مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۳ شماره ۲/ سال ۱۴۰۲/ صفحات ۳۱ تا ۴۱
DOI:10.22034/FR.2023.53270.1848

تاثیر اولترافیلتراسیون بر خصوصیات ضداکسایشی پپتیدهای زیست‌فعال ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

النار نامی خسمخی[۱]، اسحق زکی‌پور رحیم‌آبادی[۲*] و معصومه مهربان سنگ‌آتش [۳]

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۱۹

[۱] دانشجوی دکتری، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی ، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
[۲] دانشیار، گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه گیلان، گیلان، ایران
[۳] استادیار، گروه پژوهشی کیفیت و ایمنی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد، ایران
* مسئول مکاتبه: Email: e_zakipour@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: تبدیل ضایعات شیلاتی به ترکیباتی با ارزش افزوده، روشی مناسب جهت کاهش آلودگی زیست محیطی و استفاده بهینه از دورریز آبزیان می‌باشد. **هدف**: تاثیر اولترافیلتراسیون بر خصوصیات ضداکسایشی پپتیدهای زیست فعال ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) می‌باشد. **روش کار**: در این پژوهش امعاء و احشاء ماهی تهیه شده و چرخ گردید. هیدرولیز پروتئین در شرایط بهینه صورت گرفت و تیمارهای تحقیق شامل تیمار۱: غلظت ۱٪ آنزیم آلکالاز (۱:۱۰۰ آنزیم به سوبسترا) و تیمار۲: غلظت ۲٪ (۲:۱۰۰ آنزیم به سوبسترا) بودند. ترکیبات تقریبی امعاء و احشاء و درجه هیدرولیز اندازه‌گیری شد. با استفاده از شاخص‌های DPPH و $ABTS^+$ خاصیت ضداکسیدانی تیمارها اندازه گیری گردید و از تیمار حاوی خاصیت ضداکسیدانی بالاتر (تیمار۲) جهت جزء گیری پپتید زیست فعال توسط غشاهای اولترافیلتراسیون با وزن‌های ۳۰KDa>، ۱۰KDa> و ۳ KDa> استفاده شد و مجددا خاصیت ضداکسیدانی وزن های مولکولی مختلف پپتیدها بررسی گردید. **نتایج**: با افزایش غلظت آنزیم به ۲٪ (تیمار۲)، درجه هیدرولیزاسیون و خاصیت ضداکسیدانی افزایش یافت. نتایج مهار رادیکال DPPH و $ABTS^+$ بر وزن‌های مولکولی مختلف در این تیمار نشان داد که همه اجزاء پپتیدی از خاصیت ضداکسیدانی برخوردار بودند. اما جزء پپتیدی ۳> کیلودالتون دارای خاصیت مهارکنندگی بالاتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها بود که مقادیر آن در مهار رادیکال DPPH، ۵۵/۰۱±۷۶/۰ و در شاخص مهارکنندگی $ABTS^+$، ۲۵/۰۵±۸۸/۰ در غلظت‌های برابر ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. **نتیجه‌گیری نهایی**: درجه هیدرولیز و خاصیت ضداکسیدانی با افزایش غلظت آنزیم افزایش یافت، همچنین با کاهش وزن مولکولی در پپتید زیست-فعال، خاصیت ضداکسیدانی آن افزایش پیدا کرد.

واژگان کلیدی: آنزیم آلکالاز، پپتید زیست‌فعال، قزل‌آلای رنگین‌کمان، غشاهای اولترافیلتراسیون، هیدرولیز پروتئین

مقدمه

صنعت شیلات از مهمترین عوامل موثر بر اقتصاد بسیاری از کشورهای جهان است. محصولات ضمنی یا جانبی عمل‌آوری آبزیان بخش بزرگی از تولید ماهیان را تشکیل می‌دهند (هی و همکاران ۲۰۱۳). استفاده از ضایعات حاصل از عمل آوری آبزیان، نه تنها سبب

افزایش ارزش اقتصادی برداشت آبزیان خواهد بود، بلکه همچنین با کاهش مقدار ضایعات فرآوری آبزیان سبب کاهش آلودگی و هزینه‌های اقتصادی مرتبط با تصفیه ضایعات تولید شده می‌باشد (فانگ و همکاران ۲۰۱۷). عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل آوری آبزیان شامل، پوست، امعاء و احشاء و خون حاوی مقدار مناسبی پروتئین هستند که می‌تواند به عنوان منبعی برای پپتیدهای فعال زیستی استفاده شود (چالامیاه و همکاران ۲۰۱۲). پروتئین‌ها به سه روش ۱-هیدرولیز توسط آنزیم‌های گوارشی ۲- هیدرولیز توسط میکروارگانسیم‌های پروتئولیتیک ۳- هیدرولیز از طریق تاثیر آنزیم‌های پروتئیولیتیک گیاهان شکسته می‌شوند (یاری و همکاران، ۱٤۰۱). پروتئین هیدرولیز شده معمولا شامل قطعه‌های کوچک از پپتیدهای زیست‌فعال که شامل ۲۰-۲ آمینواسید هستند (رایان ۲۰۱۱). پپتیدهای زیست فعال دارای توالی‌های خاص از اسیدهای آمینه هستند و تا زمانی که با دیگر اسیدهای آمینه موجود در ساختار اولیه پروتئین متصل باشند به صورت غیر فعال می‌باشند (هارندی و فیتزگرالد ۲۰۱۲). کیفیت یا خواص پپتیدهای آزاد شده توسط پروتئین هیدرولیز شده ماهی (FPH)[۱] به شدت به نوع پروتئازها یا مواد شیمیایی، دما، pH و زمان اجرا در طول هیدرولیز بستگی دارد (ناضر و آنیلاکولاندا ۲۰۱۲). از مهمترین عملکردهای این ترکیبات زیست‌فعال می‌توان به فعالیت‌های ضد اکسایش، ضد میکروبی، ضد سرطان و افزایش دهنده‌ی سیستم ایمنی بدن اشاره کرد (ویوکیو و همکاران ۲۰۱۱). از قابلیت‌های ضداکسیدانی این ترکیبات می‌توان به ویژگی‌هایی شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد، شلاته کننده‌ی فلزات، خاموش کننده‌ی اکسیژن یا دهنده‌ی هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به وسیله‌ی تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن اشاره کرد (لی و همکاران ۲۰۰۸). آلکالاز یک پروتئاز باکتریایی قلیایی است که توسط *Bacillus licheniformis* تولید می‌شود و آلکالاز L ۲/٤ به دلیل هیدرولیز در زمان نسبتاً کوتاه و در شرایط pH مناسب نسبت به آنزیم‌های اسیدی یا طبیعی می‌تواند درجه هیدرولیز بالایی را بدست آورد (کریستینسون و راسکو ۲۰۰۰). ماهی قزل‌آلای رنگین کمان یکی از مهمترین ماهیان پرورشی می باشد، این محصول در مقایسه با پروتئین‌های حیوانی دارای مقدار زیادی اسیدهای چرب ضروری و پروتئین است (هاردی ۱۹۹۱). از آنجا که تولید پپتیدهای زیست‌فعال از ضایعات ماهیان و خواص زیست فعالی آن‌ها از جمله خاصیت ضداکسیدانی، در سایر مطالعات صورت گرفته است، در این تحقیق به دنبال تاثیر وزن مولکولی پپتیدها بر خصوصیات ضداکسیدانی آن‌ها با استفاده از غشاهای اولترافیلتراسیون بودیم، به همین دلیل هدف از این مطالعه ابتدا بررسی خاصیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از شاخص‌های مهار رادیکال ۱-۱-دی فتیل پیکریل-۲- هیدرازیل (DPPH) و ۲-۲-آنیزو-بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-٦-سولفونیک اسید ($ABTS^+$) و سپس تاثیر وزن‌های مولکولی مختلف بر خصوصیات ضداکسیدانی پپتیدهای استحصالی از آن می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه و مواد آزمایشگاهی

امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین کمان از ماهی قزل‌آلای تازه از مزرعه پرورش قزل‌آلا در مشهد تهیه شد و به همراه مقادیر کافی یخ در کوتاهترین زمان به آزمایشگاه پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی مشهد منتقل گردید و پس از چندین بار شست‌وشو، نمونه‌ها با چرخ گوشت با قطر منافذ ٤ میلیمتر چرخ شد و تا زمان مصرف در دمای $-۲۰^{\circ}C$ نگهداری گردید. مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت‌های مرک و سیگما-آلدریچ تهیه شدند.

۱. Fish Protein Hydrolyzates

آنالیز تقریبی نمونه ها

آنالیز تقریبی نمونه ها طبق روش استاندارد ای او ای سی (۲۰۰۵) تعیین گردید.

تولید پروتئین هیدرولیز شده

ابتدا نمونه‌ها پس از انجمادزدایی و چرخ شدن، به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۸۵°C (در حمام آبی) قرار گرفت تا آنزیم‌های درونی آن غیر فعال شود. سپس ۵۰ گرم از نمونه با نسبت ۲:۱ (نمونه:آب مقطر) ترکیب شدند و با استفاده از NAOH، pH مخلوط را به ۸/۵ رسانده شد. بعد از آن، نمونه‌ها در انکوباتور (دمای ۵۵°C) قرار داده شد. آنزیم آلکالاز به نسبت ۱٪ (تیمار ۱) و ۲٪ (تیمار ۲) وزن مخلوط به نمونه‌ها اضافه شد و نمونه‌ها به مدت ۱ ساعت در انکوباتور متحرک هم زده شدند. به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵°C گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها بعد از خنک شدن با استفاده از سانتریفوژ در دمای ۱۰°C، به مدت ۲۰ دقیقه (۸۰۰۰×g) سانتریفوژ شده و مایع روماند (Supernatant) جمع‌آوری و در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده نگهداری شدند (اویسی پور و همکاران ۲۰۱۲).

سنجش پروتئین محلول و اندازه گیری درجه هیدرولیز

مقدار پروتئین در فاز محلول با روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و اندازه گیری و میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله زیر محاسبه شد: (کریستینسون و راسکو ۲۰۰۰).

$$DH = \frac{10\%\ TCA \pm \text{Soluble N in sample}}{\text{Total N in in sample}}$$

بررسی خاصیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده در تیمارهای ۱٪ و ۲٪ آنزیم آلکالاز

در این مرحله خاصیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تیمارهای ۱ و ۲ با بررسی شاخص‌های DPPH بر طبق روش یو و همکاران (۲۰۱۰) و شاخص $ABTS^+$ با روش وانگ و همکاران (۲۰۱۲) اندازه گیری گردید.

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

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

جزءگیری پپتید زیست فعال (Fractionation) در تیمار ۲٪ آنزیم آلکالاز

با توجه به نتایج در مرحله قبل مشخص گردید که تیمار ۲ (۲٪ غلظت آلکالاز) از خاصیت ضداکسیدانی بالاتری برخوردار است، به همین جهت این تیمار توسط غشاهای اولترافیلتراسیون با وزن‌های مولکولی (۳۰KDa>، ۱۰KDa> و ۳ KDa>) کیلودالتون در این مرحله از آزمایش جزءبندی شدند و تیمار ۱ در این مرحله حذف گردید (موسکیورا و همکاران ۲۰۱٤).

بررسی خاصیت ضداکسیدانی فراکسیون‌های پپتیدی

در این مرحله خاصیت ضداکسیدانی فراکسیون‌های پپتیدی در وزن‌های مولکولی (۳۰KDa>، ۱۰KDa> و ۳KDa>) در تیمار ۲٪ آلکالاز، مجددا با بررسی شاخص‌های DPPH و $ABTS^+$ اندازه گیری گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

با استفاده از نرم افزار SPSS (16) و آنالیز واریانس یک طرفه (one way) انجام شد. همچنین برای مقایسه میانگین‌ها در مواردی که اثر کلی تیمارها معنی‌دار شناخته شد از آزمون دانکن در سطح 0.05> و جهت مقایسه معنی‌دار بودن بین دو تیمار از آزمون T-Test استفاده گردید. نتایج بصورت انحراف معیار ± میانگین بیان شد و رسم نمودار با نرم افزار Excel صورت گرفت.

نتایج و بحث

درصد ترکیبات تقریبی امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

با توجه به نتایج جدول فوق، بالاترین ترکیبات امعاء و احشاء رطوبت (۶۰/۸۱۷٪)، و چربی (۲۱/۹۱٪) و محتوی پروتئین (۱۳/۵۷) و پس از آن با محتوای خاکستر (۱/۱۲٪) و کربوهیدرات (۲/۱۷٪) کم بود. ترکیبات

شیمیایی مواد غذایی با فراهم کردن مواد مغذی ضروری، نقش مهمی را در سلامت بدن ایفا می‌کنند. نسبت بین ترکیبات ضایعات با توجه به سن و جنس ماهی متفاوت می‌باشد. میزان رطوبت به دست آمده در این ارزیابی مشابه با ضایعات قزل آلای رنگین کمان ٦٤٪/٥٢ بود (میرصادقی ١٣٩٤) و میزان پروتئین مشابه با ضایعات ماهی زالون ١٣/٠٠ (نعمتی و همکاران ١٣٩٨). خاکستر مشابه کیلکای معمولی ١/٤٦٪ (سلیمانی و همکاران ١٣٩٥) و چربی مشابه کیلکای آنچوی ٢٢/٨٣٪ بوده است (مهدابی و همکاران ١٤٠٠).

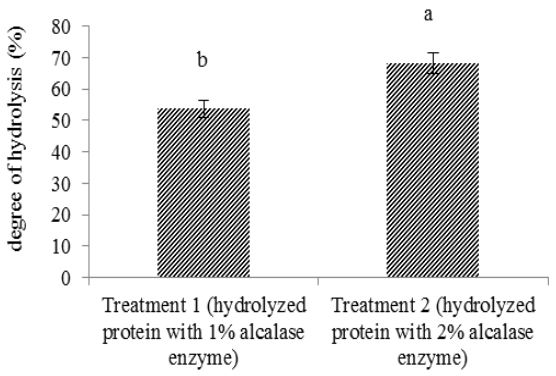
جدول ۱- ترکیبات تقریبی امعاء و احشاء قزل آلای رنگین کمان

Table 1- approximate composition of rainbow trout viscera

the substance	(%) Moisture	(%) Protein	(%) Ash	(%) Fat	(%) Carbohydrate
viscera	60.817±0.02	13.57± 0.03	1.12±0.05	21.91±0.01	2.17± 0.02

نتایج درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء به وسیله آنزیم آلکالاز ۱٪ و ۲٪

بر اساس نتایج درجه هیدرولیز با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز در هیدرولیز، افزایش یافت به طوری که در تیمار ٢ (١٥/٠٢±٠/٦٨٪) نسبت به تیمار ١ (٠/٢٢±٥٣/٦٠٪) افزایش معنی داری نشان داد ($p<0.05$). درجه هیدرولیز تغییر محتوای پپتید را در یک واکنش هیدرولیتیک تخمین می زند. این شاخص در واقع میزان تجزیه پروتئین توسط آنزیم مربوطه را در نسبت‌های مختلف با پروتئین هیدرولیز شده بازیافت شده اندازه گیری می‌کند و هر چه بالاتر باشد، اعداد بیشتری از پپتید در محلول تولید می‌شود (شریف و همکاران ٢٠١٤). در این راستا نتایج مهرگان نیکو و همکاران (١٣٩٢) گویای افزایش درجه هیدرولیز با بالا بردن فعالیت آنزیمی از غلظت ٣٠ به ٩٠ واحد آنسون بود و بین فعالیت‌های آنزیمی مورد استفاده تفاوت معنی‌داری وجود داشت.



شکل۱- تغییرات درجه هیدرولیز (میانگین ±SD) پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء به وسیله آنزیم آلکالاز ۱٪ و ۲٪

Figure 1- Changes in the degree of hydrolysis (mean ± SD) of the hydrolyzed protein of viscera by alcalase enzyme 1% and 2%

معادله [۱]- معادله استاندارد آلبومین سرم گاوی (BSA)

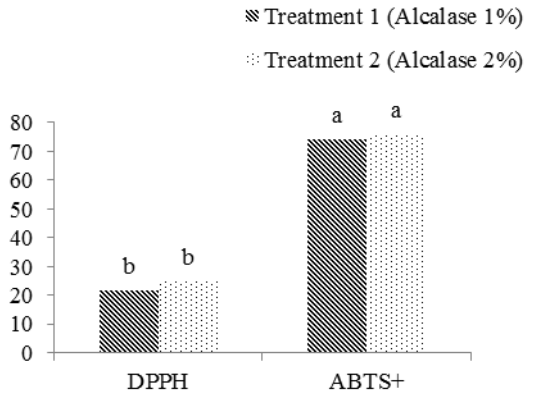
$y=0.4171x+0.6123$

$R^2=0.9966$

نتایج مربوط به خاصیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء وسیله آنزیم آلکالاز ۱٪ و ۲٪

با توجه به نتایج در نمودار زیر خصوصیت ضداکسیدانی در تیمار ٢ بطور معنی داری بالاتر از تیمار ١ بود بطوریکه مهار رادیکال آزاد DPPH از ٠/٠٨ ± ٢١/٦٠ در تیمار ١ به ٠/١١ ± ٢٤/٧١ در تیمار ٢ رسید ($p<0.05$) و مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$ از

۰/۱۱ ± ۷٤/۱۸ در تیمار ۱ به ۰/۰٤ ± ۷۵/۹۲ در تیمار ۲ رسید ($p<0.05$).

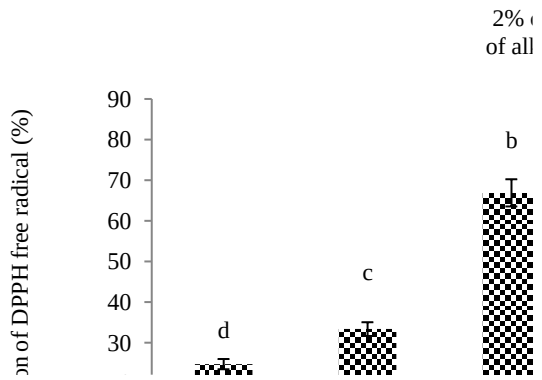


شکل ۲- پروتئین هیدرولیز شده در تیمار ۱٪ و ۲٪ آنزیم آلکالاز

Figure 2- Hydrolyzed protein in the treatment of 1% and 2% alcalase enzyme

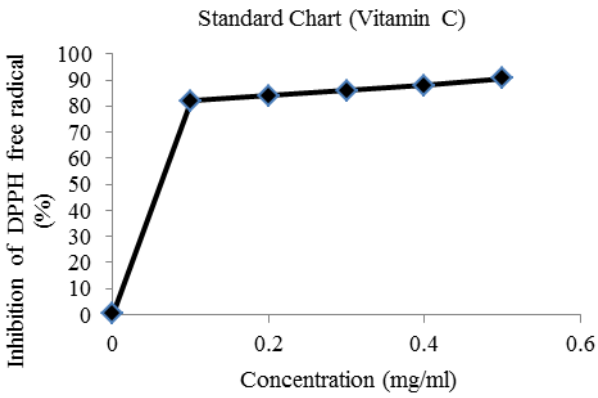
نتایج مقایسه درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH در اجزای پپتیدی در تیمار ۲٪ آنزیم آلکالاز

نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده و همه اجزای پپتیدی (۳۰KDa>، ۱۰KDa> و ۳KDa>) توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را دارا بودند اما در مقایسه اجزاء پپتیدی با غلظت برابر (۱/۲۵ mg/ml)، جزء پپتیدی ۳> کیلودالتون از خاصیت مهارکنندگی بالاتری (۷٦/۰±۵۵/۰۱) نسبت به سایر فراکسیون‌ها برخوردار بود و این تفاوت معنی‌دار مشخص گردید ($p<0.05$). از آسکوربیک‌اسید (ویتامین C) در غلظت‌های ۰/۵-۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به عنوان یک ضداکسیدان شاهد و کنترل مثبت استفاده شد و فعالیت ضداکسیدانی آن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۹۰/۷۲٪ محاسبه گردید (Fig5). به طور کلی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به عواملی از قبیل آنزیم به کار رفته، ماده اولیه و شرایط به کار گرفته شده در آزمایش بستگی دارد (جون و همکاران ۲۰۰٤). همچنین لازم به ذکر است که درجه هیدرولیز تاثیر متفاوتی بر فعالیت مهار DPPH ترکیب هیدرولیز شده دارد (گارسا-مورنو و همکاران ۲۰۱٤). با توجه به نتایج، فعالیت مهار رادیکال DPPH اجزاء مختلف پپتیدی به طور قابل توجهی تحت اثیر فرآیند الترافیلتراسیون قرار دارند بطوریکه الترافیلتراسیون، مهار رادیکال DPPH را بهبود بخشید که با نتایج ژونگ و همکاران (۲۰۱۱) مطابقت داشت. فرآیند الترافیلتراسیون میتواند پپتیدهای ضداکسیدانی را که اهداکننده الکترون هستند تخلیص کند و پپتیدهای حاصل میتوانند با رادیکال‌های آزاد واکنش دهد تا آنها را به محصولات پایدارتر تبدیل کنند و واکنش زنجیره‌ای رادیکال‌ها را خاتمه دهند (ژونگ و همکاران ۲۰۱۱). پپتیدهای با زنجیره کوتاه از خاصیت ضداکسیدانی بالاتری نسبت به پپتیدهای با زنجیره بلند برخوردار می‌باشند (بردبار و همکاران ۲۰۱۸)، علت این امر را می‌توان به تعداد اسیدآمینه‌های آب گریز در اجزاء پپتیدی نسبت داد که بر شدت فعالیت ضد-اکسیدانی تاثیرگذارند (جویلن و همکاران۲۰۱۰) نتایج تحقیق حاضر در جهت حذف رادیکال DPPH مشابه نتایج وانگ و همکاران (۲۰۱۳)، جانگ و همکاران (۲۰۱۷) و ایکسی و همکاران (۲۰۰۸) بود.



شکل۳- درصد تغییرات مهار رادیکال آزاد DPPH در اجزای پپتیدی با غلظت ۱/۲۵ mg/ml در تیمار ۲٪ آنزیم آلکالاز

Figure 3- The Percentage of changes of inhibition of DPPH free radical from peptide components with a concentration of 1.25 mg/ml in the treatment of 2% alcalase enzyme

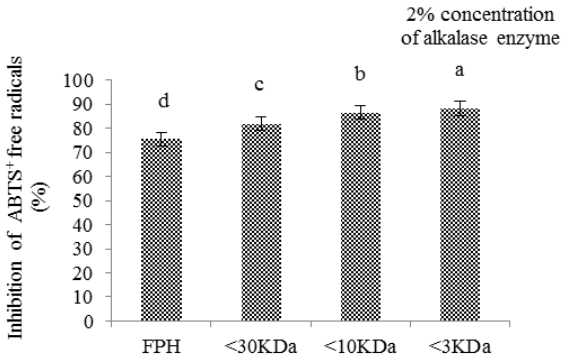


شکل ۴- مهار رادیکال آزاد DPPH آسکوربیک اسید

Figure 4- The activity of inhibition of DPPH free radical from ascorbic acid

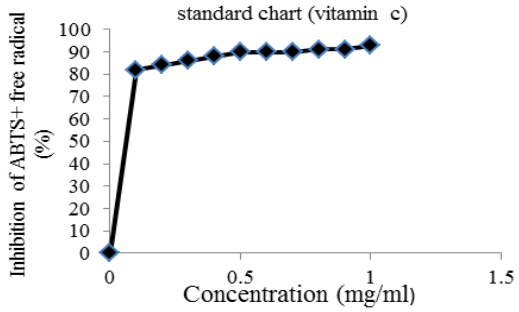
نتایج مقایسه قدرت حذف کنندگی رادیکال $ABTS^+$ در اجزای پپتیدی در تیمار ۲٪ آنزیم آلکالاز

نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده و همه اجزای پپتیدی (<۳۰KDa، <۱۰KDa و <۳KDa) از قدرت حذف کنندگی رادیکال $ABTS^+$ برخوردار بودند اما در مقایسه اجزاء پپتیدی با غلظت برابر (۱/۲۵ mg/ml)، جزء پپتیدی <۳ کیلودالتون، خاصیت مهار $ABTS^+$ بالاتری (۸۸/۰±۲۵/۰۵) را نسبت به سایر فراکسیون‌ها نشان داد که تفاوت بین اجزاء معنی دار بود ($p<0.05$). جهت مقایسه از آسکوربیک اسید به عنوان ضداکسیدان متداول استفاده شد (غلظت‌های ۱-۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر) و فعالیت ضداکسیدانی آن در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۹۲/۷۹٪ به دست آمد (Fig7). سنجش فعالیت مهار رادیکال $ABTS^+$ به عنوان شاخص ضداکسیدانی استفاده شد (سنفان و بنجاکول ۲۰۱٤). مونوکاسیون رادیکال از پیش ساخته شده $ABTS^+$ توسط اکسیداسیون $ABTS^+$ با پتاسیم پرسولفات تولید می-شود و در حضور ضداکسیدان‌های اهداکننده هیدروژن و ضداکسیدان‌های شکننده زنجیره کاهش می‌یابد (کلومکلا و همکاران ۲۰۱۸). توانایی پپتیدها برای مهار رادیکال $ABTS^+$ منعکس کننده ظرفیت آن‌ها برای اهدای الکترون یا اتم هیدروژن برای غیرفعال کردن این گونه رادیکال است (رمضان‌زاده و همکاران ۲۰۱۸). با توجه به نتایج، فرآیند الترافیلتراسیون بر فعالیت مهار رادیکال $ABTS^+$ اثرگذار بوده و این فعالیت را افزایش می‌دهد و همچنین علت مهارکنندگی بالاتر در وزن مولکولی پایین، باقی‌مانده اسیدآمینه‌های آبگریز و ترکیبات آروماتیک خاص هستند که مهار اکسیداسیون پپتیدها را افزایش می‌دهند (جو و همکاران ۲۰۲۱). نتایج حذف رادیکال $ABTS^+$ با نتایج وانگ و همکاران (۲۰۱۲) مطابقت دارد که در این بررسی گزارش شد پروتئین هیدرولیز شده ماهیچه *Sphyrna lewini* از این خاصیت برخوردار است. همچنین نتایج خاصیت ضداکسیدانی $ABTS^+$ با نتایج ما و همکاران (۲۰۱۰) و مارتیسیاک زوروسکا و ونتا (۲۰۱۲) مطابقت دارد.



شکل۵- درصد تغییرات مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$ در اجزای پپتیدی با غلظت ۱/۲۵ mg/ml در تیمار ۲٪ آنزیم آلکالاز

Figure 5- The percentage of changes of scavenging power of $ABTS^+$ free radical from peptide components with a concentration of 1.25 mg/ml in the treatment of 2% alcalase enzyme



شکل ۶- فعالیت مهار رادیکال آزاد $ABTS^+$ آسکوربیک اسید

Figure 6- The activity of inhibition of $ABTS^+$ free radical from ascorbic acid

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد، که دورریز آبزیان با ارزش تجاری پایین، منبع غنی از پپتیدهایی حاصله از پروتئین هیدرولیز شده هستند که با داشتن قابلیت مهار رادیکال‌های آزاد از خاصیت ضداکسیدانی برخوردار می‌باشند. با توجه به نتایج تحقیق مشخص گردید که با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز درجه هیدرولیز و خاصیت ضداکسیدانی FPH افزایش یافته است و همچنین فرآیند اولترافیلتراسیون تاثیر بسزایی در خصوصیات زیست فعالی داشته است بطوریکه پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از خصوصیت ضداکسیدانی بالاتری نسبت به سایر فراکسیون‌ها برخوردار بود. لازم به ذکر است که پپتیدهای استحصالی، به عنوان یک افزودنی با خاصیت دارویی در مواد غذایی و دارویی قابل استفاده هستند.

منابع مورد استفاده

سلیمانی م، سید فخرالدین حسینی ف و نیکخواه م، ۱۳۹۵. ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*). علوم و فنون شیلات، ۳(۲): ۹۵-۱۰۸.

میرصادقی ح، عالیشاهی ع، صالحیان م و صفری ر، ۱۳۹٤. اثر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhyncus mykiss*) روی محیط کشت باکتری. بهره برداری و پرورش آبزیان، ۲(٤): ۹۳-۱۰۹.

مهدابی م، شمسایی مهرجان م و رجبی اسلامی ه، ۱٤۰۰. مقایسه ترکیب تقریبی و پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین های هیدرولیز شده گوشت، آرد و پساب کارخانه آرد ماهی (استیک واتر) ماهی کیلکای آنچووی. مجله علمی شیلات ایران، ۳۰ (٦): ٤۳-٦۱.

مهرگان نیکو، ع ر، صادقی ماهونک ع ر، قربانی م، طاهری ع، اعلمی م و کمالی ف، ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضداکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس (*Carassius carassius*). نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۲(٤): ۳۵۱-۳٦٤.

نعمتی م، جوادیان ر و کشاورز م، ۱۳۹۸. تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) با استفاده از آنزیم آلکالاز. نشریه علمی زیست شناسی، ۱۱(٤۳): ۸۷-۹۵.

یاری م، حسینی م، کدیور م، ۱٤۰۱. بررسی ویژگی‌های عملکردی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز پروتئین آرد گندم سالم توسط پروتئاز موجود در گندم سن زده. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۳۲(٤): ۷۵-۸۵.

AOAC, 2005. Official Method of Analysis (17thed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.

Bordbar S, Ebrahimpour A, Zarei M, Abdul Hamid A and Saari N, 2018. Alcalase-generated proteolysates of stone fish (*Actinopyga lecanora*) flesh as a new source of antioxidant peptides. International Journal of Food Properties 21(1): 1541-1559.

Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R and Jyothirmayi T, 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. Journal of Food Chemistry 135(4): 3020−3038.

Fang B, Sun J, Dong P, Xue C and Mao X, 2017. Conversion of turbot skin wastes into valuable functional substances with an eco-friendly fermentation technology. Journal of Cleaner Production. Journal of Food Chemistry (156): 367–377.

García-Moreno PJ, Batista I, Pires C, Bandarra NM, Espejo-Carpio FJ, Guadix A and Guadix EM, 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. Food Research International (65): 469-476.

Guillén G, López Caballero ME, Alemán A, Lacey AL, Giménez B, Montero García P, 2010. Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin, Transworld Research Network 661(2): 89-115.

Gao R, Shu W, Shen Y, Sun Q, Jin W, Li D, Li and Yuan L, 2021. Peptide fraction from Sturgeon muscle by pepsin hydrolysis exerts anti-inflammatory effects in LPS-stimulated RAW264. 7 macrophages via MAPK and NF-κB pathways. Food Science and Human Wellness 1; 10(1): 103-111.

He S, Franco C and Zhang W, 2013. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). Food Research International 50(1): 289-297.

Hardy RW, 1991. Pacific Salmon. Oncorhynchus spp. In:Wilson, R.P.(ed) Handbook of Nutrient Requirement of Finfish. CRC Press. Boka Ration 105-121 pp.

Harnedy PA and FitzGerald RJ, 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods 4(1): 6–24.

Jun SY, Park PJ, Jung K and Kim K, 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology 219 (1): 20-26.

Jang HL, Shin SR and Yoon KY, 2017. Hydrolysis conditions for antioxidant peptides derived from enzymatic hydrolysates of sandfish (*Arctoscopus japonicus*). Food Science and Biotechnology 26(5): 1191-1197.

Kristinsson HG and Rasco BA, 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40(1): 43-81.

Klomklao S and Benjakul S, 2018. Protein hydrolysates prepared from the viscera of skipjack tuna (*Katsuwonus pelmamis*): antioxidative activity and functional properties, Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 18(1): 69-79.

Lowry OH, Rosebrough NJ., Farr, AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistryn 193(1): 265- 275.

Li Y, Jiang B, Zhang T, Mu W and Liu J, 2008. Antioxidant and free radicalscavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). Food Chemistry 106 (2): 444-450.

Mosquera M, Giménez B, Ramos S, López-Caballero ME, del Carmen Gómez-Guillén M and Monter P, 2014. Antioxidant, ACE-inhibitory and antimicrobial activities of peptide fractions obtained from dried giant squid tunics. Journal of Aquatic Food Product Technology 10 (80): 444-455.

Ma Y, Xiong YL, Zhai J, Zhu H and Dziubla T, 2010. Fractionation and evaluation of radical scavenging peptides from in vitro digests of buckwheat protein. Food Chemistry 118(3): 582–588.

Martysiak-Zurowska D and Wenta W, 2012. A Comparison of ABTS and DPPH Methods for Assessing the Total Antioxidant Capacity of Human Milk. Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria 11(1): 83-89.

Nazeer RA and Anila Kulandai K, 2012. Evaluation of antioxidant activity of muscle and skin protein hydrolysates from giant kingfish, Caranx ignobilis (Forsskål, 1775). International Journal of Food Science and Technology 47(2): 274-281.

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

Ryan JT, Ross RP, Bolton D, Fitzgerald GF and Stanton C, 2011. Bioactive Peptides from Muscle Sources: Meat and Fish Nutrients 3(9): 765-791.

Ramezanzade L, Hosseini SF, Nikkhah M and Arab-Tehrany E, 2018. Recovery of bioactive peptide fractions from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) processing waste hydrolysate. Ecopersia 6(1): 31-40.

Sheriff SA, Sundaram B, Ramamoorthy B and Ponnusamy P, 2014. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of Rastrelliger kanagurta by proteolytic enzymes. Saudi Journal of Biological Sciences 21(1): 19-26.

Senphan T and Benjakul S, 2014. Antioxidative activities of hydrolysates from seabass skin prepared using protease from hepatopancreas of Pacific white shrimp. Journal of Functional Foods (6): 147-56.

Vioque J, Clemente A, Pedroche J, Yust MM and Millgn F, 2001. Obtencion yaplicaciones de hidrolizados proteicos. Journal of Grasas Aceites 52 (1): 132-136.

Wang B, Li ZR, Chi CF, Zhang QH and Luo HY, 2012. Preparation and evaluation of antioxidant peptides from ethanol-soluble proteins hydrolysate of Sphyrna lewini muscle. Peptides 36(2): 240–250.

Wang B, Li L, Chi CF, Ma JH, Luo HY and Xu YF, 2013. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food Chemistry 138 (2-3):1709-1713.

Xie Z, Huang J, Xu X and Jin Z, 2008. Antioxidant activity of peptides isolated from alfalfa leaf protein hydrolysate. Journal of Food Chemistry 111(2): 370-376.

You L, Zhao M, Regenstein JM and Ren J, 2010. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization- mass spectrometry. Food Research International 43(4): 1167-1173.

Zhong S, Ma C, Lin YC and Luo Y, 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. Food Chemistry 126 (4): 1636-1642.

Journal of Food Research, 2023,33(2):31-41
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
OPEN ACCESS

© 2009 Copyright by Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran
This is an open access article under the CC BY NC license (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/)
DOI: 10.22034/FR.2023.53270.1848

The effect of ultrafiltration on the antioxidant properties of bioactive peptides from wastes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)

E Nami Khasmakhi[1], E Zakipour RahimAbadi[2*] and M Mehraban Sang Atash[3]

Received: September 7, 2022 Accepted: January 9, 2023
[1]PhD Student of Fish Products and Processing, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Guilan, Iran
[2]Associate professor. Fisheries Department, Faculty of Natural Resources, University of Guilan, Guilan, Iran
[3]Assistant Professor, Food Science and Technology Research Institute، ACECR Mashhad Branch, Mashhad, Iran

Introduction: The fishing industry is one of the most important factors affecting the economy of many countries in the world. By-products of aquaculture processing constitute a large part of fish (He et al., 2013). The use of waste from aquatic processing will not only increase the economic value of aquatic harvesting, but also by reducing the amount of aquatic processing waste, it will reduce pollution and economic costs related to the treatment of produced waste (Fang et al., 2017). The main of by-products of aquatic processing industries including skin, intestines and viscera and blood, which contain a good amount of protein that can be used as a source for bioactive peptides (Chalamaiah et al., 2012). Hydrolyzed protein usually contains small fragments of bioactive peptides that contain 2-20 amino acids (Ryan et al., 2011). The most important functions of these bioactive compounds, can mention the anti-oxidation, anti-microbial, anti-cancer and immune system boosting activities (Vioque et al., 2001). Fiches viscera are one of their most important wastes and are rich in unsaturated fatty acids and protein (Bhaskar et al., 2008). Since the production of bioactive peptides from fish waste and their bioactive properties including antioxidant properties have been done in other studies, in this research we are looking for the effect of the molecular weight of peptides on their antioxidant properties using ultrafiltration membranes.
Material and method: The viscera of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) were prepared from fresh rainbow trout from the salmon breeding farm in Mashhad and were transported to the laboratory with sufficient amounts of ice in the shortest time and it was kept at -20°C until use. Approximate analysis of the samples was determined according to the standard method of AOAC (2005). Production of hydrolyzed protein from viscera was done by the method of Ovissipour et al (2012). The amount of protein in the solution phase was measured by the method of Lowry et al (1951) and the degree of hydrolysis was estimated by the equation of Kristinsson and Rasco (2000). The antioxidant property of the hydrolyzed protein of treatments 1 and 2 was measured by examining of DPPH free radical inhibition and ABTS+ radical scavenging power indices. and according to the results, it was determined that treatment 2 (2% concentration of alkalase) has a higher antioxidant effect, therefore this treatment was divided by ultrafiltration membranes with

molecular weights (<30KDa, <10KDa and <3KDa) and treatment 1 was removed at this stage. After this step, the antioxidant property of peptide fractions in molecular weights (<30KDa, <10KDa and <3KDa) in the treatment of 2% alkalase was measured again by examining the DPPH and ABTS+ indices. Then, the antioxidant properties of peptide fractions in different molecular weights from treatment of 2% alkalase were again measured by the DPPH and ABTS+ indices.

Results and discussion: The results of approximate compositions showed that the highest compositions of viscera were moisture (60.817%), and fat (21.91%) and protein content (13.57%), followed by was the low amount of ash content (1.12%) and carbohydrates (2.17%). The chemical compounds of food play an important role in the body's health by providing essential nutrients. The ratio between waste compounds is varied according to the age and sex of fish. The amount of moisture from this evaluation was similar to the waste of rainbow trout 64.52% (Mirsadeghi 2015) and the amount of protein is similar to the waste of Zalon fish 13.00 (Nemati e al., 2019). The ash similar to common Kilka 1.46% (Soleymani et al., 2016) and the fat was 22.83% similar to Anchoy Kilka (Mehdabi et al., 2021). The degree of hydrolysis estimates the change of peptide content in a hydrolytic reaction. The degree of hydrolysis increased by increase of enzyme concentration in hydrolysis, so treatment 2 showed a significant increase (68.15±0.02%) compared to treatment 1 (53.60±0.22%) ($p<0.05$). The results of antioxidant property using DPPH and ABTS+ indicators on research treatments showed that treatment 2 (2% concentration of alkalase) had a higher antioxidant property than treatment 1. The results of the antioxidant property of the peptide components again using DPPH and ABTS+ indicators on the treatment of 2% alkalase enzyme concentration showed that the hydrolyzed protein and all peptide components (<30KDa, <10KDa and <3KDa) have the ability to DPPH and ABTS+ free radicals inhibition but in the comparison of peptide components with the same concentration (1.25 mg/ml), the peptide component <3KDa had a higher inhibitory property than other fractions, that the value in DPPH free radical inhibition was 76.55±0.01 and ABTS+ free radical inhibition was 88.25±0.05 and the difference between the peptide components was significant ($p<0.05$). It should be noted that free radical scavenging of DPPH and $ABTS^+$ had icreased by use of the ultrafiltration process. Also, short-chain peptides have higher antioxidant properties than long-chain peptides (Bordbar et al., 2018), the reason of this case is the number of hydrophobic amino acids in peptide components that affect the intensity of antioxidant activity (Guillén et al., 2010). The results of this study about the DPPH radical inhibition were similar to the results of Wang et al (2013), Jang et al. (2017) and Xi et al (2008). Also, the results of the antioxidant properties of $ABTS^+$ were consistent of the results of Ma et al (2010) and Martysiak-Zurowska and Venta (2012).

Conclusion: The results of this study showed that, firstly, the used of concentration of the enzyme and the degree of hydrolysis has an effect on antioxidant property of the hydrolyzed protein and secondly, the ultrafiltracin process had a different effect on the antioxidant properties of peptides, so that all peptide components had antioxidant properties but also the molecular weight has an effect on the bioactivity, so that peptides with low molecular weight has an stronger bioactivity properties.

Keywords: Alcalase, $ABTS^+$, Bioactive peptide, DPPH, hydrolyzed protein, *Oncorhynchus mykiss*, Ultrafiltration membranes