Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics

Online ISSN: 2345-427X
Print ISSN: 2345-4288

Comparison of antioxidant properties of hydrolyzed protein and peptide fractions prepared from whitefish eggs (*Rutilus frisii kutum*)

Younes Roshani[1] | Masoud Rezaei[*2] | Seyed Fakhreddin Hosseini[3] | Samaneh Pezeshk[4]

1. M.Sc. Student, Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor. E-mail: younesroshani@gmail.com
2. Corresponding Author, Professor, Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor. E-mail: rezamasoud@yahoo.com
3. Associate Prof., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor. E-mail: hosseinisf@modares.ac.ir
4. Ph.D., Dept. of Seafood Processing, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Noor. E-mail: samanehpezeshk62@gmail.com

Article Info

Article type:
Full Length Research Paper

Article history:
Received: 12.28.2021
Revised: 02.07.2022
Accepted: 02.20.2022

Keywords:
Antioxidants,
Egg,
Hydrolyzed protein,
Peptides,
White fish

ABSTRACT

In this Study, the egg white fish (*Rutilus frisii kutum*) hydrolyzed protein was produced. Hydrolysis was performed by alcalase enzyme in 60, 120, 180, and 240 minutes and their effects on degree of hydrolysation were evaluated. The results showed that the highest degree of hydrolysis was obtained in 240 minutes. Then, in order to separate peptides, based on their molecular weights, Millipore ultra filters (3, 10 and 30 KDa) were used. The antioxidant properties of hydrolyzed protein and peptide fractions 3, 10 and 30 KDa were measured, which can compete well with synthetic antioxidants such as BHT. Four antioxidant tests including DPPH, ABTS, Ferric reducing antioxidant power (FRAP) and Ferrous (Fe_{2+}) ion chelating ability were evaluated. In three antioxidant tests DPPH, ABTS and chelation of iron ions at a concentration of 5 mg, the highest percentage of inhibitory was observed in the treatment of hydrolyzed protein 78, 92 and 69, respectively. In the antioxidant test, fraction reduction of iron ions less than 3 kDa showed the highest absorption (1.25) at a concentration of 4 mg.

Cite this article: Roshani, Younes, Rezaei, Masoud, Hosseini, Seyed Fakhreddin, Pezeshk, Samaneh. 2022. Comparison of antioxidant properties of hydrolyzed protein and peptide fractions prepared from whitefish eggs (*Rutilus frisii kutum*). *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 11 (1), 69-80.

© The Author(s).
DOI: 10.22069/japu.2022.19793.1625
Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان

شاپا آنلاین: ۲۳٤٥-٤۲۷X
شاپا چاپی: ۲۳٤٥-٤۲۸۸

مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های پپتیدی تهیه شده از تخمک ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*)

یونس روشنی[۱] | مسعود رضائی*[۲] | سید فخرالدین حسینی[۳] | سمانه پزشک[٤]

۱. دانشجوی کارشناسی‌ارشد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور. رایانامه: younesroshani@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور. رایانامه: rezamasoud@yahoo.com
۳. دانشیار گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور. رایانامه: hosseinisf@modares.ac.ir
٤. دکتری گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور. رایانامه: samanehpezeshk62@gmail.com

اطلاعات مقاله

نوع مقاله:
مقاله کامل علمی- پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱٤۰۰/۱۰/۰۷
تاریخ ویرایش: ۱٤۰۰/۱۱/۱۸
تاریخ پذیرش: ۱٤۰۰/۱۲/۰۱

واژه‌های کلیدی:
آنتی‌اکسیدان،
پپتید،
پروتئین هیدولیز شده،
تخمک،
ماهی سفید

چکیده

در پژوهش حاضر از تخمک ماهی سفید پروتئین هیدرولیز شده تهیه شد. هیدرولیز با آنزیم آلکالاز و در زمان‌های ٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ دقیقه انجام شد و اثر آن بر درجه هیدرولیز بررسی گردید. نتایج نشان داد که بالاترین درجه هیدرولیز در ۲٤۰ دقیقه به‌دست آمد. در ادامه جهت جداسازی پپتیدها بر اساس وزن مولکولی، از الترافیلترهای ۳، ۱۰ و ۳۰ کیلودالتون استفاده گردید. سپس خواص آنتی‌اکسیدان پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های پپتیدی کم‌تر از ۳، ۳-۱۰ و بیش‌تر از ۳۰ کیلودالتون اندازه‌گیری شد که دارای توان رقابتی خوبی با آنتی‌اکسیدان‌های صنعتی مثل BHT بود. چهار تست آنتی‌اکسیدانی DPPH، ABTS، شلاته کردن یون آهن و احیای آهن مورد بررسی قرار گرفت. در سه تست آنتی‌اکسیدانی DPPH، ABTS و شلاته کردن یون آهن در غلظت ۵ میلی‌گرم بیش‌ترین درصد مهارکنندگی در تیمار پروتئین هیدرولیز شده به ترتیب ۷۸، ۹۲ و ٦۹ مشاهده شد. در تست آنتی‌اکسیدان احیای یون آهن فرکشن کم‌تر از ۳ کیلودالتون بیش‌ترین جذب (۱/۲۵) را در غلظت ٤ میلی‌گرم نشان داد.

استناد: روشنی، یونس، رضائی، مسعود، حسینی، سید فخرالدین، پزشک، سمانه (۱۴۰۱). مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های پپتیدی تهیه شده از تخمک ماهی سفید (*Rutilus frisii kutum*). *نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، ۱۱ (۱)، ۸۰-٦۹.

DOI: 10.22069/japu.2022.19793.1625

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

© نویسندگان.

مقدمه

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در مواد غذایی نقش مهمی در ارتقاء سلامت افراد داشته و بدن را در مقابل استرس‌های اکسیداتیو محافظت می‌نمایند (کالامایه و همکاران، ۲۰۱۲). ترکیبات آنتی‌اکسیدانی با منشأ دریایی خواص آنتی‌اکسیدانی مطلوبی را در شرایط آزمایشگاه از خود نشان داده‌اند (همالاتا و همکاران، ۲۰۱۲). در سال‌های اخیر پپتیدهای زیست‌فعالی که از ماهی به‌دست آمده است توجه فزاینده‌ای را به خود اختصاص داده‌اند. به طورکلی پپتیدهای زیست‌فعال در توالی اصلی خود غیرفعال هستند و هنگامی‌که توسط فعالیت آنزیمی شکسته می‌شوند، فعالیت‌های زیستی متنوعی از جمله خواص ضد فشار خون، آنتی‌اکسیدان، ضد التهاب و ضد سرطان را از خود نشان می‌دهند (هالیم و همکاران، ۲۰۱۶). اولین پژوهش علمی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی، توسط شهیدی و همکاران (۱۹۹۵) گزارش شده است. پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی جداسازی شده از پروتئین هیدرولیز شده گونه‌های مختلف ماهی، عموماً بین ۲ تا ۱۶ آمینواسید دارند (بوگاتف و همکاران، ۲۰۱۰). در واقع، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها با طول آن‌ها ارتباط مستقیم دارند. به‌طوری‌که، پپتیدهای کوچک با حدود ۲ تا ۱۰ آمینو اسید، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به پروتئین مادرشان و یا پلی‌پپتیدهای بلند زنجیره نشان می‌دهند (نیکو و همکاران، ۲۰۱۵). تولید ماهی صنعت رو به رشدی را دنبال می‌کند و پیش‌بینی می‌شود که مقدار فرآورده‌های حاصل از آن به بیش از ۱۹۶ میلیون تن درسال ۲۰۲۵ برسد (سونیا و همکاران، ۲۰۱۹). این صنعت مقادیر زیادی محصولات جنبی مانند سر، پوست، ضایعات برش ماهی، باله‌ها، امعا و احشا، استخوان‌ها، بعضی اوقات عضلات ماهی و ماهی‌هایی که استفاده نمی‌شوند یا کم‌تر مورد استفاده قرار می‌گیرند و یا به عنوان محصولاتی با ارزش افزوده کم مثل پودر ماهی و یا سیلاژ ماهی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این محصولات فرعی ممکن است ۵۰ درصد از کل ماهی را تشکیل دهند، اما بسته به گونه ماهی و استفاده موردنظر می‌توانند از ۱۰ تا ۹۰ درصد متغیر باشند (وانگ و همکاران، ۲۰۲۰). تخمک ماهی[1] محصولی بسیار با ارزش می‌باشد و در بسیاری از نقاط دنیا مصرف می‌گردد. خاویار استحصالی از ماهیان خاویاری شناخته‌شده‌ترین شکل از محصولات تولیدی از تخمک ماهیان است. بخش بزرگی از تخمک در کشورهای آسیایی مورد مصرف قرار نمی‌گیرد و به‌عنوان دورریز می‌باشند. تخم ماهی با داشتن ۱۱ درصد آلبومین، ۷۵ درصد اووگلوبولین و ۱۳ درصد کلاژن منبع خوبی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی می‌باشد (کومار و همکاران، ۲۰۱۵). تاکنون مطالعات محدودی بر روی هیدرولیز تخمک ماهیان انجام شده است (بنجاکول و همکاران، ۲۰۱۲). از این مطالعات می‌توان به پژوهش پورعاشوری و همکاران (۲۰۱۸)، (ارزیابی خواص آنتی‌اکسیدان و کاربردی تخمک ماهی قزل‌آلا رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پپسین) اشاره کرد. در همین راستا، تخمک ماهی سفید به‌عنوان نمونه تحقیقاتی، در این پژوهش، مورد بررسی قرار گرفت. بیش‌ترین صید این گونه زمانی که برای تخم‌ریزی به رودخانه مهاجرت می‌کند، انجام می‌شود. مهاجرت این ماهی به صورت آنادروموس[2] است. دوره تخم ریزی این ماهی از نیمه دوم اسفند تا اواسط اردیبهشت‌ماه ادامه دارد، در چنین شرایطی مقدار زیادی تخمک نارس در داخل کیسه تخمدان این ماهی قرار دارد که منبع مناسبی برای تولید پپتیدهای با خواص زیست‌فعال می‌باشد. در شمال کشور،

1- Fish Roe
2- Anadromous

به‌خصوص استان‌های گیلان و مازندران این فراورده را به صورت سنگین، نمک سود کرده و تحت عنوان اشبل در رستوران‌ها و... مورد مصرف مردم قرار می‌گیرد، که با توجه به مقدار بالای نمک آن، خطرناک می‌باشد. منجر به بروز بیماری‌های فشارخون، قلبی و عروقی می‌شود (شالینی و همکاران، ۲۰۲۱؛ آلپر و همکاران، ۱۹۹۹). پژوهش حاضر به دنبال راه‌کاری مناسب جهت تولید محصولی با ارزش افزوده از این فرآورده را مورد هدف قرار داد. بنابراین در این پژوهش، خواص آنتی‌اکسیدانی غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های کم‌تر از ۳، ۳-۱۰ و بیش‌تر از ۳۰ کیلودالتون مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه: تعداد ۱۲ عدد تخمدان ماهی سفید با میانگین وزنی ۳۰۰ گرم از بازار ماهی شهرستان نور خریداری شد و به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس منتقل گردید. سپس تخمدان‌ها با آب شستشو داده شد و در کیسه پلی‌اتیلنی قرار داده و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد. آنزیم آلکالاز استخراج شده از باکتری *Bacillus licheniformis* از شرکت سیگما-آلدریچ آمریکا با میزان فعالیت آنزیمی ۲/٤ واحد آنسون به‌ازای ۱ میلی‌لیتر آنزیم خریداری و مورد استفاده قرار گرفت. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده در این پژوهش نیز از شرکت‌های سیگما-آلدریچ و مرک تهیه شدند.

آنالیز تقریبی تخمک ماهی سفید: برای سنجش ترکیب تقریبی نمونه‌ها از روش (آواس و همکاران، ۲۰۰۰) استفاده شد. برای اندازه‌گیری رطوبت از آون (Memmert, Germany) (۱۰۵ درجه سانتی‌گراد) جهت ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. برای تعیین خاکستر، نمونه خشک در بوته‌چینی ریخته شده و در کوره (Nabertherm, Germany) با دمای ٦۰۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٦ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین با روش کجلدال (Foss Kjeltec 2300, Sweden) به‌دست آمد. چربی کل نیز با سوکسله (Foss Soxtec 2050, Sweden) استخراج شد.

هیدرولیز آنزیمی تخمک: تخمک ماهی سفید با دستگاه چرخ گوشت به صورت کامل چرخ شد و با نسبت ۱ به ۱ (وزنی/حجمی) در آب مقطر حل گردید و به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی تخمک به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب با دمای ۹۰ درجه قرار داده شد. سپس با آنزیم آلکالاز در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ٤ ساعت با نسبت آنزیم به سوبسترای ۱ به ۱۰۰ در انکوباتور شیکردار (Comecta, Spain) با دور ۲۰۰ rpm هیدرولیز شد. در مرحله بعد pH نمونه با اضافه کردن محلول سود ۱ نرمال به محیط واکنش برای دست‌یابی به میزان بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز (pH ۸/۵) ثابت نگه داشته شد. پس از آن، آنزیم با حرارت دادن مخلوط در ۹۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ rpm سانتریفیوژ (Universal 320 R, Germany) شد. مایع روماند جمع‌آوری و در ۲۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شد (خیمنز و همکاران، ۲۰۰۹).

سنجش درجه هیدرولیز: درجه هیدرولیز براساس روش مریت و همکاران (۱۹۹٤) با استفاده از تری‌کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین هیدرولیزشده با ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرو استیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شده و سپس با دور ٦۷۰۰ در دمای ٤ درجه به‌مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ می‌شود. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد، تعیین شد. درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درجه هیدرولیز} = \frac{\text{میزان نیتروژن در محلول ۱۰ درصد تری کلراستیک اسید} \times ۱۰۰}{\text{میزان نیتروژن در نمونه}}$$

الترافیلتراسیون: به‌منظور جداسازی محدوده‌های مختلف وزن ملکولی پروتئین هیدرولیز شده، از الترافیلترهای ۳، ۱۰ و ۳۰ کیلودالتون استفاده شد. بدین‌منظور ابتدا الترافیلترها با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر، به مدت ۵ دقیقه و با استفاده از سانتریفیوژ (۵۰۰۰ g) شستشو شدند. سپس محلول پروتئین هیدرولیز شده را ابتدا با الترافیلتر ۳۰ کیلودالتون و سپس با الترافیلتر ۱۰ کیلودالتون و در آخر با الترافیلتر ۳ کیلودالتون با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (۵۰۰۰ g)، دمای ٤ درجه سانتی‌گراد و به مدت ٤٠ دقیقه) فیلتر شد و فرکشن‌های پپتیدی حاصل شد. لازم به ذکر است که برای هر الترافیلتر ۵۰ میلی‌لیتری ۱۲ میلی‌لیتر نمونه مورد استفاده قرار گرفت. غلظت پروتئین محلول در نمونه‌های الترافیلتر شده نیز به روش لوری تعیین گردید. نمونه‌ها تا زمان استفاده برای آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

سنجش توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH: فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل به روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) با تغییرات اندک سنجش شد. بدین‌منظور ۵۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۰/۱٦ میلی‌مولار در اتانول ۹٦ درصد) با ۵۰۰ میکرولیتر نمونه، در میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری مخلوط گردید. نمونه شاهد نیز با جایگزینی نمونه با آب مقطر تهیه شد. سپس مخلوط به خوبی ورتکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه گردید. پس از گذشت مدت انکوباسیون، میزان جذب نوری نمونه‌ها در میکروپلیت ۹٦ خانه و طول موج ۵۱۷ نانومتر، توسط دستگاه خوانش جذب (Biotek, USA) قرائت شد. به‌منظور مقایسه، توانایی BHT در حذف رادیکال آزاد DPPH سنجش شد (لازم به ذکر است که غلظت‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم در هر ٤ تست آنتی‌اکسیدانی مورد آزمون قرار گرفت). ظرفیت حذف رادیکال DPPH با رابطه زیر محاسبه گردید:

Free radical scavenging (%) =
(A blank – A sample) × 100/ Ablank

سنجش توانایی مهار رادیکال آزاد ABTS: به‌منظور سنجش توانایی مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش آلیمان و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/٤۵ میلی‌مولار در ظرف شیشه‌ای تیره رنگ تهیه شده و به‌مدت ۱٦ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگهداری شد. پس از طی زمان مورد نظر، رقیق‌سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب ۰/۰۲ ± ۰/۷ در طول موج ۷۳٤ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر از محلول رقیق‌سازی شده ABTS مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر، میزان جذب نمونه‌ها در ۷۳٤ نانومتر خوانده شد. به‌منظور مقایسه، فعالیت BHT به روش مشابه سنجش شد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با رابطه زیر محاسبه گردید:

Free radical scavenging (%) =
(A blank – A sample) × 100/ Ablank

شلاته کردن یون فروس کلراید $FeCL_2$: به‌منظور بررسی فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن، از روش کلامپانگ و همکاران (۲۰۰۷) با کمی تغییرات استفاده شد. ۲۵۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده با ۹۲۵ میکرولیتر آب مقطر مخلوط شد. سپس ۲۵ میکرولیتر فروس کلراید ($FeCL_2$) با غلظت ۲ میلی‌مولار و۵۰ میکرولیتر فروزین (Ferrozine) با غلظت ۵ میلی‌مولار به نمونه‌ها اضافه شد و به مدت ۲۰ دقیقه در محیط تاریک و دمای محیط انکوبه

شدند. سپس جذب نمونه‌ها در ٥٦٢ نانومتر با استفاده از دستگاه خوانش جذب قرائت شد. در نمونه کنترل به جای نمونه از آب مقطر اضافه شد. EDTA در غلظت ۲ میلی‌مولار نیز به عنوان کنترل مثبت انتخاب شد.

ارزیابی قدرت کاهندگی: بر اساس روش اویایزو و همکاران (۱۹۸٦) مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده با ۵۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات (۰/۲ مولار، pH ٦/٦) و ۵۰۰ میکرولیتر میلی‌لیتر فری‌سیانید پتاسیم ۱ درصد در میکروتیوپ ۲ میلی‌لیتری مخلوط شد. سپس محلول تهیه شده به‌مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۵۰ درجه انکوبه گردید. در مرحله بعد ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به نمونه‌ها اضافه شده و در دمای اتاق ۱۰ دقیقه با دور g ٤۰۰۰ سانتریفیوژ شدند. پس از آن ۵۰۰ میکرولیتر از فاز بالایی مخلوط با ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر کلرید فریک آبدار ۰/۱ درصد به خوبی مخلوط شده و به‌مدت ۱۰ دقیقه در دمای محیط و فضای تاریک و سپس جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد.

روش تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری نتایج با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۷ و رسم نمودارها با برنامه Excel 2013 انجام شد. تمامی داده‌ها به‌صورت میانگین ± SD[1] گزارش شده‌اند و ارزیابی‌ها در سه تکرار صورت گرفت. نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلک مورد بررسی قرار گرفت. نتایج با استفاده از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه تجزیه و تحلیل شدند و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری Duncan در سطح احتمال پنج درصد استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین ترکیبات تقریبی: نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی تخمک ماهی سفید در جدول ۱، نشان داده شده است. داده‌ها بر اساس وزن خشک نمونه تعیین شد.

جدول ۱- ترکیبات تقریبی تخمک ماهی سفید.

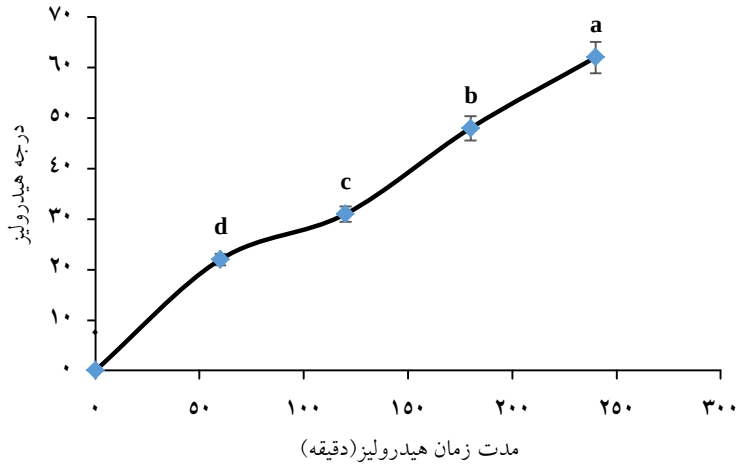
ماده	رطوبت (درصد)	پروتئین (درصد)	چربی (درصد)	خاکستر (درصد)
تخمک	٦۳/۵۸	۲۷/۰٦	٦/۰۸	۰/۰٤

آنالیز تقریبی تخمک ماهی سفید (جدول ۱) نشان داد که این ماده اولیه دارای درصد بالایی پروتئین است (۲۷ درصد) و می‌تواند به عنوان یک منبع پروتئینی ارزشمند به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد استفاده قرار گیرد. بر اساس نتایج پورعاشوری و همکاران (۲۰۱۵)، نتایج حاصل از تعیین ترکیب تقریبی تخمک ماهی سفید دارای میزان رطوبت ٦۱/۰۷ درصد، پروتئین ۲۸/۸۱ درصد، چربی ٦/۸٤ و خاکستر ۱/۳ گزارش شد. که به نتایجی که در این پژوهش به‌دست آمد، تقریباً مشابه است.

درجه هیدرولیز: روند تغییرات درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده تخمک ماهی سفید در زمان‌های مختلف هیدرولیز (٦۰، ۱۲۰، ۱۸۰ و ۲٤۰ دقیقه) مورد سنجش قرار گرفت و نتایج حاصل از آن در شکل ۱، نشان داده شده است. درجه هیدرولیز با افزایش مدت زمان افزایش یافت. در پایان فرآیند درجه هیدرولیز ٦۲/۳٤ درصد حاصل شد. جهت فرکشن‌گیری و انجام تست‌های آنتی‌اکسیدانی از پروتئین هیدرولیز شده با بالاترین درجه هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت. در پژوهش انجام شده توسط جیوتیرمایی و همکاران (۲۰۱۰) از هیدرولیز تخمک ماهی مریگا[2] (*Cirrhinus mrigala*) درجه هیدرولیز ٦۲ درصد دست یافتند که مشابه با نتایج این پژوهش می‌باشد.

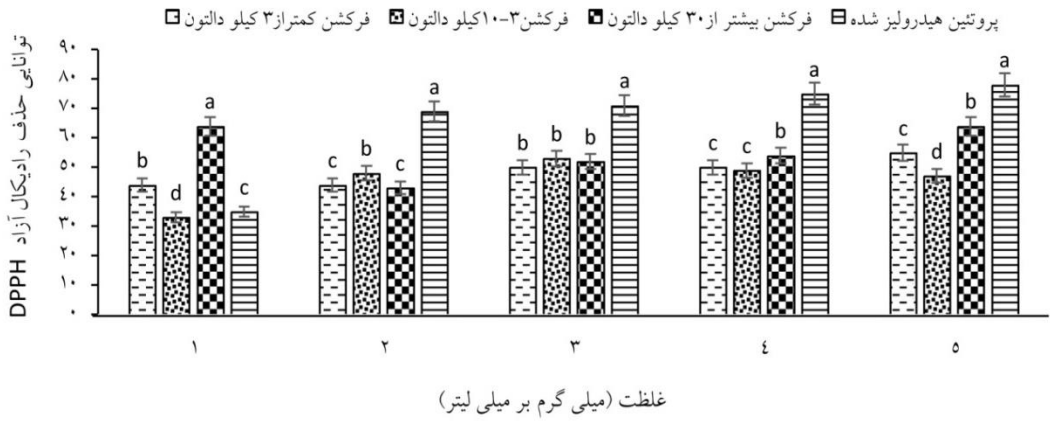
1- Standard Deviation

2- Meriga



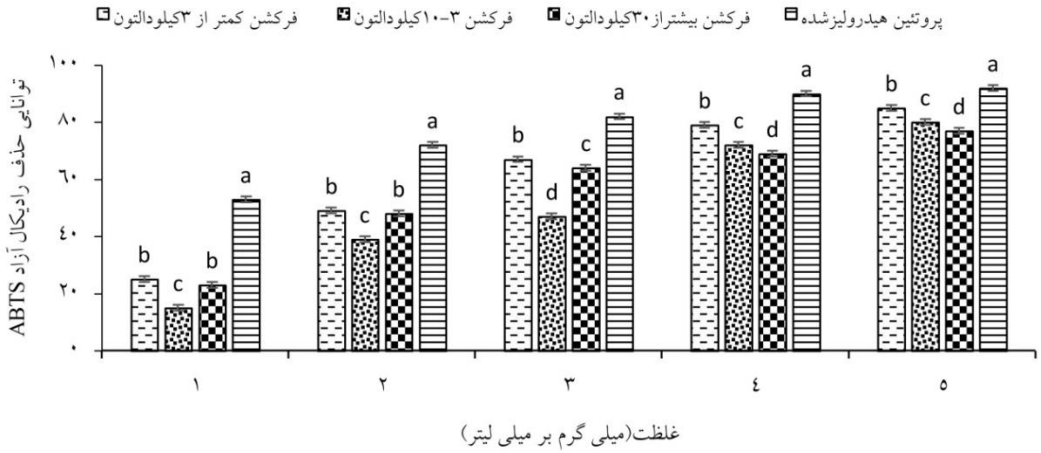
شکل ۱- روند تغییرات درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف هیدرولیز.
حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

توانایی حذف‌کنندگی رادیکال آزاد DPPH: رادیکال DPPH یک ترکیب ناپایدار است که با پذیرفتن الکترون یا هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل می‌شود (فروین و همکاران، ۲۰۱٤). نتایج (شکل ۲) نشان می‌دهد که همه نمونه‌ها عملکرد وابسته به غلظت داشته و با افزایش غلظت، توانایی حذف رادیکال آزاد DPPH به شکل معنی‌داری افزایش پیدا می‌کند ($P\leq$۰/۰۵). در غلظت ۱ میلی‌گرم فرکشن بیش‌تر از ۳۰ کیلودالتون و در غلظت‌های ۲، ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم تیمار پروتئین هیدرولیز شده توانایی بیش‌تری در حذف رادیکال آزاد DPPH از خود نشان دادند و این اختلاف معنی‌دار بود. هم‌چنین در غلظت ۱ میلی‌گرم همه تیمارها با یکدیگر اختلاف معنی‌دار از خود نشان دادند، بیش‌ترین و کم‌ترین درصد حذف رادیکال آزاد DPPH به ترتیب، مربوط به فرکشن ۱۰ و فرکشن ۳ کیلودالتون بود. این نتیجه مشابه با نتایج پژوهش جی و همکاران (۲۰۰۷) می‌باشد که فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیز شده ستون فقرات ماهی تون را در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند و بیش‌ترین توانایی حذف رادیکال DPPH (٦۵ درصد) را در غلظت ۱/٦ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نمودند. هم‌چنین از هیدرولیز تخمک ماهی مریگا با استفاده از دو آنزیم پپسین و ترپسین در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم به ترتیب درصد مهارکنندگی ۸۷ و ۷۰ به‌دست آمد (کالامایه و همکاران، ۲۰۱۳)، که به نتایج پژوهش حاضر نزدیک می‌باشد. به منظور مقایسه نیز از آنتی‌آکسیدان صنعتی BHT در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم به عنوان نمونه کنترل مثبت انتخاب شد که درصد مهارکنندگی ۰/۷۵ را از خود نشان داد. براساس نتایج شکل ۲ پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقریباً به هم نزدیک هستند و در غلظت‌های بیش‌تر توانایی رقابت با این آنتی‌کسیدان صنعتی را دارد.



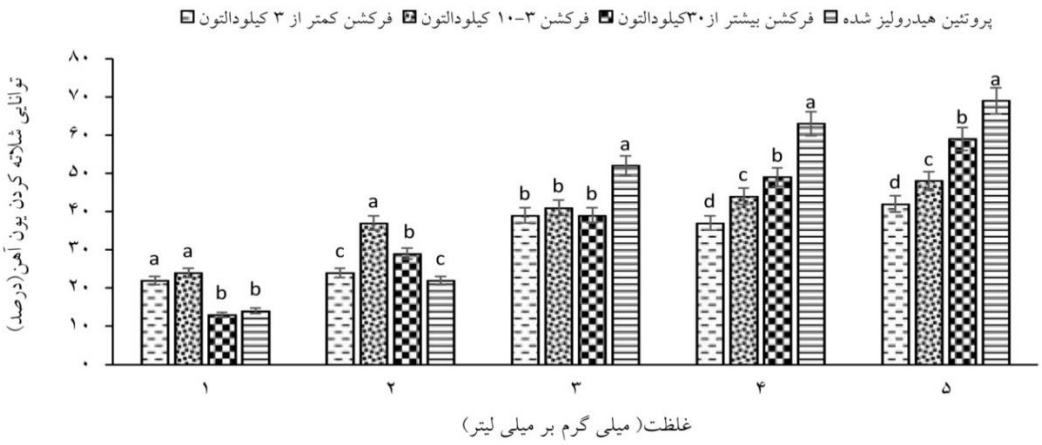
شکل ۲- اثر تغییر غلظت بر توانایی پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های حاصل از الترافیلترها در حذف رادیکال DPPH (میانگین ± SD). حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

توانایی حذف‌کنندگی رادیکال آزاد ABTS: رادیکال آزاد ABTS رادیکالی نسبتا پایدار است و به‌آسانی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها مهار می‌شود (نالینانون و همکاران، ۲۰۱۱). آزمون مهار رادیکال آزاد ABTS روشی مناسب برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات اهداکننده هیدروژن، مهارکننده رادیکال‌های فاز آبی و آنتی‌اکسیدان‌های شکننده زنجیره هستند (نالینانون و همکاران، ۲۰۱۱). باتوجه به نتایج شکل ۳، پروتئین هیدرولیز شده و هم‌چنین فرکشن‌های پپتیدی توانایی بسیارخوبی در مهار این رادیکال دارند و افزایش غلظت منجر به افزایش درصد بازدارندگی گردید به گونه‌ای که، بالاترین میزان فعالیت در غلظت ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر (۹۲ درصد) مشاهده شد. در بین ۳ فرکشن پپتیدی، فرکشن ۳ کیلودالتون بیش‌ترین قابلیت مهارکنندگی در مقابل رادیکال آزاد را از خود نشان داد. که مشابه نتایج حاصل از، هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی مرکب می‌باشد، در این مطالعه فرکشن پپتیدی کم‌تر از ۳ کیلو دالتون نسبت به فرکشن پپتیدی ۱۰ کیلو دالتون توانایی مهارکنندگی مهارکنندگی مؤثرتری را در برابر رادیکال آزاد ABTS از خود نشان داد (هو و همکاران، ۲۰۱۵). هم‌چنین در مطالعه اسماعیلی و همکاران (۲۰۱۶) با کاهش وزن مولکولی فرکشن کم‌تر از ۳ کیلو دالتون بیش‌ترین درصد مهارکنندگی را به خود اختصاص داد، که با نتایج پژوهش حاضر، مشابه می‌باشد. به منظور مقایسه، از آنتی‌اکسیدان صنعتی BHT در غلظت ۰/۲ میلی‌گرم به عنوان نمونه کنترل مثبت انتخاب شد که درصد مهارکنندگی ۰/۶۵ را از خود نشان داد با توجه به نتایج پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۲ میلی‌گرم و فرکشن‌های پپتیدی در غلظت ۳ میلی‌گرم توان رقابت تقریباً برابری نسبت به آنتی‌اکسیدان صنعتی BHT دارند.



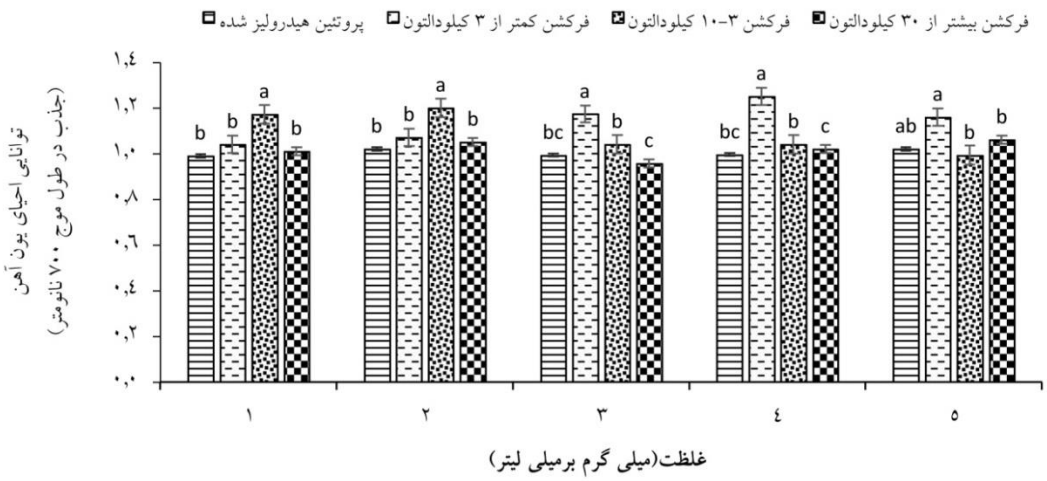
شکل ۳- اثر تغییر غلظت بر توانایی پروتئین هیدرولیزشده و فرکشن‌های پپتیدی حاصل از الترافیلترها در حذف رادیکال آزاد ABTS (میانگین ± SD). حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

شلاته کردن یون فروس کلراید $Fe\ CL_2$: با توجه به شکل ٤، در تمامی تیمارها با افزایش غلظت توانایی شلاته کردن یون آهن نیز بیش‌تر شد. بیش‌ترین توانایی شلاته کردن در بین تیمارها مربوط به تیمار پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۵ میلی‌گرم (٦٩ درصد) مشاهده شد. در بین فرکشن‌های پپتیدی، فرکشن ۱۰ کیلودالتون بیش‌ترین توانایی شلاته‌کنندگی (۵۹ درصد) را از خود نشان داد. در غلظت ٤ و ۵ میلی‌گرم همه تیمارها با هم اختلاف معنی‌دار نشان دادند به طوری که بیش‌ترین فعالیت شلاته‌کنندگی به‌ترتیب مربوط به پروتئین هیدرولیز شده> فرکشن بیش‌تر از ۳۰ کیلودالتون > فرکشن ۳-۱۰کیلودالتون> و فرکشن کم‌تر ۳ کیلودالتون بود. به منظور مقایسه نیز از EDTA از غلظت ۱ میلی‌مول بر میلی‌لیتر استفاده شد که مهارکنندگی ٤٧ درصد را از خود نشان داد. پروتئین هیدرولیز شده در غلظت ۳ میلی‌گرم شلاته‌کنندگی بالاتری از EDTA نشان داد و فرکشن‌های پپتیدی در غلظت ۳ میلی‌گرم توانایی شلاته‌کنندگی تقریباً برابری نسبت به EDTA داشتند.



شکل ٤- اثر تغییر غلظت بر توانایی پروتئین هیدرولیزشده و فرکشن‌های پپتیدی حاصل از الترافیلترها در شلاته کردن یون آهن (میانگین ± SD). حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

ارزیابی قدرت کاهندگی: روش سنجش قدرت احیای آهن اغلب برای ارزیابی توانایی یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی در دادن الکترون یا هیدروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش توانایی پروتئین هیدرولیز شده و فرکشن‌های پپتیدی در احیای یون Fe^{+3} به یون Fe^{+2} مورد ارزیابی قرار می‌گیرد (بوگاتف و همکاران، ۲۰۱۰). در صورتی که پروتئین هیدرولیز شده دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشد رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می‌گردد، هرچه رنگ سبز قوی‌تر و میزان جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر بالاتر باشد، نشان‌دهنده فعالیت کاهندگی بالاتر است (طاهری و همکاران، ۲۰۱٤). با توجه به شکل ۵، همه نمونه‌ها جذب بسیار بالایی از خود نشان دادند که احتمالاً به‌دلیل توانایی بالای آنزیم آلکالاز و درجه هیدرولیز عالی ٦۲ درصد نمونه می‌باشد. درجه هیدرولیز و آنزیم، نقش حیاتی در تعیین قدرت احیای آهن پروتئین هیدرولیز شده را دارند (کلامپانگ و همکاران، ۲۰۰۷). در غلظت ۱ و ۲ میلی‌گرم فرکشن ۳-۱۰ کیلودالتون نسبت به بقیه تیمارها جذب بالاتری از خود نشان دادند. اما در غلظت‌های ۳، ٤ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر فرکشن کم‌تر از ۳ کیلودالتون بالاترین جذب را به صورت اختلاف معنی‌دار نشان داد. بقیه تیمارها علی‌رغم جذب بالا از الگوی منظمی پیروی نکردند و در بیش‌تر غلظت‌ها اختلاف معنی‌دار نشان ندادند. با افزایش غلظت تأثیر قابل‌توجهی در تیمارها مشاهده نشد، احتمالاً نهایت اثرگذاری را در غلظت ۱ میلی‌گرم دارد و هر چقدر غلظت افزایش می‌یابد تأثیری در افزایش جذب نمونه ندارد. در مطالعه انجام شده بر روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین (*Sardina pilchardus*)، فعالیت کاهندگی در غلظت پروتئین ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیش از ۰/۸ گزارش شده است (گارسیا و همکاران، ۲۰۱٤). که در غلظت بسیار بیش‌تر جذب کم‌تری را نسبت به این پژوهش نشان می‌دهد.



شکل ۵- اثر تغییر غلظت بر توانایی پروتئین هیدرولیزشده و فرکشن‌های پپتیدی حاصل از الترافیلترها در احیای یون آهن (میانگین ± SD). حروف انگلیسی متفاوت نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار می‌باشند.

نتیجه‌گیری کلی

نتایج آنالیز تخمک ماهی سفید نشان داد که این محصول منبع غنی از پروتئین (۲۷ درصد) می‌باشد. پروتئین هیدرولیز شده در تست‌های آنتی‌اکسیدانی DPPH، ABTS و شلاته کردن یون آهن در غلظت ۵ میلی‌گرم به ترتیب درصد مهارکنندگی ۷۸، ۹۲ و ٦۹ مشاهده شد. در تست آنتی‌اکسیدان احیای یون آهن فرکشن کم‌تر از ۳ کیلودالتون بیش‌ترین جذب (۱/۲۵) را در غلظت ٤ میلی‌گرم نشان داد. در مجموع با توجه به نتایج پژوهش حاضر می‌توان بیان نمود که پروتئین هیدرولیز شده تخمک ماهی سفید منبع بالقوه‌ای از ترکیباتی با خواص آنتی‌اکسیدانی بوده و در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی و بررسی عملکرد زیست‌فعال آن در مدل‌های غذایی، حیوانی و انسانی، می‌تواند به‌عنوان افزودنی غذایی به‌منظور افزایش سطح سلامت از طریق بروز عملکرد آنتی‌اکسیدانی مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

Alemán, A., Giménez, B., Pérez-Santin, E., Gómez-Guillén, M.C., and Montero, P. 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. Food Chemistry, 125: 2. 334-341.

Alper Jr, A.B., and Calhoun, D.A. 1999. Contemporary management of refractory hypertension. Current hypertension reports, 1: 5. 402.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

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

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.

Chalamaiah, M., Rao, G.N., Rao, D.G., and Jyothirmayi, T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. Food Chemistry, 120: 3. 652-657.

Diniz, F.M., and Martin, A.M. 1997. Fish protein hydrolysates by enzymatic processing. Agro Food Industry *Hi-Tech*, 8: 3. 9-13.

Ferreira, I.C., Baptista, P., Vilas-Boas, M., and Barros, L. 2007. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food chemistry, 100: 4. 1511-1516.

Gaikwad, S.B., More, P.R., Sonawane, S.K., and Arya, S.S. 2021. Antioxidant and Anti-hypertensive Bioactive Peptides from Indian Mackerel Fish Waste. Inter. J. Peptide Res. Therapeutic. 27: 4. 2671-2684.

Gao, R., Shen, Y., Shu, W., Bai, F., Jin, W., Wang, J., et al. 2020. Optimization of enzymatic conditions of sturgeon muscles and their anti-inflammatory potential. J. Food Qual. 12: 9698134.

Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Chen, G., Fen, S., Yang, B., Yuan, M.L., Julian, D., Clements, M., and Sun, Q. 2021. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates.

García-Moreno, P.J., Morales-Medina, R., Pérez-Gálvez, R., Bandarra, N.M., Guadix, A., and Guadix, E.M. 2014. Optimisation of oil extraction from sardine (*Sardina pilchardus*) by hydraulic pressing. Inter. J. Food Sci. Technol. 49: 10. 2167-2175.

Ghelichi, S., Moltke Sørensen, A.M., García-Moreno, P.G., Hajfathalian, M., and Jacobsen, C. 2017. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions fortified with enzymatic hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe. Food Chemistry, pp. 1048-1057.

Gómez-Guillén, M.C., Pérez-Mateos, M., Gómez-Estaca, J., López-Caballero, E., Giménez, B., and Montero, P. 2009. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. Trends in Food Science and Technology, 20: 1. 3-16.

Harnedy, P.A., and FitzGerald, R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review, J. Func. Food. 4: 1. 6-24.

Hsu, K.C. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. Food Chemistry, 122: 1. 42-48.

Kim, S.K., and Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts–a review. Food Research International, 39: 4. 383-393.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food chemistry, 102: 4. 1317-1327.

Kumar, N.S., Nazeer, R.A., and Jaiganesh, R. 2012. Purification and identification of antioxidant peptides from the skin protein hydrolysate of two marine fishes, horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). Amino Acids, 42: 5. 1641-1649.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Jridi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., ... and Nasri, M. 2015. Characterization and comparative assessment of antioxidant and ACE inhibitory activities of thornback ray gelatin hydrolysates. J. Func. Food. 13: 225-238.

Najafian, L., Jafarzade, M., Said, M., and Babji, A.S. 2013. Biochemical properties and antioxidant activity of myofibrillar protein hydrolysates obtained from patin (*Pangasius sutchi*). Inter. J. Food Sci. Technol. 48: 10. 2014-2022.

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

Pourashouri, P., Yeganeh, S., and Shabanpour, B. 2015. Chemical and microbiological changes of salted Caspian Kutum (*Rutilus frisii kutum*) roe. Iran. J. Fish. Sci. 14: 1. 176-187.

Rajabzadeh, M., Pourashouri, P., Shabanpour, B., and Alishahi, A. 2018. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Inter. J. Food Sci. Technol. 53: 2. 313-319.

Samanta, J.K.M.P.K., and Khora, S. 2014. Antioxidant activity of fish protein hydrolysates from Sardinella longiceps. Inter. J. Drug Develop. Research.

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., and Nakamura, T. 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J. Agric. Food Chem. 40: 6. 945-948.