

آماده انتشار

تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی از گوشت ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) به روش آبکافت آنزیمی و بررسی پروفیل اسیدهای آمینه

الهه شریفی ترکسلویه^۱، علی طاهری^{۲*}، میرمهدی زاهدی^۳

۱. دانشجوی دکتری فراوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه:

sharifi.elah1370@gmail.com

۲. نویسنده مسئول، دانشیار فراوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه:

taheri@cmu.ac.ir taherienator@gmail.com

۳. دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه:

edm.m.zahedi@gmail.com

Doi: 10.22069/japu.2025.23137.1922

تاریخ دریافت: 1403-09-11

تاریخ ویرایش: 1403-10-23

تاریخ پذیرش: 1403-10-25

چکیده

استرس اکسیداتیو، ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، عامل اصلی بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله پیری زودرس، سرطان و اختلالات قلبی عروقی است. آنتی اکسیدان‌ها نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند و از این طریق اثرات مضر آن‌ها بر بدن را کاهش می‌دهند. در سال‌های اخیر پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از منابع پروتئینی دریایی، به دلیل خواص آنتی اکسیدانی قوی و ایمنی طبیعی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) که در اروپا عموماً برای کاهش انگل‌های شپش دریایی در کشت توام ماهی سالمون استفاده می‌شود، پس از برداشت به ضایعات تبدیل می‌شود. این تحقیق با هدف بهره‌برداری بهینه از این ماهی برای تولید پروتئین آبکافت ماهی لومپ و تولید پپتیدهای آنتی اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. گوشت ماهی لومپ تحت آبکافت آنزیمی با سه تیمار مختلف شامل آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) قرار گرفت. درجه آبکافت، خواص آنتی اکسیدانی حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTs و پروفایل اسیدهای آمینه نمونه‌ها اندازه‌گیری و مقایسه شد. پس از ۱۸۰ دقیقه مقدار نهایی درجه آبکافت در تمامی تیمارها به حدود ۴۸-۴۷٪ رسید و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد. تمامی تیمارهای آنزیمی موفق به تولید پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی قوی شدند. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تیمار ترکیبی FO+FL با اختلاف معنی‌دار بالاترین مهار رادیکال DPPH (۷۹/۸۳٪) را نشان داد، و FO (۶۸/۹۴٪) و آلکالاز (۶۷/۷۸٪) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. میزان مهار رادیکال ABTs در بالاترین غلظت (۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، تمام تیمارها فعالیت مهارکنندگی بسیار بالایی (۸۹-۹۱٪) نشان دادند و میزان IC₅₀ در سه تیمار اختلاف معناداری نداشت. تیمارهای آنزیمی منجر به بازده‌های متفاوت اسید آمینه کل شدند، به‌طوری‌که مجموع اسیدهای آمینه در تیمار آلکالاز ۶۸۰/۷۳ میلی‌گرم بر گرم بود، به دنبال آن FO با مقدار ۶۴۰/۲۲ و FO+FL با مقدار ۵۹۹/۶۶

میلی گرم بر گرم قرار گرفتند. آلکالاز به طور مداوم بالاترین غلظت‌های اسیدهای آمینه را تولید کرد، به ویژه گلوتامیک اسید (۹۵/۰۵ میلی گرم در گرم)، گلیسین (۷۶/۶۵ میلی گرم در گرم)، آسپارتیک اسید (۵۹/۴۳ میلی گرم در گرم)، و لیزین (۵۱/۴۴ میلی گرم در گرم). نتایج نشان داد که ترکیب آنزیم‌های اندوپپتیداز (با آبکافت تصادفی پیوندهای پپتیدی) و اگزوپپتیداز (با آبکافت نقاط انتهایی زنجیره پروتئینی) می‌تواند تولید پپتیدهایی با فعالیت زیستی بهینه را افزایش دهد. این پپتیدها پتانسیل جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی و دارویی را دارند و می‌توانند به کاهش ضایعات زیستی و تولید غذاداروها کمک کنند.

واژه‌های کلیدی: ماهی لومپ، آبکافت آنزیمی، خواص آنتی‌اکسیدانی، آلکالاز، Food ProPNL

مقدمه

عملکردهای فیزیولوژیکی موجودات زنده به طور اجتناب‌ناپذیر با ستر رادیکال‌های آزاد مرتبط است (۱). علاوه بر این، با افزایش سرعت زندگی در قرن معاصر، بدن انسان در معرض محرک‌های مضر متعددی قرار می‌گیرد که حاصل سبک‌های زندگی ناسالم، استرس روانی بیش از حد و تغذیه ناکافی است (۲). این محرک‌های مضر ممکن است منجر به تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد گونه‌های اکسیژن فعال یا ROS شوند که در نهایت در بدن انباشته می‌شوند. عدم تعادل رادیکال‌های آزاد در بدن باعث آغاز استرس اکسیداتیو می‌شود (۳). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و رادیکال‌های آزاد می‌تواند تعادل ظریف اکسیداسیون/احیا سلولی را مختل کرده و شرایط استرس اکسیداتیو را به وجود آورد. پیامدهای مضر این مهم شامل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، دناتوراسیون پروتئین و اسید نوکلئیک، اتصال عرضی ماکرومولکول‌ها و آسیب کلی به سلول‌ها است (۴). بسیاری از بیماری‌های مزمن انسانی، از جمله پیری، تومورها، اختلالات قلبی-عروقی و آرتریت، با حضور بیش از حد رادیکال‌های آزاد در بدن مرتبط هستند (۵). تحقیقات نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در حفظ تعادل بین اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و مکانیزم‌های دفاع اکسیداتیو بدن مؤثر باشد (۶). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند و از این طریق اثرات مضر آن‌ها بر بدن را کاهش می‌دهند (۷). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در مواد غذایی به دلیل نگرانی‌های مربوط به خطرات احتمالی برای سلامتی و همچنین هزینه‌های بالا دارای محدودیت‌های بسیاری است (۷، ۸). تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که برخی از پپتیدهای زیست‌فعال می‌توانند به طور مؤثری رادیکال‌های آزاد و پراکسیدان‌ها را در بدن مهار کنند. همچنین طبق تحقیقات صورت گرفته آنتی‌اکسیدان‌های پپتیدی به‌عنوان ترکیبات ایمن در نظر گرفته می‌شوند (۹).

پپتیدها به ترکیباتی گفته می‌شود که از دو یا چند آمینو اسید آلفا تشکیل شده‌اند که توسط پیوندهای پپتیدی به روش‌های مختلف به هم متصل شده‌اند. پپتیدهای زیست‌فعال، قطعات خاصی از پروتئین‌ها هستند که بر عملکردهای بدن اثر مثبت داشته و در فرآیندهای متابولیک نقش اساسی دارند (۱۰). در سال‌های اخیر، پپتیدهای زیست‌فعال به دلیل قدرت بالا، جذب کارآمد و به طور طبیعی ایمن بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۱). پپتیدهای کاربردی متعددی شناسایی شده‌اند که فواید قابل توجهی برای سلامتی دارند، از جمله خواص ضد فشار خون، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدانی، ضد سرطان و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی بدن (۱۲-۱۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال می‌تواند با حضور انواع آمینو اسیدها، از جمله پرولین (Pro)، گلوتامیک اسید (Glu)، تیروزین (Tyr)، فنیل‌آلنین (Phe)، آرژنین (Arg) و هیستیدین (His) بهبود یابد (۱۵).

ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus L.*) گونه‌ای نسبتاً جدید در حوزه آبی‌پروری دریایی است که پرورش آن در دهه گذشته افزایش قابل توجهی داشته و به یکی از بخش‌های به‌سرعت در حال گسترش آبی‌پروری در اروپا تبدیل شده است (۱۶).

برخلاف اکثر گونه‌های آبزی پروری، ماهی لومپ برای مصرف انسانی پرورش داده نمی‌شود، بلکه برای کاهش شپش دریایی (*Lepeophtheirus salmonis*) به کار می‌رود. شپش‌های دریایی تهدید جدی برای مزارع پرورش ماهی سالمون محسوب می‌شوند زیرا گسترش آن‌ها باعث آسیب اقتصادی قابل توجهی می‌شود. این انگل‌ها در برابر اکثر عوامل شیمیایی ضدانگلی مقاومت نشان داده‌اند که این امر علاقه به استفاده از ماهیان رفتگر به‌عنوان یک جایگزین پایدار روش‌های شیمیایی متداول را افزایش داده است. لارو ماهی لومپ معمولاً در سن شش ماهگی و با وزن اولیه حدود ۲۵ گرم به قفس‌های سالمون منتقل می‌شود (۱۷). با افزایش اندازه و رسیدن به بلوغ جنسی، کارایی آن‌ها در خوردن انگل‌ها، به ویژه شپش‌ها کاهش می‌یابد. این کاهش کارایی استفاده مجدد از ماهی لومپ به‌عنوان ماهی رفتگر یا تمیزکننده را غیرعملی می‌کند (۱۸). پس از کشتار جمعیت سالمون داخل قفس، ماهی لومپ یا به‌عنوان ضایعات دور ریخته شده یا برای تولید سیلاژ استفاده می‌شود. سیلاژ تولیدشده برای فرمولاسیون خوراک دام مناسب است اما به طور کلی، تمام منابع کاربردی باید از اصل "اول غذا" پیروی کنند، در این اصل منابع موجود باید برای بالاترین ارزش ممکن استفاده شوند (۱۹). استفاده مجدد از زیست‌توده باقی‌مانده جدا شده از اکوسیستم دریایی به‌عنوان منبعی از پروتئین‌ها، روغن‌ها و ترکیبات دیگر با ویژگی‌های تغذیه‌ای یا کاربردی می‌تواند ضایعات را کاهش داده و مزایای مهمی را برای بخش‌های صنعتی مختلف و جامعه به همراه داشته باشد (۲۰).

برای آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال، روش آبکافت آنزیمی نسبت به استخراج با حلال، تخمیر و تیمار شیمیایی پروتئین‌های غذایی ترجیح داده می‌شود، زیرا در محصولات نهایی حلال‌های آلی باقی‌مانده یا مواد شیمیایی سمی آزاد نمی‌کند (۲۱). ویژگی آنزیم به اندازه شرایط بهینه دیگر مانند زمان آبکافت، دما، نسبت آنزیم به سوبسترا و pH برای فعالیت آن در تولید پپتیدهای زیست فعال اهمیت دارد. پروتئازهای مختلف با شکستن پیوندهای پپتیدی، پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچک‌تر و اسیدهای آمینه آزاد هضم می‌کنند. این آنزیم‌ها در دما و شرایط pH بهینه خود، اغلب خاص، غیرخاص یا هر دو هستند (۲۲). این آنزیم‌ها به دو دسته اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز تقسیم می‌شوند. اندوپپتیداز با آبکافت تصادفی پیوندهای پپتیدی، مولکول پروتئین را تخریب می‌کنند، در حالی که اگزوپپتیداز پیوندهای پپتیدی را در نقاط انتهایی شکسته و اسیدهای آمینه را از سمت N یا C آزاد می‌کنند. در طی فرآیند آبکافت، اگزوپپتیدازها پروتئین را پس از هضم جزئی توسط اندوپپتیدازها به طور کامل تجزیه می‌کنند. بنابراین، پروتئازهای مختلف، انواع متفاوتی از پپتیدها را از یک زیرلایه پروتئینی یکسان تولید می‌کنند. علاوه بر این، درجه آبکافت پروتئین بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد، زیرا درجه آبکافت به شدت بر اندازه و محتوای اسیدهای آمینه پپتیدهای آزاد شده تأثیر می‌گذارد، که می‌تواند فعالیت زیستی آن‌ها را تعدیل کند (۲۱). تعدادی تحقیق در مورد استخراج کلاژن از ماهی لومپ منتشر شده است (۲۳، ۲۴). بعد از مطالعات صورت گرفته، مشخص شد پژوهش‌های محدودی وجود دارد که بر آبکافت پروتئین ماهی لومپ و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی این منبع ارزشمند تمرکز داشته باشند. بنابر مطالب عنوان شده، در این مطالعه نخست پروتئین آبکافت ماهی لومپ با استفاده از سه تیمار آنزیمی مختلف شامل آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) صورت گرفت و سپس درجه آبکافت، خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده و پروفایل اسیدهای آمینه محصولات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

¹ food first

در این مطالعه از مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی استفاده شده است. اسید استیک، سدیم هیدروکسید و اسید کلریدریک از شرکت Merck (Merck Life Sciences, Sweden) ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، ۲،۲-آزینیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTs)، ترولوکس، ۲،۴،۶-تری نیتروبنزن سولفونیک اسید (TNBs) و سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شدند. آنزیم های Food Pro PNL، آلکالاز و فلاورزایم از شرکت Nofima نروژ تأمین شدند.

فرآیند آبکافت آنزیمی

گوشت ماهی لومپ چرخ شده با بافر فسفات ۰/۱ مولار، pH ۷ با نسبت ۱:۲ ترکیب شد و دمای سوسپانسیون به ۵۵ درجه سانتی گراد افزایش یافت. سپس سه روش تیمار آنزیمی مختلف اعمال شد: سپس ترکیب های مختلف آنزیمی به این صورت اعمال گردید: در تیمار اول ابتدا آنزیم Food ProPNL (اندوپتیداز) اضافه و بعد از ۹۰ دقیقه، فلاورزایم (اگزوپتیداز) اضافه شد. در تیمار دوم Food ProPNL که یک آنزیم اندوپتیداز است اضافه گردید و در تیمار آخر آنزیم آلکالاز (ترکیبی از اندوپتیداز و اگزوپتیداز) به مخلوط اضافه شد. هرکدام به میزان ۵٪ از کل پروتئین نمونه به کار رفته اند. فرآیند آبکافت تحت هم زدن مداوم در یک انکوباتور به مدت ۳ ساعت انجام شد. پس از اتمام واکنش، با حرارت دادن مخلوط در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه آنزیم های موجود در نمونه غیرفعال شدند. سپس مخلوط حاصل با سرعت $12000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از آن، مایع رویی فیلتر و با کمک دستگاه خشک کن انجمادی خشک گردید و برای تحلیل های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شد. در طول فرآیند آبکافت، نمونه برداری برای تعیین درجه آبکافت در فواصل زمانی ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه صورت گرفت. طبق روال قبل برای غیرفعال سازی آنزیم، این نمونه ها در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و سپس با سرعت $12000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی هر نمونه جدا و برای مراحل بعد در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

اندازه گیری درجه آبکافت (DH)

درجه آبکافت نمونه ها با استفاده از روش آدلر-نيسن (۱۹۷۹) تعیین شد. به طور خلاصه، ۰/۵ میلی لیتر از هر نمونه با ۴ میلی لیتر محلول ۱ درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) مخلوط شد. از این مخلوط، ۲۵ میکرولیتر جدا و به یک لوله اضافه شد. محلول ۱ درصد SDS به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. به هر نمونه و کنترل ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات (۰/۲ مولار با pH ۸/۲) اضافه و سپس ۲۰۰ میکرولیتر محلول تازه TNBS اضافه شد. نمونه ها در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به مدت ۶۰ دقیقه در یک انکوباتور شیکردار با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. واکنش با اضافه کردن ۴۰۰ میکرولیتر محلول (۰/۱ HCl) (مولار) خاتمه یافت. پس از ۳۰ دقیقه، جذب هر نمونه در ۴۲۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis اندازه گیری شد. یک منحنی استاندارد با استفاده از غلظت های لوسین در بازه ۰/۵ تا ۷/۵ میلی مولار ایجاد و درجه آبکافت با استفاده از معادله های زیر (معادله ۱ و ۲) محاسبه شد (۲۵).

$$1) h = \frac{A_{420} - b}{m}$$

A_{420} جذب در طول موج ۴۲۰ نانومتر، b عرض از مبدأ در منحنی کالیبراسیون، m شیب منحنی کالیبراسیون

$$2) DH = \frac{h}{h_{total}} \times 100$$

h مقدار آبکافت (محاسبه شده از معادله اول)، h_{total} غلظت پروتئین کل، DH درجه آبکافت (بر حسب درصد)

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین های آبکافت با استفاده از روش اصلاح شده از روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) ارزیابی شد. در این آزمون، نمونه های آبکافت شده با غلظت های مختلف با یک محلول DPPH ۰/۱ میلی مولار تهیه شده در اتانول ۹۵٪ به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. مخلوط ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر (UV-Vis 60UV-vis، Agilent Technologies، سانتا کلارا، آمریکا) اندازه گیری شد. به جای نمونه آبکافت شده، از آب مقطر به عنوان کنترل استفاده شد. یک منحنی استاندارد با استفاده از ترولوکس در غلظت های ۰/۰۲۵ تا ۰/۵ میلی مولار ایجاد شد. مقدار جذب پایین تر به ظرفیت بالاتر مهار رادیکال آزاد اشاره دارد، که با استفاده از معادله های زیر محاسبه شد (۲۶).

$$1) DPPH = \frac{Blank\ Absorbance - Sample\ Absorbance}{Blank\ Absorbance} \times 100$$

$$2) IC50\% = \frac{50-b}{m}$$

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲'-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS)

فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS پپتیدها با پیروی از روش ارائه شده توسط اوین و همکاران (۲۰۰۵) ارزیابی شد. به طور خلاصه، محلول ABTS با حل کردن ۷ میلی مولار از ABTS در آب مقطر، همراه با ۲/۴۵ میلی مولار پتاسیم پرسولفات ($K_2S_2O_8$) تهیه شد. مخلوط واکنش در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت نگهداری شد تا کاتیون رادیکال ($ABTS^{+}$) تولید شود. محلول رادیکال حاصل با اتانول رقیق شد تا جذب آن به مقدار 0.7 ± 0.2 در طول موج ۷۳۴ نانومتر برسد. برای آزمون، ۹۵۰ میکرولیتر از محلول رادیکال ABTS با ۵۰ میکرولیتر از محلول نمونه ترکیب شد و جذب در ۷۳۴ نانومتر پس از ۶ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب پایین تر به ظرفیت بالاتر مهار رادیکال آزاد اشاره دارد، که با استفاده از معادله های زیر محاسبه شد (۲۷).

$$1) ABTS = \frac{Blank\ Absorbance - Sample\ Absorbance}{Blank\ Absorbance} \times 100$$

$$2) IC50\% = \frac{50-b}{m}$$

اندازه گیری پروفیل اسید آمینه پپتیدهای حاصل از آبکافت آنزیمی ماهی لومپ

ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین های آبکافت با روش توصیف شده توسط اوزکان و سنیوا (۲۰۰۶)، با برخی اصلاحات، تحلیل شد. نمونه های پپتید لیوفیلیزه شده (۵۰ میلی گرم) با ۸ میلی لیتر HCl (۶ نرمال) مخلوط شده و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت آبکافت اسیدی قرار گرفتند. پس از آبکافت، نمونه ها با اسید استیک ۰/۲ مولار رقیق شده و به طور خودکار به یک سیستم LC/MS HPLC، Agilent 1100 والدیرون، آلمان) تزریق شدند و در تکرارها با استانداردهای آمینواسید مقایسه شدند (۲۸).

آنالیز داده ها

تفاوت معنی‌داری داده‌ها از طریق تحلیل واریانس یک طرفه (One Way ANOVA) بر روی نتایج بررسی شد. برای مقایسه میانگین مقادیر، از آزمون چند دامنه دانکن استفاده شد. معنی‌داری داده‌ها در سطح $p < 0.05$ به دست آمد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم افزار Origin صورت گرفت.

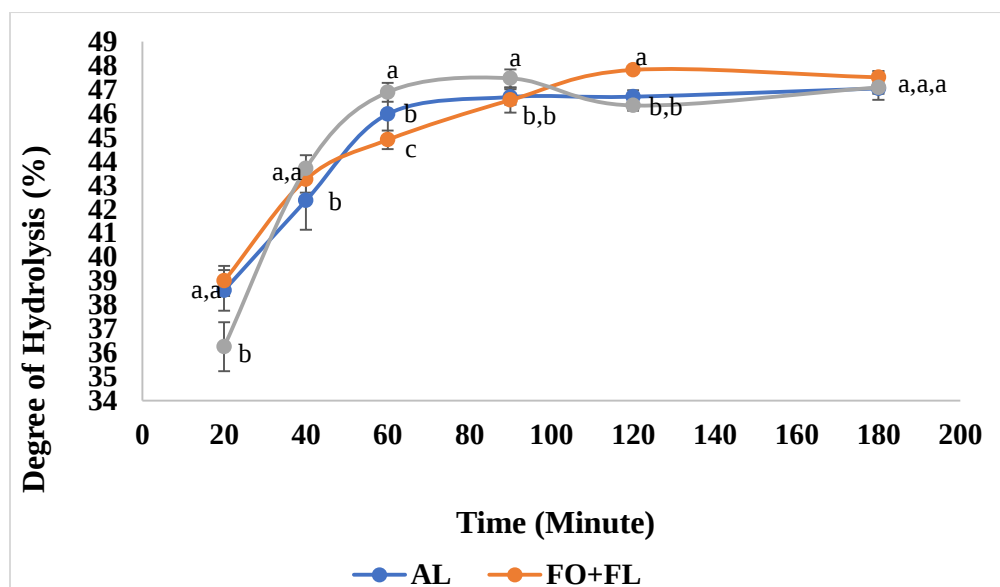
نتایج و بحث

تأثیر آنزیم‌های مختلف بر درجه آبکافت پروتئین

درجه آبکافت، که نشان‌دهنده شکستن پیوندهای پپتیدی است، در فواصل زمانی منظم ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه در طول فرآیند آبکافت اندازه‌گیری شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که تمامی تیمارها روندی مشابه را دنبال کردند، ابتدا درجه آبکافت در ۳۰ دقیقه اولیه به سرعت افزایش یافت و سپس به یک حالت ثابت رسید. این آبکافت سریع اولیه احتمالاً به دلیل دسترسی زیاد به محل‌های اتصال بستر و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها در شرایط بهینه pH و دما بوده است (۲۹). همان‌طور که آبکافت پیشرفت می‌کند، تعداد مکان‌های شکافتی قابل دسترس کاهش می‌یابد و منجر به ایجاد یک ثبات در درجه آبکافت می‌شود (۲۰، ۳۰).

آلکالاز در مراحل اولیه آبکافت، درجه آبکافت بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. این امر مورد انتظار است زیرا آلکالاز یک پروتئاز شناخته‌شده با فعالیت اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز است که به آن اجازه می‌دهد به طور مؤثر پیوندهای پپتیدی را بشکند و پپتیدها و آمینو اسیدهای کوچک‌تری آزاد کند (۳۱-۳۳). این آنزیم به کارآمدی خود در آبکافت انواع سوبسترهای پروتئینی از جمله پروتئین‌های ماهی شناخته شده است (۳۳). پس از ۱۸۰ دقیقه مقدار نهایی درجه آبکافت به حدود ۴۷/۵۱٪ رسید که با سایر مطالعات مربوط به استفاده از آلکالاز در آبکافت پروتئین ماهی قابل مقایسه است (۲۰، ۳۲). تیمار FO روندی مشابه با آلکالاز نشان داد اما در مراحل اولیه آبکافت درجه آبکافت کمتری داشت. این امر ممکن است به دلیل فعالیت اندوپپتیدازی آن باشد که اگرچه مؤثر است، اما به محل‌های اتصال خاصی در ساختار پروتئین مادری محدود می‌شود (۳۴). درجه آبکافت نهایی (۴۷/۱٪) با تیمار آلکالاز اختلاف معنی‌داری نداشت و نشان می‌دهد که فعالیت اندوپپتیدازی به تنهایی می‌تواند تحت شرایط بهینه به درجات بالای آبکافت دست یابد. همچنین نرخ کمی پایین‌تر نسبت به آلکالاز که در ابتدای آبکافت مشاهده می‌شود ممکن است به دلیل الگوی برش خاص‌تر آن باشد که می‌تواند تعداد پیوندهای مستعد موجود در مراحل ابتدایی آبکافت را محدود کند (۳۵). تیمار FO+FL منحنی درجه آبکافت مشابهی با سایر تیمارها نشان داد. با استفاده متوالی از اندوپپتیداز (FO) و اگزوپپتیداز (FL) انتظار می‌رفت آبکافت را از طریق تکمیل فعالیت‌های یکدیگر افزایش دهند (۳۶). با این حال، درجه آبکافت نهایی (۴۷/۰۵٪) تفاوت معنی‌داری با تیمارهای دیگر نداشت. این موضوع ممکن است به دلیل اشباع بستر یا همپوشانی ویژگی‌های بستر باشد که آبکافت اضافی را محدود کرد. تیمار اولیه اندوپپتیدازی ممکن است اکثر پیوندهای مستعد را شکسته باشد و بستر محدودی برای اگزوپپتیداز باقی گذاشته باشد (۳۷). در مطالعه‌ای که توسط برجس و همکاران (۲۰۲۳) صورت گرفت افزایش غلظت آنزیم آلکالاز از ۱ به ۲/۵ درصد منجر به افزایش درجه آبکافت شد اما آلکالاز مورد استفاده در مقادیر بین ۲/۵ تا ۵ درصد درجه آبکافت مشابهی را در کل فرآیند نشان داد. بعد از گذشت زمان کوتاهی، درجه آبکافت به حدود ۵۰ درصد رسید که نشان می‌دهد سرعت آبکافت در اوایل فرآیند بالا بوده و سپس به حالت ثابت می‌رسد که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۸). افزایش سریع اولیه در درجه آبکافت و سپس ثابت شدن آن با مطالعه‌های دیگر در زمینه آبکافت آنزیمی پروتئین سازگار است (۳۹). به عنوان مثال، در مطالعه‌ای روی آبکافت پروتئین ماهی کپور سر بزرگ با استفاده از آنزیم فلاورزایم روند مشابهی مشاهده شد که مقادیر درجه آبکافت در ۱، ۳ و ۶ ساعت به ترتیب برابر با ۱۶/۵۶٪، ۲۲/۲۳٪ و ۲۵/۴۸٪ بود (۴۰). این الگو افزایش سریع درجه آبکافت و سپس ثابت شدن مقادیر آن در طول زمان برای آبکافت آنزیمی پروتئین معمول است و کاهش دسترسی به سایت‌های قابل آبکافت

را در طول فرآیند نشان می دهد. مقادیر مشابه نهایی درجه آبکافت در تمام تیمارها نشان می دهد که هر سه استراتژی آنزیمی برای تولید پروتئین آبکافت ماهی لومپ مؤثر هستند. همچنین تحت شرایط مورد استفاده، فعالیت آنزیمی به یک حالت ثابت رسیده است که در آن دسترسی به بستر یا ویژگی آنزیمی دیگر به طور قابل توجهی بر واکنش تأثیر نمی گذارد. در حالی که تمامی تیمارها در آبکافت مؤثر هستند، انتخاب آنزیم می تواند بر سایر ویژگی های آبکافت مانند پروفیل اسیدآمینه پپتیدها، خواص زیست فعال و عملکردی آنها تأثیر بگذارد، زیرا آلكالاز ممکن است پپتیدهای کوتاه تری تولید کند در حالی که FO در ابتدا زنجیره های طولانی تر را حفظ کند (۴۱).



شکل ۱- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلكالاز (AL)، Food ProPNL(FO) و ترکیب استفاده از Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) بر درجه آبکافت پروتئین ماهی لومپ در فرآیند آبکافت آنزیمی.

Figure 1- The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the degree of hydrolysis of lumpfish protein in the enzymatic hydrolysis process.

فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های آبکافت ماهی لومپ

منابع دریایی به عنوان منبعی برای پپتیدهای فعال زیستی عمل می کنند که پتانسیل نشان دادن فعالیت آنتی اکسیدانی را دارند. برای تعیین خواص آنتی اکسیدانی این پپتیدها، آزمایش های مختلف اغلب شامل ارزیابی هایی است که توانایی آنها را در پاکسازی کاتیون های رادیکالی اندازه گیری می کنند. به طور خاص، رادیکال های آزاد DPPH و ABTS برای ارزیابی ظرفیت انتقال الکترون آنها استفاده شدند. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های آبکافت ماهی لومپ بر اساس توانایی آنها در مهار رادیکال DPPH ارزیابی شد که به صورت درصد مهار این رادیکال در شکل ۲ بیان شده است. غیر فعال کردن رادیکال به عنوان یک مکانیسم اساسی توسط آنتی اکسیدان ها برای جلوگیری از فرآیندهای اکسیداتیو استفاده می شود. ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)، که دارای یک الکترون جفت نشده است، مستعد جذب یون هیدروژن است و بنابراین پایداری آن در حضور غیرفعال کننده های رادیکال آزاد افزایش می یابد. نتایج مهار رادیکال DPPH سه تیمار آلكالاز، FO+FL و FO در غلظت های مختلف محصول (۱۰ میلی گرم/میلی لیتر، ۵ میلی گرم/میلی لیتر و ۲/۵ میلی گرم/میلی لیتر) سنجش شد که در شکل ۲ نیز نشان داده شده است.

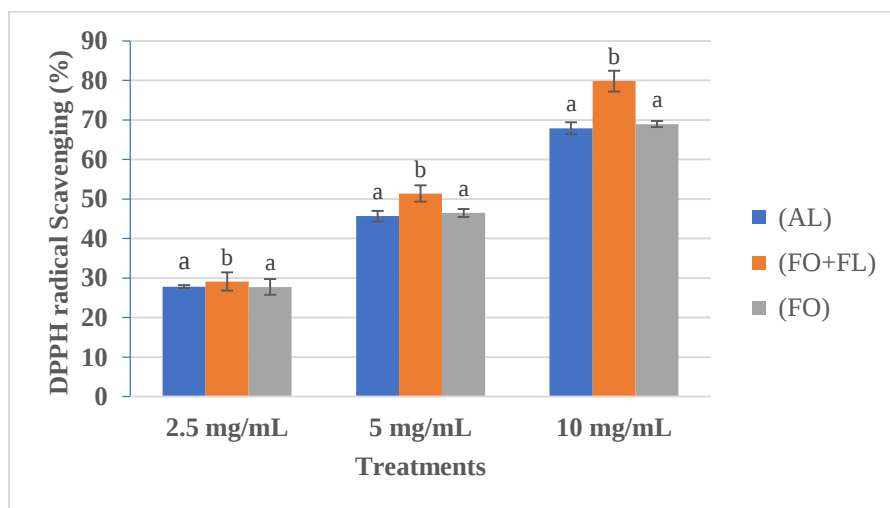
در غلظت ۱۰ میلی گرم/میلی لیتر ترکیب آنزیم FO+FL با اختلاف معنی دار بالاترین مهار رادیکال DPPH (۷۹/۸۳٪) را نشان داد، و FO (۶۸/۹۴٪) و آلكالاز (۶۷/۷۸٪) در رتبه های بعدی قرار گرفتند. در غلظت ۵ میلی گرم/میلی لیتر FO+FL دوباره فعالیت آنتی اکسیدانی برتری داشت (۵۱/۳۹٪) و FO (۴۶/۴۵٪) بهتر از آلكالاز (۴۵/۶۵٪) عمل کرد اما تفاوت آن ها معنی دار نبود.

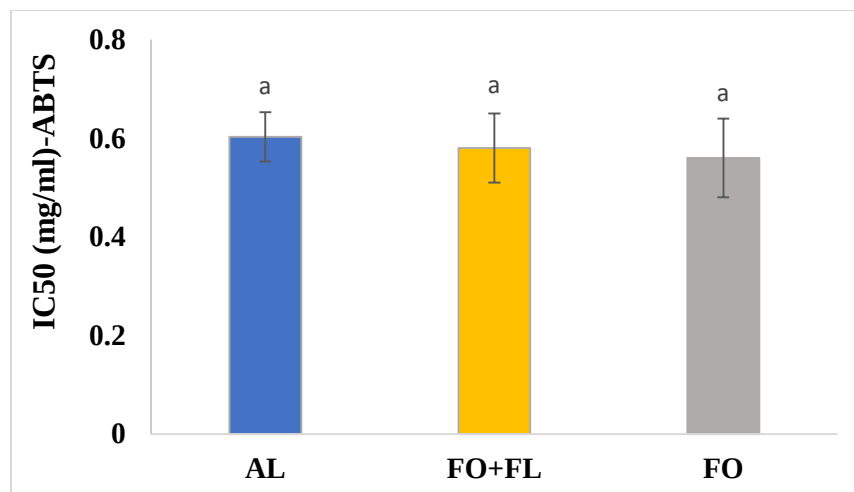
این یافته ها با مطالعات پیشین روی پروتئین های آبکافت ماهی مطابقت دارد و نقش آبکافت آنزیمی را در افزایش خواص آنتی اکسیدانی برجسته می کند. همانطور که اشاره شد تیمار FO+FL بالاترین میزان مهار DPPH رادیکال آزاد را در تمامی غلظت ها نشان داد و مقادیر آن به ۷۹/۸۳٪ در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر رسید. این عملکرد برتر احتمالاً به دلیل عملکرد مکمل FO (اندوپیتیداز) و فلاورزایم (اگزوپیتیداز) است. اندوپیتیدازها بر پیوندهای α -پپتیدی داخلی عمل می کنند که دور از انتهای N یا C زنجیره قرار دارند (۴۲). اگزوپیتیدازها اسیدهای آمینه منفرد، دی پپتیدها یا تری پپتیدها را از انتهای N یا C یک زنجیره پلی پپتیدی آزاد می کنند و آبکافت توسط اندوپیتیدازها منجر به آبکافت محدود یک پروتئین می شود (۴۲)، که در نتیجه بیشتر پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر به عنوان محصولات باقی می ماند. استفاده همزمان از اندوپیتیدازها و اگزوپیتیدازها در طول آبکافت پروتئین اثرات افزایشی ایجاد می کند (۴۳، ۴۴). بنابراین، یک رویکرد ترکیبی از اندوپیتیدازها و اگزوپیتیدازها ممکن است منجر به آزادسازی پپتیدهایی با خاصیت آنتی اکسیدانی بالا (با وزن مولکولی کوچکتر) شود (۴۵، ۴۶). آبکافت متوالی امکان آزادسازی پپتیدهای کوچکتر با ساختارهای متنوع را فراهم می کند که شامل اسیدهای آمینه معطر و باقی مانده های هیدروفوبیک هستند. این ترکیبات به طور شناخته شده ای در فعالیت مهار رادیکال ها موثر هستند.

یافته های مشابهی در مطالعاتی که استفاده از اگزوپیتیداز پس از پیش تیمار با اندوپیتیداز منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی شد، گزارش شده است (۳۳، ۳۵). برای مثال، مطالعه ای روی پروتئین های آبکافت گربه ماهی نشان داد که شرایط بهینه آنزیمی می تواند به مهار رادیکال DPPH تا ۸۶/۱٪ برسد و پتانسیل تولید آنتی اکسیدان های طبیعی قوی را نشان دهد (۴۷). همچنین، تحقیقی روی محصولات جانبی ماهی از ناوگان ماهی گیری شمال غرب اسپانیا نشان داد که تیمارهای متوالی آنزیمی آبکافت هایی با فعالیت بالای مهار رادیکال DPPH و دیگر خواص زیست فعال ایجاد کرد (۴۸). تیمار FO به تنهایی در غلظت های متوسط و پایین، فعالیت آنتی اکسیدانی کمی بالاتر از آلكالاز نشان داد، هرچند که هر دو آنزیم در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر نتایج مشابهی داشتند. این تفاوت ممکن است به دلیل ویژگی های خاص آنزیمی FO باشد که عمدتاً پیوندهای داخلی پپتیدی را شکسته و احتمالاً باقی مانده های هیدروفوبیک و اسیدهای آمینه معطر بیشتری را آشکار می کند که برای فعالیت آنتی اکسیدانی حیاتی هستند. از سوی دیگر، مشخصات گسترده شکافت آلكالاز ممکن است منجر به تولید پروفایل پپتیدی کم تر بهینه برای مهار رادیکال DPPH شود. روندهای مشابهی در مطالعه ای روی پروتئین آبکافت ماهی *Catla catla* مشاهده شد، جایی که پروتئین های مختلف بسته به مکانیزم عمل خود، فعالیت های آنتی اکسیدانی متفاوتی تولید کردند. برای مثال، آبکافت های تهیه شده با بروملین (آنزیمی با سایت های شکافت خاص) فعالیت مهار رادیکال DPPH بالاتری نسبت به آلكالاز داشتند (۴۹). این موضوع تأکید می کند که ویژگی آنزیمی نقش مهمی در تعیین خواص زیست فعال آبکافت ها دارد. در مطالعه ای روی آبکافت های ماهی Ribbon Fish مشاهده شد که آلكالاز آبکافت هایی با خواص آنتی اکسیدانی خوب اما نه بهینه تولید می کند که این امر به محدودیت اندازه پپتیدها نسبت داده شد (۳۱). اثرگذاری بیشتر FO+FL ممکن است بازتاب توانایی آن در آشکار کردن باقی مانده های هیدروفوبیک و اسیدهای آمینه معطر باشد که از عوامل کلیدی مهار رادیکال DPPH هستند. این یافته با مطالعاتی که نشان داده اند تیمارهای متوالی آنزیمی خواص زیست فعال عملکردی آبکافت ها را با آزادسازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی قوی تر بهبود می بخشد، هم خوانی دارد (۹).

همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ از طریق توانایی آن‌ها در مهار رادیکال‌های ABTS ارزیابی شد. یکی دیگر از روش‌های سنجش که به طور مکرر استفاده می‌شود، آزمون حذف ۲،۲'-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) یا آزمون ABTS است. در این آزمون، ABTS توسط رادیکال‌های پروکسیل یا سایر اکسیدان‌ها به کاتیون رادیکال آن، $ABTS^{*+}$ اکسید می‌شود. میزان مهار این رادیکال در غلظت‌های مختلف آبکافت‌ها (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بررسی شد و نتایج به صورت IC_{50} % در شکل ۲ ارائه شده است. در بالاترین غلظت (۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، تمام تیمارها فعالیت مهارکنندگی بسیار بالایی (۸۹-۹۱٪) نشان دادند، که نشان دهنده پتانسیل آنتی اکسیدانی قوی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ است. میزان IC_{50} % در سه تیمار اختلاف معناداری نداشتند و در آبکافت‌های تیمار شده با آلکالاز، FO+FL و FO، به ترتیب ۰/۶، ۰/۵۸ و ۰/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل بالای مهار رادیکال ABTS در تمام تیمارهای آنزیمی است، این روند با گزارش‌های مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد که در آن‌ها آبکافت آنزیمی می‌تواند پپتیدهایی با خواص آنتی اکسیدانی قوی آزاد کند (۳۱، ۳۴). مطالعات روی پروتئین‌های آبکافت ماهی تیمار شده با آلکالاز به‌طور مداوم روندهای مشابهی را نشان داده‌اند، که کارایی آن را در توسعه غذاهای کارکردی پیشنهاد می‌کند (۳۶). بنابراین، ترکیب اندوپپتیدازها و اگزوپپتیدازها برای تولید پروتئین‌های آبکافتی آنتی اکسیدانی مفید است زیرا پپتیدهای کوتاه‌تر آزاد می‌شوند. این امر در مطالعه‌ای بر روی آبکافت‌های کازئین که با استفاده از آزمون ABTS بررسی شد، نشان داده شد. یک محلول کازئین غیرآبکافت شده اثری آنتی اکسیدانی در حدود ۱۵ درصد نشان داد اما پس از آبکافت با استفاده از آلکالاز، اثر آنتی اکسیدانی به حدود ۲۷ درصد افزایش یافت. کاربرد یک پروتئین ترکیبی (-FUS-PepN-PepX) که شامل دو نوع اگزوپپتیداز: آمینوپپتیداز عمومی، و پرول-دی‌پپتیدیل-آمینوپپتیداز بود، اثر آنتی اکسیدانی را به بیش از ۴۰ درصد نسبت به کازئین غیرآبکافت شده افزایش داد (۵۰). فعالیت قوی مهار رادیکال ABTS در پروتئین آبکافت ماهی لومپ احتمالاً ناشی از آزاد شدن پپتیدهای زیست‌فعال در طی آبکافت آنزیمی است. این پپتیدها ممکن است حاوی توالی‌های خاصی از اسیدهای آمینه یا ویژگی‌های ساختاری باشند که به آن‌ها اجازه می‌دهد رادیکال‌های آزاد را به‌طور مؤثر خنثی کنند.





شکل ۲- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO)، و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) بر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH و ABTS پروتئین آبکافت ماهی لومپ. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌ها است. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌ها در سطح $p < 0.05$ است.

Figure 2 - The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the DPPH and ABTS radical scavenging activity of lumpfish hydrolyzed protein. Similar letters indicate no significant statistical difference between groups, while different letters indicate a significant statistical difference between groups at the level of $p < 0.05$.

پروفیل اسیدهای آمینه و تأثیر تیمارهای آنزیمی بر ترکیب اسیدهای آمینه

ویژگی‌های آنتی اکسیدانی پپتیدها به طور پیچیده با ترکیب اسید آمینه آن‌ها، توالی این اسیدهای آمینه و خواص آب‌گریز آن‌ها مرتبط است (۵۱). پروفایل اسیدهای آمینه شامل ۱۷ اسید آمینه بررسی شد. تیمارهای آنزیمی منجر به بازده‌های متفاوت اسید آمینه کل شدند، به‌طوری که مجموع اسیدهای آمینه در تیمار آلکالاز ۶۸۰/۷۳ میلی گرم بر گرم بود، به دنبال آن FO با مقدار ۶۴۰/۲۲ و FO+FL با مقدار ۵۹۹/۶۶ میلی گرم بر گرم قرار گرفتند. آلکالاز به طور مداوم بالاترین غلظت‌های اسیدهای آمینه را تولید کرد، به ویژه گلوتامیک اسید (۹۵/۰۵ میلی گرم در گرم)، گلیسین (۷۶/۶۵ میلی گرم در گرم)، آسپارتیک اسید (۵۹/۴۳ میلی گرم در گرم)، و لیزین (۵۱/۴۴ میلی گرم در گرم). این عملکرد برتر را می‌توان به اختصاصیت گسترده آلکالاز و فعالیت‌های ترکیبی اندوپپتیدازی و اگزوپپتیدازی آن نسبت داد. محتوای اسیدهای آمینه ضروری در مطالعه حاضر قابل مقایسه با گزارش قبلی نومان و همکاران (۲۰۲۰) بود، که در آن از آلکالاز و پاپائین برای ایجاد پروتئین‌های آبکافتی از تاس‌ماهی چینی استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که محتوای اسید آمینه ضروری در آبکافت‌های به دست آمده از آلکالاز ۴۹/۶۲ (گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بود (۵۲).

کارایی آلکالاز در آزادسازی طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه، از جمله اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین، با یافته‌های مطالعات انجام شده روی گونه‌های دیگر ماهی هم‌خوانی دارد. در دونگ و همکاران (۲۰۰۸) ماهی کپور نقره‌ای با آنزیم آلکالاز و فلاورزیم آبکافت شد. در نمونه تیمار شده با آلکالاز، هر دو اسید آمینه گوگردی (متیونین و سیستئین) افزایش ۱ تا ۳ برابری نشان دادند. افزایش جزئی در پرولین نیز در پروتئین ماهی کپور نقره‌ای آبکافت شده با آلکالاز مشاهده شد. چندین آمینواسید مانند تیروزین، متیونین، هیستیدین، لیزین و تریپتوفان که به‌طور کلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند و همچنین محتوای کلی آمینواسیدهای

هیدروفوبیک در پروتئین‌های آبکافت ماهی کپور نقره‌ای با آلکالاز بالاتر از فلاورزیم بود (۵۳). این نتایج نشان می‌دهند که آلکالاز به دلیل فعالیت ترکیبی اندوپتیداز و اگزوپتیداز، در آزادسازی اسیدهای آمینه مؤثرتر بوده است.

. مقادیر لیزین و آلانین در تیمار FO قابل توجه بود این موضوع نشان می‌دهد که فعالیت اندوپتیدازی FO در شکستن پیوندهای پپتیدی خاص مؤثر است و احتمالاً بقایای آب‌گریز بیشتری را آشکار می‌کند. محتوای نسبتاً بالای لیزین از دیدگاه تغذیه‌ای مهم است، زیرا لیزین یک اسید آمینه ضروری است که اغلب در پروتئین‌های گیاهی محدود است. در مطالعه آسپویک و همکاران (۲۰۲۱) گزارش شده است که محتوای کل پروتئین در آبکافت‌های ستون فقرات ماهی سالمون، ماکرل و هرینگ که با استفاده از آنزیم FO تهیه شده بود، به ترتیب ۹۲/۱، ۸۹/۹ و ۸۴/۹ گرم در ۱۰۰ گرم بود درحالی که با استفاده از آنزیم بروملین به ترتیب ۳۵/۲، ۳۴/۱ و ۳۳/۸ گرم در ۱۰۰ گرم مشاهده شد (۵۴).

محتوای بالای گلوتامیک اسید، گلیسین و اسید آسپارتیک در آبکافت‌های حاصل از تیمار با آلکالاز نشان‌دهنده کاربردهای بالقوه در بهبود طعم است. به‌ویژه، گلوتامیک اسید به دلیل نقش آن در طعم یومامی یا طعم ویژه آبزیان شناخته شده است. حضور اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و لوسین در تمام تیمارها، نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ است. اسیدهای- آمینه آروماتیک و هیستیدین در توالی پپتید به‌عنوان مهارکننده مستقیم رادیکال عمل می‌کنند. وجود اسیدهای آمینه آروماتیک در ساختار یک پپتید یک مزیت است زیرا می‌تواند پروتون‌ها را به راحتی به رادیکال‌هایی که کمبود الکترون دارند، اهدا کنند و در عین حال ثبات خود را از طریق ساختارهای رزونانس حفظ کنند. از این رو می‌توان حدس زد که تفاوت در فعالیت مهار اکسیداسیون می‌تواند به دلیل وزن مولکولی یا آرایش خاص اسیدهای آمینه باقی مانده در توالی پپتید باشد (۵۵).

جدول ۱- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO)، و ترکیب Food ProPNL و فلاورزیم (FO+FL) بر پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت ماهی لومپ (mg g^{-1})

Table 1 - The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the amino acid profile of lumpfish hydrolyzed protein (mg/g).

Enzymes			
FO	FO+FL	AL	اسید آمینه
			Amino acid
48.76±0.16 ^a	47.08±0.42 ^a	51.44±0.07 ^b	لیزین
			LSN
12.57±0.02 ^a	11.76±0.25 ^a	13.23±0.13 ^a	هیستیدین
			HIS
35.38±0.24 ^b	28.85±1.46 ^a	36.25±1.33 ^b	آرژنین
			ARG
70.97±1.83 ^b	65.54±1.86 ^a	76.65±1.34 ^c	گلیسین
			GLY
34.65±0.22 ^a	32.59±1.17 ^a	17/36±0.01 ^b	سرین
			SER
45.32±0.64 ^a	41.80±2.11 ^a	48.58±1.56 ^b	آلانین
			ALA
29.43±0.11 ^a	27.92±1.88 ^a	31.39±0.09 ^a	ترئونین
			THR

54.47±0.74 ^a	52.08±1.33 ^a	59.43±1.08 ^b	آسپارتیک اسید ASP
88.29±1.35 ^b	82.59±1.14 ^a	95.05±1.34 ^c	گلوتامیک اسید GLU
45.70±0.54 ^b	41.58±1.23 ^a	49.91±0.07 ^c	پرولین PRO
27.78±0.28 ^a	27.23±1.26 ^a	29.33±1/03 ^a	والین VAL
18.81±0.23 ^a	17.61±0.72 ^a	19.49±0.22 ^a	متیونین MET
16.78±0.25 ^a	16.56±0.57 ^a	16.70±0.2 ^a	تیروزین TYR
44.87±0.27 ^{ab}	42.50±1.96 ^a	46.02±1.36 ^b	ایزولوسین ILE
42.93±0.62 ^a	41.52±1.49 ^a	45.96±0.29 ^b	لوسین LEU
23.49±0.64 ^{ab}	22.45±0.91 ^a	25.13±0.35 ^b	فنیل آلانین PHE
640.22 ^b	599.66 ^a	680.73 ^c	اسید آمینه کل Total

حروف a, b, و c نشان دهنده اختلاف معنی دار در هر ردیف در سطح $p < 0.05$ می باشد.

The letters a, b, and c indicate significant differences in each row at the level of $p < 0.05$.

نتیجه گیری کلی

مطالعه حاضر به بررسی قابلیت استفاده از پروتئین آبکافت ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) به عنوان منبعی برای تولید پپتیدهای زیست فعال با خواص آنتی اکسیدانی پرداخته است. این رویکرد در راستای استفاده بهینه از ضایعات دریایی و بهره برداری از منابع پایدار صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که آبکافت آنزیمی پروتئین های این ماهی با استفاده از آنزیم های مختلف، می تواند به تولید پپتیدهایی منجر شود که نه تنها دارای خواص آنتی اکسیدانی قوی هستند، بلکه می توانند به عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی اکسیدان های مصنوعی در صنایع مختلف مورد بررسی قرار گیرند. از سه تیمار آنزیمی استفاده شده، تیمار ترکیبی FO+FL عملکرد برتری در مهار رادیکال های آزاد نشان داد، که می تواند به اثرات هم افزایی این دو آنزیم نسبت داده شود. این ترکیب با آزادسازی پپتیدهای کوتاه تر و با زیست فعالی بیشتر، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. از سوی دیگر، آلکالاز به دلیل ویژگی های اندوپپتیدازی و اگزوپپتیدازی گسترده خود، قادر به تولید مقادیر بیشتری از اسیدهای آمینه ضروری و طعم دهنده بود که می تواند کاربردهای بالقوه ای در بهبود ارزش تغذیه ای و طعم محصولات داشته باشد.

فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای تولید شده، از جمله توانایی مهار رادیکال های DPPH و ABTS، نشان دهنده پتانسیل بالای این ترکیبات در مقابله با استرس اکسیداتیو است. این ویژگی می تواند به کاربرد این پپتیدها در فرمولاسیون مکمل های غذایی، محصولات آرایشی-بهداشتی و دارویی منجر شود. علاوه بر این، استفاده از آبکافت آنزیمی یک روش پایدار زیست محیطی برای فرآوری ضایعات شیلاتی به شمار می آید. از منظر محیط زیستی، نتایج این تحقیق نقش مهمی در کاهش ضایعات دریایی و حمایت از اقتصاد چرخه ای دارد. استفاده از ضایعات ماهی لومپ به عنوان یک منبع پروتئینی با ارزش افزوده، نه تنها از هدررفت منابع

طبیعی جلوگیری می‌کند، بلکه به کاهش وابستگی به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و بهره‌گیری از جایگزین‌های طبیعی و ایمن کمک می‌کند. در مجموع، این مطالعه نشان داد که پروتئین‌های استخراج‌شده از ماهی لومپ، به‌ویژه از طریق آبکافت آنزیمی با تیمارهای مناسب، می‌توانند به‌عنوان یک منبع نوآورانه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال باشند. توسعه این فناوری نه تنها گامی مؤثر در راستای پایداری منابع دریایی و کاهش ضایعات است، بلکه می‌تواند به پیشرفت صنایع مختلف از طریق تولید ترکیبات طبیعی، ایمن و با کارایی بالا کمک کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به جهت حمایت مادی و معنوی از تحقیق حاضر در قالب رساله دکتری خانم الهه شریفی تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Wen, C., Zhang, Y., Liu, Y., & Zhang, H. (2020). Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H₂O₂-induced oxidative stress. *Food Chemistry*, 327, 127059. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127059>
2. Liu, W., Liu, Y., & Zhang, Y. (2022). Anti-inflammatory function of plant-derived bioactive peptides: A review. *Foods*, 11(15), 2361. <https://doi.org/10.3390/foods11152361>
3. Avilés-Gaxiola, S., López-Cervantes, J., & González-Córdova, A. F. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory properties of novel peptides from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *South African Journal of Botany*, 141, 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.005>
4. Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03892-1>
5. Rahman, M. S., Saha, S., & Rahman, M. M. (2018). A novel antioxidant peptide, purified from *Bacillus amyloliquefaciens*, showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression. *Food Chemistry*, 239, 502-510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.051>
6. Wang, J. Y., Zhang, Y., & Liu, X. (2020). Triphenylphosphonium (TPP)-based antioxidants: A new perspective on antioxidant design. *ChemMedChem*, 15(5), 404-410. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900730>
7. Guo, H., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, X., & Chen, X. (2023). Separation and purification of antioxidant peptide from fermented whey protein by *Lactobacillus rhamnosus* B2-1. *Food Science of Animal Resources*, 43(1), 10. <https://doi.org/10.5851/fsar.2023.10>
8. Zhang, F., Wang, Y., Liu, Y., & Chen, X. (2019). Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed dreg. *Food Chemistry*, 285, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.020>
9. Chen, X., Li, Y., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2023). Antioxidant peptides from the collagen of antler ossified tissue and their protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage toward HaCaT cells. *Molecules*, 28(19), 6887. <https://doi.org/10.3390/molecules28196887>
10. Xia, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2022). Purification, identification, and antioxidative mechanism of three novel selenium-enriched oyster antioxidant peptides. *Food Research International*, 157, 111359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111359>
11. López-García, G., Pérez, M., & Martínez, J. (2022). Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins. *Molecules*, 27(4), 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>
12. Duffuler, P., Boulanger, A., & Gauthier, C. (2022). Bioactive peptides: From basic research to clinical trials and commercialization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(12), 3585-3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00823>
13. Patil, P. J., Shukla, S. S., & Khedkar, V. M. (2022). Exploring bioactive peptides as potential therapeutic and biotechnology treasures: A contemporary perspective. *Life Sciences*, 301, 120637. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120637>
14. Zaky, A. A., El-Sayed, M. A., & El-Baz, F. K. (2022). Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>

15. Rajapakse, N., & Mendis, E. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.04.002>
16. Brooker, A. J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183(12), 383-383.
17. Ageeva, T. N., & Kolesnikova, S. A. (2021). Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) used as cleaner fish: Characterization and suitability for human consumption. *Applied Food Research*, 1(2), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100008>
18. Brooker, A. J., & Stien, L. H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: Recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183(12), 383. <https://doi.org/10.1136/vr.k490>
19. Vang, B., & Haug, A. (2021). Utfordringer som hindrer økt utnyttelse av marine restråstoff og marine arter. *Nofima Rapportserie*.
20. Lian, K., Zhang, Y., & Wang, Y. (2024). More sustainable use of aquaculture cleaner fish: Collagen-rich protein hydrolysates from lumpfish (*Cyclopterus lumpus*)—effects of biomass, pretreatment, and enzyme choice. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1346548. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1346548>
21. Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.014>
22. Ashaolu, T. J. (2020). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 421-428. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14467>
23. Zhuang, X., Zhang, Y., & Liu, Y. (2018). The ecological study of isolation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from the skin of lumpfish. *Ekoloji Dergisi*, 106.
24. Vate, N. K., & Zhang, Y. (2023). Structural and functional properties of collagen isolated from lumpfish and starfish using isoelectric precipitation vs salting out. *Food Chemistry: X*, 18, 100646. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100646>
25. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60255a002>
26. Shimada, K., & Yamamoto, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a014>
27. Obon, J. M., & Gómez, M. (2005). Assessment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants. *Food Research International*, 38(8-9), 843-845. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.006>
28. Özcan, S., & Şenyuva, H. Z. (2006). Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods. *Journal of Chromatography A*, 1135(2), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.058>
29. Adler-Nissen, J. (1986). *Enzymic hydrolysis of food proteins*. UK: Elsevier.
30. Abd El-Rady, T. K., & El-Sayed, M. A. (2023). Effect of different hydrolysis methods on composition and functional properties of fish protein hydrolysate obtained from bigeye tuna waste. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 6552-6562. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16299>
31. Shahidi, F., Han, X.-Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3), 285-293. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00077-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00077-2)
32. Hai, T. (2020). Hydrolysis methods for protein extraction from seafood. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 11(2), 222-224. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.11.001>
33. Ren, L., & Zhang, Y. (2021). Enzymatic hydrolysis of broken rice protein: Antioxidant activities by chemical and cellular antioxidant methods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 788078. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.788078>
34. Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189228>
35. Anggraeni, S. L., & Sari, R. (2022). Edamame protein hydrolysis using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus paracasei* produce short peptides with higher antioxidant potential. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(7). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230731>

36. Zhang, Y., & Liu, Y. (2011). Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *European Food Research and Technology*, 232, 941-950. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1446-1>
37. Dent, T., & Maleky, F. (2023). Pulse protein processing: The effect of processing choices and enzymatic hydrolysis on ingredient functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(29), 9914-9925. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2231234>
38. Borges, S., & Ferreira, I. (2023). Fish by-products: A source of enzymes to generate circular bioactive hydrolysates. *Molecules*, 28(3), 1155. <https://doi.org/10.3390/molecules28031155>
39. Camargo, T. R., & Silva, A. (2021). Biological activities of the protein hydrolysate obtained from two fishes common in the fisheries bycatch. *Food Chemistry*, 342, 128361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128361>
40. Alahmad, K., & Khedher, N. B. (2023). Influence of the enzymatic hydrolysis using flavourzyme enzyme on functional, secondary structure, and antioxidant characteristics of protein hydrolysates produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Molecules*, 28(2), 519. <https://doi.org/10.3390/molecules28020519>
41. Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04682.x>
42. Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2007). An introduction to peptidases and the MEROPS database. In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (pp. 161-179). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_10
43. Merz, M., & Pohl, M. (2015). Wheat gluten hydrolysis using isolated Flavourzyme peptidases: Product inhibition and determination of synergistic effects using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.006>
44. Stressler, T., & Ewert, J. (2013). Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis. *PLoS One*, 8(7), e70055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070055>
45. Ewert, J., & Stressler, T. (2019). An innovative two-step enzymatic membrane bioreactor approach for the continuous production of antioxidative casein hydrolysates with reduced bitterness. *Biochemical Engineering Journal*, 150, 107261. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107261>
46. Braun, C., Ewert, J., & Stressler, T. (2017). Characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of the fusion protein FUS-PepN_PepX and their application for milk protein hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 243, 1815-1828. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2830-5>
47. Nguyen, H. T., & Tran, T. (2022). Protein characteristics and bioactivity of fish protein hydrolysates from tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) side stream isolates. *Foods*, 11(24), 4102. <https://doi.org/10.3390/foods11244102>
48. Henriques, A., & Varela, J. (2021). Characterization of protein hydrolysates from fish discards and by-products from the North-West Spain fishing fleet as potential sources of bioactive peptides. *Marine Drugs*, 19(6), 338. <https://doi.org/10.3390/md19060338>
49. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., & Shamasundar, B. (2014). 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*, 38(3), 1207-1214. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12036>
50. Stressler, T., & Ewert, J. (2016). A fusion protein consisting of the exopeptidases PepN and PepX—production, characterization, and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 7499-7515. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7468-4>
51. Alemán, A., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.010>
52. Noman, A., & Zhang, Y. (2020). Effects of ultrasonic, microwave, and combined ultrasonic-microwave pretreatments on the enzymatic hydrolysis process and protein hydrolysate properties obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13292. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13292>
53. Dong, S., & Zhang, Y. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485-1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.013>
54. Aspevik, T., & Haug, A. (2021). Nutritional and sensory properties of protein hydrolysates based on salmon (*Salmo salar*), mackerel (*Scomber scombrus*), and herring (*Clupea harengus*) heads and backbones. *Frontiers in Nutrition*, 8, 695151. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.695151>

55. Himaya, S., & Kim, S. K. (2012). Peptide isolated from Japanese flounder skin gelatin protects against cellular oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9112-9119.
<https://doi.org/10.1021/jf302158u>

Producing of Antioxidant Peptides from Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) by Enzymatic Hydrolysis and Investigation of Amino Acid Profile

Elahe Sharifi Torksolouyeh¹, Ali Taheri^{2*}, Mirmahdi Zahedi³

1- PhD Student in Seafood Processing, Department of Fisheries, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
Email: sharifi.elahel370@gmail.com

2- Corresponding Author, Associate Professor of Seafood Processing, Department of Fisheries, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran. Email: taherienator@gmail.com

3- Associate Professor of Analytical Chemistry, Department of Marine Chemistry, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran. Email: idm.m.zahedi@gmail.com

Abstract

Oxidative stress, caused by the overproduction of free radicals, is a major factor in many chronic diseases, including premature aging, cancer, and cardiovascular disorders. Antioxidants play a crucial role in absorbing and neutralizing free radicals, thereby reducing their harmful effects on the body. In recent years, bioactive peptides extracted from marine protein sources have attracted much attention due to their strong antioxidant properties and natural safety. Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*), commonly used in Europe to reduce sea lice parasites in salmon co-culture, becomes waste after harvesting. This study aimed to optimize the utilization of this protein source for the production of lumpfish protein hydrolysate and antioxidant peptides.

Lumpfish meat was subjected to enzymatic hydrolysis with three different treatments: Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and a combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL). The degree of hydrolysis, antioxidant properties (DPPH and ABTS radical scavenging), and amino acid profile of the samples were measured and compared.

After 180 minutes, the final degree of hydrolysis in all treatments reached approximately 47-48%, with no significant difference between the treatments. All enzymatic treatments successfully produced peptides with strong antioxidant properties. At a concentration of 10 mg/mL, the FO+FL combination showed the highest DPPH radical scavenging activity (79.83%) with a significant difference, followed by FO (68.94%) and Alcalase (67.78%). At the highest concentration (4 mg/mL), all treatments showed very high ABTS radical scavenging activity (89-91%), and there was no significant difference in the IC₅₀ values among the three treatments. The enzymatic treatments resulted in different total amino acid yields, with the total amino acids in the Alcalase treatment being 680.73 mg/g, followed by FO with 640.22 mg/g and FO+FL with 599.66 mg/g. Alcalase consistently produced the highest concentrations of amino acids, especially glutamic acid (95.05 mg/g), glycine (76.65 mg/g), aspartic acid (59.43 mg/g), and lysine (51.44 mg/g).

The results showed that the combination of endopeptidases (with random hydrolysis of peptide bonds) and exopeptidases (with hydrolysis of the end points of the protein chain) can increase the production of peptides with optimal biological activity. These peptides have the potential to replace synthetic antioxidants in the food and pharmaceutical industries and can contribute to reducing biological waste and producing nutraceuticals.

Keywords: Lumpfish, Enzymatic hydrolysis, Antioxidant properties, Alcalase, Food ProPNL