروتئین های هیدرولیز شده کمتر از KD ۳، پوست ماهی قزل آلای رنگین می تواند به عنوان یک ضد اکسیدان طبیعی در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: خواص آنتی اکسیدانی، پروتئین هیدرولیز شده، هیدرولیز آنزیمی، ماهی قزل آلای رنگین کمان

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مقدمه

آنتی اکسیدان ماده‌ای است که به طور قابل توجهی از اکسیداسیون ممانعت می‌کند و آن را به تاخیر می‌اندازد. مواد آنتی اکسیدانی موجود در غذاها نقش مهمی بعنوان فاکتورهای موثر بر سلامت ایفا می‌کنند و از بدن در برابر استرس اکسیداتیو محافظت می‌کنند. آنتی اکسیدان‌ها گروه مهمی از افزودنی‌های غذایی هستند که توانایی محافظت در برابر تغییرات زیان‌آور اکسیداسیون مواد مغذی را داشته و در نتیجه باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌گردند (بشارتی، ۱۳۹۶). سیستم آنتی اکسیدان‌های انسانی شامل دو گروه بزرگ ، آنتی اکسیدان‌های آنزیمی و غیرآنزیمی می‌باشد. آنتی اکسیدان های آنزیمی به دو گروه آنزیم‌های دفاعی اولیه و ثانویه تقسیم می‌شوند. نقش آنتی اکسیدان های آنزیمی حفاظتی است و به‌طور غیرمستقیم رادیکال های آزاد را خنثی می‌کنند. آنتی اکسیدان‌های غیرآنزیمی آنتی اکسیدان های داخلی هستند، برخی از آن‌ها شامل ویتامین ها (A)، کوفاکتورهای آنزیمی (Q۱۰)، ترکیبات نیتروژن (اوریک اسید)، پپتیدها (گلوتاتیون) هستند (Gamble and Burke, 1984). پروتئین هیدرولیز شده ماهی منبع بالقوه پپتیدهای آنتی اکسیدانی است. این پپتیدها در ساختار اولیه مولکول پروتئین به صورت غیرفعال هستند اما می‌توانند بعد از هیدرولیز آنزیمی فعال گردند. طی هیدرولیز، زنجیره پپتیدی شکافته‌شده و پپتیدهای فعال آزاد می‌گردند و پراکسیداسیون چربی را در سیستم‌های غذایی متوقف می کنند (Jyothirmayi *et al*., 2012). قابلیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزشده‌های پروتئینی به تاثیرات چندگانه‌ای نسبت داده شد. برخی از این ویژگی‌ها شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل به عنوان شلاته کننده فلزات، خاموش کننده اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن می‌باشند (مهرگان نیکو و همکاران، ۱۳۹۲). Hatate و همکاران در سال ۲۰۱۵ وجود خواص آنتی اکسیدانی در پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین را نشان دادند. Shahidi و همکاران در سال ۲۰۱۵ نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی می‌تواند بعنوان آنتی اکسیدان در سیستم‌های غذایی عمل کند.

مهار رادیکال آزاد DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)، ارزیابی قدرت احیاکنندگی FRAP (Ferric reducing-antioxidant power)، بررسی به دام اندازی رادیکال نیتریک اکساید، میزان شلات کردن فلزات و روش ظرفیت آنتی اکسیدانی با روش کاتیون زدایی رادیکال ABTS (2,2′-azinobis(3- ethyl-benzthiazoline-6-sulfonic acid)، از جمله روش‌های سنجش قدرت آنتی اکسیدانی محسوب می‌شوند. به منظور جلوگیری از پراکسیداسیون چربی در محصولات غذایی، مواد غذایی و صنایع دارویی، از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) استفاده می‌گردد. با توجه به عوارض جانبی آنتی اکسیدان های مصنوعی، تحقیق بر روی آنتی اکسیدان های طبیعی ضروری است (Chalamaiah *et al*., 2012) پروتئین هیدرولیز شده ماهی، دارای ترکیبات زیست فعال بوده و به عنوان مکمل‌های غذایی برای فعالیت های مختلف متابولیکی مورد استفاده قرار می‌گیرند (Chalamaiah *et al*., 2012). تولید

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

پپتیدهای زیست فعال از آبزیان طی دهه گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است (Raghavan and Kristinsson. 2008 and 2009). در حال حاضر ۲۶ درصد از تولید تجاری آزاد ماهیان را قزل آلای رنگین کمان به خود اختصاص داده‌است. ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) یکی ازگونه‌های مهم پرورشی آب شیرین در ایران می‌باشدکه فرآوری آن منجر به تولید مقادیر فراوانی پوست خام می‌گردد(Tabarestani *et al.*, 2010). امروزه پوست به دلیل عرضه ماهی به صورت فیله توسط برخی از کارخانه‌های شیلاتی، به یکی از مشکلات صنعت فرآوری محصولات شیلاتی تبدیل شده‌است. جهت کاهش آلودگی زیست محیطی می‌توان از پوست ماهی در صنایع تبدیلی و استخراج ترکیبات زیست فعال استفاده کرد. بنابراین در تحقیق حاضر، هیدرولیز آنزیمی برای تولیدترکیبات زیست فعال از پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان به کار گرفته شده‌است . در این راستا، مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدا نی پروتئین هیدرولیز شده را با استفاده از آزمون هایDPPH و آزمون قدرت احیاکنندگی یون آهن مورد بررسی قرار داده‌است.

مواد و روش کار

در این تحقیق ابتدا ماهی قزل آلای رنگین کمان با وزن متوسط ۱۰۰۰ گرم از استخر پرورش ماهی قزل آلا در ساری تهیه گردید و به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده‌شد. سپس پوست ماهی جدا گردیده وبه قطعات کوچک برش داده شد و به عنوان ماده خام اولیه تا زمان مصرف در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. آنزیم آلکالاز و فلاورزایم از نمایندگی شرکت نووزایم (دانمارک) در ایران تهیه و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شدند. آنتی اکسیدان‌های مصنوعی BHA (butylated hydroxy anisole) و BHT (butylated hydroxyltoluene) از شرکت‌های معتبر داخلی تهیه و استفاده شدند.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده از پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان

ابتدا پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان در دمای محیط انجماد زدایی شد، سپس ۵۰ گرم از آن توزین و در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس ۱۰۰ میلی لیترآب مقطر(نسبت وزنی - حجمی ۱ به ۲) به هر ارلن مایر حاوی نمونه اضافه شد. به منظور غیر فعال سازی آنزیم‌های داخلی پوست ، برای مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (Guerard *et al.*, 2012). برای اضافه کردن آنزیم مقدار پروتئین در سوبسترای اولیه اندازه‌گیری شدند. بعد از رقیق سازی سوبسترای اولیه، آنزیم آلکالاز به میزان ۱ درصد میزان پروتئین، اضافه شد. در این مرحله، هیدرولیز به مدت ۹۰ دقیقه در pH ۸/۵ و دمای ۵۸ درجه انجام شده و پس از غیرفعال‌سازی آنزیم در حرارت ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه، سوسپانسیون را سرد کرده و پس از انتقال به ارلن دوم، آنزیم فلورزایم به مقدار ۱ درصد میزان پروتئین، اضافه شد. قبل از اضافه کردن آنزیم ، pH و دما به‌ترتیب در محدوده ۷ و ۵۰ درجه تنظیم گردید. این مرحله از هیدرولیز نیز به مدت ۹۰ دقیقه انجام شد. در مرحله آخر نیز از فرآیند حرارتی در دمای ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه جهت غیرفعال کردن آنزیم استفاده

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

شد. بعد از سرد شدن، نمونه‌ها با استفاده از سانتریفوژ با دور g× ۱۰۰۰۰در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، برای مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردیدند. سپس مایع رویی که حاوی پروتئین هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال است،جدا سازی، و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی، خشک و درکیسه زیپ دار و دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند.

جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترا فیلتراسیون با فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف(MWCO)، ۳ کیلودالتون انجام شد و ۲ بخش (MW<3KDa) و (MW>30KDa) جدا گردید. پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳KD، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت g×۷۵۰۰ سانتریفیوژ شد و پپتیدهای کمتر از ۳KD و بیشتر از ۳KD جدا شدند.

سنجش ترکیبات پوست ماهی

برای سنجش تقریبی ترکیب نمونه‌ها، از روش AOAC استفاده شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از آون ۵±۱۰۵ درجه سانتی-گراد، جهت ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه خشک در بوته چینی ریخته شده و در کوره با دمای ۵±۵۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین با روش کجلدال بدست آمد. چربی کل نیز با دستگاه سوکسله استخراج شد (AOAC, 2000).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز(DH) به کمک تری کلرو استیک اسید (TCA)۲۰ درصد (حجمی/ حجمی) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش، تعیین درصد نسبت پروتئین‌های محلول در TCA به کل پروتئین های موجود در نمونه حاصل از سانتریفیوژ پس از هیدرولیز است. بدین منظور حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شده و پس از هم زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه (g×۶۷۰۰) سانتریفیوژ شدند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با روشLowry اندازه‌گیری گردید (Lowry *et al.*, 1951). میزان درجه هیدرولیز از طریق فرمول (۱) محاسبه شد (Kristinsson and Rasco, 2000).

فرمول (۱):

$$DH = \frac{\text{TCA 10\% - soluble N in sample}}{\text{Total N in Sample}} \times 100$$

بررسی خواص آنتی اکسیدانی

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل DPPH

برای اندازه‌گیری این قدرت، ابتدا پروتئین هیدرولیز شده تا غلظت ۲ میلی گرم در میلی‌لیتر در آب حل شد. سپس ۱/۵ میلی-لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار رادیکال DPPH در اتانول۹۹/۵۰ درصد اضافه گردید. محلول حاصل با سرعت بالا هموژن شد و به

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه (کابینت) قرار داده شد و متعاقب جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر یا استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت شد. نمونه شاهد نیز به همین طریق تهیه گردید با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. سرانجام قدرت پروتئین های هیدرولیز شده برای مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول (۲) محاسبه گردید (Yen and Wu,1999).

فرمول (۲):

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل(DPPH) $= \frac{\text{نمونه جذب}}{\text{شاهد جذب}} \times ۱۰۰$

برای کنترل بهتر، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده با ضد اکسیدان‌های سنتتیک از جمله بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) و بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ ppm مقایسه شد.

قدرت احیا کنندگی یون آهن (III)

برای بررسی این خاصیت، ابتدا ۱ میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱٪ وزنی حجمی پتاسیم فری سیا نید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه گردید و بعد از این مدت با اضافه کردن ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی-لیتر 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 نشان دهنده قدرت احیا کنندگی بالاتر پروتئین‌های هیدرولیز شده است (Oyaizu, 1986). برای مقایسه بهتر، از آنتی اکسیدان‌های بوتیل هیدروکسی تولوئن(BHT) و بوتیل هیدروکسی آنیزول(BHA) در غلظت ۲۰۰ppm استفاده گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد . از نرم افزار آماری SPSS نسخه۱۸ برای آنالیز داده‌ها و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید .

نتایج و بحث

درجه هیدرولیز پروتئین پوست ماهی قزل آلا با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم در جدول (۲) نشان داده شده است. درجه هیدرولیز پروتئین با آنزیم فلاورزایم بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز می باشد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

جدول ۲- درجه هیدرولیز پروتئین پوست ماهی قزل آلا با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم

آنزیم	pH	دما (درجه سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	درجه هیدرولیز ٪
آلکالاز	۸/۵	۵۸	۹۰	۲۸/۳۸±۱/۶۴
فلاورزایم	۷	۵۰	۹۰	۴۳/۸۳±۱/۷۵

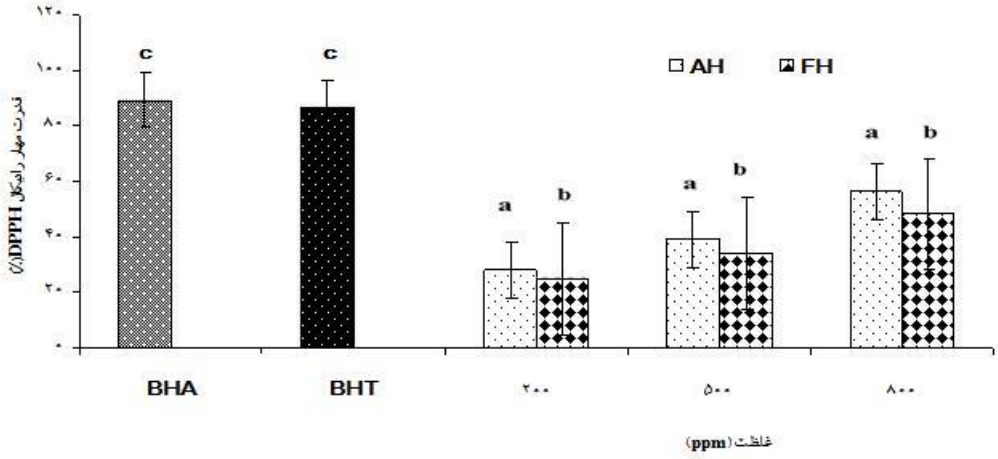
نتایج مربوط به تعیین تقریبی ترکیبات پوست خشک شده ماهی قزل آلای رنگین‌کمان در جدول ۳ نشان داده شده است. طبق نتایج، مقدار تقریبی ترکیبات ماده خام خشک از نظر فراوانی به‌ترتیب چربی، پروتئین، خاکستر و رطوبتمی‌باشد. چربی با میزان ۴۷/۳۳ ٪ بیشترین ترکیب پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان را تشکیل داد.

جدول ۳- آنالیز شیمیایی پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (بر اساس وزن خشک) و پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آن

ماده	رطوبت(%)	چربی(%)	خاکستر(%)	پروتئین (%)
پوست ماهی قزل آلا	۵/۳۷	۴۷/۳۳	۶/۱۷	۴۱/۱۲
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز	۸/۶۲	۲۰/۱۲	۵/۲۷	۷۳/۴۶
پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم	۷/۴۳	۲۴/۳۲	۶/۸۷	۶۹/۴۸

یکی از شاخص‌های مهم جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌ها، قدرت آنها برای مهار ۲و۲ دیفینیل - ۱ -پیکریل هیدرازیل(DPPH) است. طبق نمودار۱، پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ppm دارای قدرت مهار رادیکال DPPH به ترتیب به میزان ۲۸/۱±۰/۱۳، ۳۹/۴±۰/۲۹ و ۵۶/۳۸±۰/۲۵ درصد بود که در مقایسه با پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم (۲۵/۲۶±۰/۱۵، ۳۴/۲۲±۰/۰۶، ۴۸/۲۴±۰/۰۵ درصد) مقادیر بالاتری داشت ($p<0/05$). BHA و BHT با غظت ۲۰۰ ppm دارای قدرت مهار رادیکال DPPH به‌ترتیب به میزان ۹۲/۳۹±۱/۴۲ و ۸۷/۳۸±۰/۹۶ درصد را دارا بودند

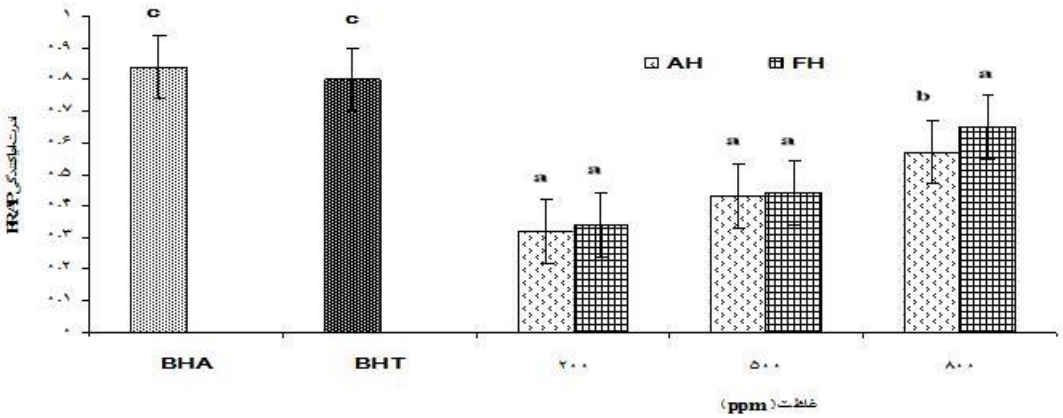
Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)



نمودار۱- قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH پوست هیدرولیز شده ماهی قزل آلای رنگین کمان

داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار است.

مطابق نمودار۲پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ppm، درصد قدرت احیا کنندگی بیشتری (۰/۳۴±۰/۰۱، ۰/۴۴±۰/۰۱، ۰/۵۷±۰/۰۲) از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز (۰/۳۲±۰/۰۱، ۰/۴۳±۰/۰۱، ۰/۶۵±۰/۰۴) نشان دادند. همچنین قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با افزایش غلظت، بیشتر گردید ($p<0/05$). قدرت کاهندگی آهن سه‌ظرفیتی برای آنتی اکسیدان‌های مصنوعی BHA و BHT با غلظت ۲۰۰ppm به ترتیب ۰/۰۹۳±۰/۰۲ و ۰/۰۸۹±۰/۰۳ درصد بدست آمد.



نمودار۲- درصد مهار کنندگی رادیکال آزاد FRAP پوست هیدرولیز شده ماهی قزل آلای رنگین کمان.

داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار است.

پروتئین های محلول ماهی، منابع غنی از پپتید های زیست فعال با پتانسیل های ارزشمند مواد غذایی و دارویی می باشند. پپتیدهای زیست فعال که بصورت غیرفعال در پروتئین اولیه وجود دارند، تحت تاثیر هیدرولیز آنزیمی فعال می‌شوند

Caspian Sea (J.A.C.S)

(Elavarasan *et al*., 2008). درجه هیدرولیز به معنای درصدی از پیوندهای پپتیدی است که توسط آنزیم تجاری طی فرآیند هیدرولیز شکسته می‌شوند .در تحقیق حاضر درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز می‌باشد. این امر را می‌توان با توجه به قدرت آنزیم‌ها تحت شرایط این آزمایش توجیه کرد.

یکی از شاخص‌های مهم جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌ها، قدرت آنها برای مهار ۲و ۲ دیفینیل - ۱ - پیکریل هیدرازیل(DPPH) است. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار و محلول در اتانول است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارد. وقتی این رادیکال با مواد الکترون دهنده مانند آنتی اکسیدان‌ها (در اینجا، پروتئین هیدرولیز شده) مواجه می شود، مهار شده و جذب آن کاهش می یابد (ریحانی پول و جعفر پور، ۱۳۹۶). پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلا (*Oncorhynchus mykiss*) فعالیت ضداکسیدانی معنی‌داری در برابر آزمون حذف رادیکال DPPH و قدرت احیا کنندگی از خود نشان داد. بنابراین پروتئین های محلول پوست ماهی قزل آلا دارای قابلیت تخلیه رادیکال آزاد و همچنین پتانسیل عمومی برای کاهش عوامل اکسید کننده با اهدای الکترون هستند. نتایج آزمون ضد اکسیدانی مهار رادیکال DPPH نشان داد که با افزایش غلظت پرونئین هیدرولیزشده درصد مهارکنندگی رادیکال ها افزایش می ابد ، به‌طوری که نمونه با غلظت ۸۰۰ ppm دارای خاصیت مهار کنندگی بیشتری نسبت به غلظتهای ۲۰۰ و ۵۰۰ ppm می‌باشد. نتایج مشابهی درمطالعات انجام گرفته بوسیله سایر محققان گزارش شد. Dong و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور نقره ای با آلکالاز در مدت ۱/۵ ساعت (زمان هیدرولیز) نشان دادند که بخش‌های پروتئینی کمتر از ۱۰۰۰ دالتون بیش از ۶۰٪ است. همچنین آن‌ها نشان دادند که فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کپور نقره به درجه هیدرولیز (DH)، زمان هیدرولیز و وزن مولکولی ارتباط دارد. بسیاری از آنتی اکسیدان هایی که به سرعت با رادیکال های پراکسیل در آزمایشگاه واکنش نشان می‌دهند، ممکن است با DPPH واکنش کند نشان دهند یا حتی بی اثر باشند.

Ramezanzadeh و همکاران (۲۰۱۶) خاصیت آنتی اکسیدانی ژلاتین پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز را مورد بررسی قراردادند. آن‌ها، بالاترین میزان مهار رادیکال های آزادDPPH و ارزیابی قدرت کاهندگی در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر را به ترتیب ۳۹/۸٪ و۰/۱۲۳ بدست آوردند. فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده وابسته به چندین عامل از جمله نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، حلالیت پروتئین ها، طبقه پپتیدها و حضور اسید آمینه‌های آزاد می‌باشد (Galla *et al*., 2012).

توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده برای کاهش یون فریک به یون فرو شاخص دیگری جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئینهای هیدرولیز شده می باشد. روش ارزیابی قدرت کاهندگی اغلب جهت بررسی توانایی یک ضداکسیدان برای اهدای الکترون انجام می‌شود. قدرت کاهندگی نشان داد که با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده، جذب نمونه‌ها افزایش یافت و بین غلظت های ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ ppm تفاوت معنی دار نشان داد ($p<0/05$)، که با نتایج تحقیق سایرین مشابهت دارد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Klompong و همکاران (۲۰۱۲)، در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم بیان کردند که هر دو پروتئین هیدرولیز شده فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان می‌دهند و پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاورزایم فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز دارا است. همچنین فعالیت‌های آنتی اکسیدانی به طور کلی با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزات افزایش می یابد. در مطالعه حاضر هم فعالیت آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت افزایش پیدا کرد. اما در این مطالعه آنزیم آلکالاز در مهار رادیکال آزاد DPPH فعال‌تر از فلاورزایم بوده‌است و در قدرت کاهندگی آنزیم فلاورزایم قوی‌تر از آنزیم آلکالاز عمل کرد. این امر احتمالاً به علت تفاوت در اندازه پروتئین یا پپتیدهای مختلف باشد. همبستگی بین فعالیت‌های زیستی اندازه‌گیری شده، درجه هیدرولیز و وزن مولکولی، هیدرولیز طولانی مدت برای بدست آوردن فعالیت زیستی بالا مشاهده شد (Slizyte *et al*., 2016). در مطالعات Elavarasan و همکاران (۲۰۱۴) نیز، قدرت کاهندگی آنزیم فلاورزایم بیشتر از آنزیم آلکالاز بوده است. این نتیجه نشان می دهد که پروتئین هیدرولیز شده از پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان می‌تواند به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی مواد تشکیل دهنده در تهیه غذاها و محصولات بهداشتی پیشنهاد شود.

توصیه ترویجی

بر اساس مطالعه حاضر اولاً پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان دارای خواص آنتی اکسیدانی بوده و می‌توان از آنها در جهت افزایش سلامت و کاهش فساد مواد غذایی استفاده نمود و ثانیاً بدلیل خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، از آن می‌توان در صنایع دارویی استفاده نمود.

منابع

بشارتی، ز.، ۱۳۹۶. افزودنیهای آنتی اکسیدانی در محصولات شیلاتی. مجله آبزیان زینتی. ۴(۲): ۱۹-۳۲.

مهرگان نیکو، ع.، صادقی ماهونک، ع.، قربانی، م.، طاهری، ع.، و اعلمی، م.، ۱۳۹۲. بهینه سازی عوامل موثر در فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*) به روش سطح پاسخ. نشریه فراوری و نگهداری مواد غذایی۵(۱) . ۱۱۰-۹۵.

ریحانی پول، س و جعفرپور، س. ع.، ۱۳۹۶ .اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولید شده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*cyprinus carpio*). مجله علوم و صنایع غذایی ، ۱۴ (۶۸): ۱۱۳-۱۲۴.

Jyothirmayi, T., Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B. and Hemalatha, R., 2012. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. Food Chemistry, 135: 3020-3038.

Gamble, P.E. and Burke, J.J., 1984. Effect of water stress on the chloroplast antioxidant system: I. Alterations in glutathione reductase activity. Plant Physiology, 76(3):.615-621.

Hatate, H., Numata, Y. and Kochi, M., 1990. Synergistic effect of sardine myofibril protein hydrolysates with antioxidants. Nippon Suisan Gakkaishi, 56: 10-11.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

AOAC, 2002. Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Food chemistry, 135(4): 3020-3038.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H., 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (Hypophthalmichthys molitrix). Food chemistry, 107(4): 1485-1493.

Ojagh, S.M., Abdollahzadeh, E., Shabanpour, B., Kordjazi, M. and Khosravi Ghaleh, R., 2017. Effectiveness of bioactive compounds produced by Lactobacillus lactis in combination with essential oils, salts and acetic acid to control Listeria monocytogenes in liquid model and minced meat of hypophthalmichthys molitrix. Aquatic Physiology and Biotechnology. 4 (4): 89-110.

Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B.A., 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (C atla catla) as Influenced by the Nature of Enzyme. Journal of Food Processing and Preservation, 38(3): 1207-1214.

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

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

Ghasemi Pirbalouti, A. and Aghaee, K., 2011. Chemical composition of essential oil of Pistacia khinjuk Stocks grown in Bakhtiari Zagross Mountains, Iran. Electronic Journal of Biology, 7: 67-69.

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A. and Montero, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review Food hydrocolloids, 25(8):.1813-1827.

Gomez-Ruiz, J. A., Lopez-Exposito, I., Pihlanto, A., Ramos, M., and Recio, I., 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. European Food Research and Technology, 227(4), pp.1061-1067.

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

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K.D. and Shahidi, F., 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. International journal of food science & technology, 43(6):1019-1026.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of biological chemistry, 193 (1): 265-275.

Oyaizu, M., 1986. Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. Japan Journal of Nutrition, 44: 307-315.

Raghavan, S. and Kristinsson, H.G., 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56(4): 1434-1441.

Raghavan, S. and Kristinsson, H.G., 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. Food chemistry, 117(4): 582-588.

Ramezanzadeh, L. and Nikkhah, M., 2016. Enzymatic hydrolysis of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) skin gelatin and evaluation of its antioxidant properties. Fisheries Science and Technology, 5(2): 29-44.(In persian)

Shahidi, F. and Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. Journal of AOAC International, 91(4):.914-931.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K. and Rustad, T., 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. Biotechnology Reports, 11:.99-109.

Tabarestani, H. S., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., and Mahoonak, A. S., 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*). Bioresource technology, 101 (15): 6207-6214.

Yen, G.C. and Wu, J.Y., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. Food Chemistry, 65(3): 375-379.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Extraction of Hydrolyzed Protein of Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) with Emphasis on Antioxidant Properties

Zahra yaghoubzadeh[*1]- Reza safari [1]

1*: Caspian Sea Ecology Research Center (CSERC), Iranian Fisheries Science Research Institute (IFSRI), Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Sari, P.O. Box 961, Iran

* za_yaghoub@yahoo.com

Abstract

Natural antioxidants have received much attention due to consumer health and food safety. These antioxidants are found in fruits, plants and bioactive peptides. This paper is going to study the extracts hydrolyzed protein of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) using alkalase and flavorzime enzymes and investigates its antioxidant properties. The antioxidant activity of the hydrolyzed protein was calculated using DPPH free radical scavenging assay and iron ion reduction assay. The results showed that the protein hydrolyzed by alkalase and flavorzime had antioxidant activity and the flavorzime enzyme was able to produce higher protein hydrolysis than the alkalase enzyme. The DPPH radical scavenging ability of the protein hydrolyzed by alkalase was significantly higher than flavorzime ($p<0.05$). The study of iron reduction power showed that the protein hydrolyzed with flavorzimm had higher reduction power than alkalase ($p <0.05$). Therefore, the hydrolyzed proteins (less than 3KD) prepared from skin Rainbow trout can be considered as a natural antioxidant.

Keywords: Antioxidant properties, Hydrolyzed protein, Enzymatic hydrolysis, Rainbow trout

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)