ارزیابی خواص ضد اکسایشی پپتیدهای حاصل از آبکافت آنزیمی ضایعات فراوری میگو با استفاده از آنزیم پروتامکس

سهیل ریحانی پول[1]، سکینه یگانه*[2]

[1]گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

[2]گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

*نویسنده مسئول s.yeganeh@sanru.ac.ir; skyeganeh@gmail.com

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۰

چکیده

با توجه به وجود نگرانی مصرف‌کنندگان در زمینه استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک در صنایع غذایی، توجه به موادی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی از جمله پروتئین‌های آبکافتی حاصل از ضایعات پروتئینی ضروری به‌نظر می‌رسد. این مطالعه به‌منظور بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات مراکز فراوری میگو (شامل پوسته، سر و ...) در سه زمان (درجه آبکافت) مختلف می‌باشد. به‌همین منظور ضایعات مراکز فراوری میگو با استفاده از آنزیم پروتامکس در سه زمان ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت و سه نوع پودر پروتئینی (SPH_1، SPH_2 و SPH_3) تولید شد. نتایج نشان داد با افزایش زمان فرایند آبکافت، درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی پروتئین‌ها به صورت معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). در بین سه نوع پروتئین تولیدشده بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل مربوط به SPH_1 بود (به ترتیب ۱/۶۵±۸۵/۴۱، ۲/۳۸±۹۰/۲۲ و ۲/۹۵±۸۸/۲۱ درصد). همچنین بالاترین میزان فعالیت کلاته‌کنندگی (۱/۳۲±۸۱/۵۷ درصد) و پائین‌ترین قدرت کاهندگی (جذب ۰/۰۲۴±۰/۴۳۱ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) در SPH_3 ثبت شد ($P<0/05$). با تغییر زمان آبکافت (درجه آبکافت)، تغییری در فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید پروتئین‌ها ثبت نشد و هر سه پروتئین مقادیر تقریباً یکسانی از این شاخص ارائه کردند ($P>0/05$). براساس نتایج، پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات مراکز فراوری میگو به روش آنزیمی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی دارند. زمان فرایند آبکافت از طریق اثری که بر درجه آبکافت پروتئین‌ها اعمال می‌کند، یکی از مهم‌ترین فاکتورها در بروز خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی محسوب می‌شود.

واژگان کلیدی: ضایعات میگو، پروتامکس، پروتئین‌های آبکافتی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی.

مقدمه

با افزایش نگرانی‌ها پیرامون استفاده از آنتی‌اکسیدان های سنتتیک در صنعت غذا، استفاده از ظرفیت موادی حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی ضروری به نظر می‌رسد. آسکوربیک‌اسید (Min and Krochta, 2007; Ghajaghi *et al*., 2015)، اسانس‌های برخی از گیاهان مانند آویشن (Kostaki *et a*l., 2009) و مرزنجوش (جدی و همکاران، ۱۳۹۸)، پروتئین‌های آبکافتی (Elavarasan *et a*l., 2007) و ... برخی از این مواد هستند. پروتئین‌های آبکافتی حاصل آبکافت مواد پروتئینی (معمولاً ضایعات حاوی پروتئین) با استفاده از آنزیم‌های تجاری هستند. حد خواص کارکردی (حلالیت، شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی، شاخص ظرفیت کف‌زایی و پایداری کف، ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب) و آنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌ها، کارائی آن‌ها را در صنایع غذایی تعیین می‌کند.

عوامل متعددی می‌توانند این خواص را در پروتئین‌های آبکافتی تحت تاثیر قرار دهند. یکی از این عوامل، نوع آنزیم مصرفی جهت انجام فرایند آبکافت است (Elavarasan *et al*., 2007؛ ریحانی‌پول و همکاران، ۱۳۹۷).

به‌منظور تولید پروتئین‌های آبکافتی از آنزیم‌های تجاری میکروبی (پروتامکس، فلاورزایم، نئوتراز و

آلکالاز)، گیاهی (پاپائین و بروملاین) و حیوانی (پپسین، تریپسین و کیموتریپسین) استفاده می‌شود. پروتئین‌های تولیدشده با هر کدام از این آنزیم‌ها می توانند خواص کارکردی و آنتی‌اکسیدانی مختلفی ارائه کنند (ریحانی‌پول و همکاران، ۱۳۹۷). عوامل دیگری که می‌توانند بر خواص پروتئین‌های آبکافتی موثر واقع گردند، مربوط به شرایط انجام واکنش آبکافت هستند. از جمله این عوامل می‌توان به دما، نسبت آنزیم به سوبسترا (شعبانپور و همکاران، ۱۳۹۴)، زمان (یگانه و همکاران، ۱۳۹۹) و ... اشاره کرد.

انتخاب منبع پروتئینی مناسب جهت انجام فرایند آبکافت بسیار حائز اهمیت است. این منابع تا حد امکان باید از ضایعات پروتئینی باشند تا هزینه تولید تجاری کاهش یابد. ضمن اینکه با استفاده از این تکنیک بتوان محصولی با ارزش افزوده بالا تولید کرد. تاکنون ضایعات مرغ و ماهی به کرات جهت تولید پروتئین‌های آبکافتی استفاده شده‌اند و مطالعات زیادی پیرامون این منابع صورت گرفته است (Elavarasan *et a*l., 2007; Ovissipour *et al*., 2009; Taheri *et al*., 2013; Fallah and Farmani, 2018). به‌دلیل سرانه مصرف پائین‌تر میگو در مقایسه با مرغ و ماهی (ریحانی‌پول و همکاران، ۱۳۹۸) و به دنبال آن تولید حجم کمتری از ضایعات، مطالعات محدودی پیرامون تولید پروتئین‌های آبکافتی از ضایعات میگو انجام گرفته است. امروزه با وجود مصرف محدود میگو در کشور و همچین صادرات حجم زیادی از این آبزی، مراکزی در شمال و جنوب کشور میگو را فراوری و بسته‌بندی می‌کنند. لذا حجم زیادی از ضایعات در این مراکز تولید می‌شود که استفاده بهینه از آن‌ها بسیار حائز اهمیت است. بنابراین این مطالعه قصد دارد تا با استفاده از آنزیم تجاری پروتامکس، ضایعات مراکز فراوری و بسته‌بندی میگو را در سه زمان آبکافت و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های حاصل را بررسی کند.

مواد و روش‌ها

سوبسترا و آنزیم: ضایعات میگو از یکی از کارگاه‌های فراوری و بسته‌بندی این آبزی در استان گلستان تهیه و در مجاورت زنجیره سرد پس از گذشت حدود سه ساعت به پایلوت فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. آنزیم مورد استفاده در تحقیق حاضر، آنزیم میکروبی پروتامکس (میزان فعالیت: ۱/۵ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم) است که از نمایندگی شرکت نووزایم دانمارک خریداری و تا شروع آزمایشات در دمای یخچال نگهداری شد.

تولید پروتئین آبکافتی: تولید پروتئین آبکافتی در سه زمان ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه انجام شد. به‌منظور تولید پروتئین آبکافتی، ابتدا در ارلن ۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه ضایعات قرار داده شد. سپس ۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷/۴ به ارلن اضافه گردید. در مرحله بعد ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت ضایعات غیرفعال شوند. پس از سپری‌شدن این زمان به ارلن‌ها اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شوند. در مرحله بعد آنزیم پروتامکس به میزان ۳۰ واحد آنسون به ارلن مربوطه اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (بهینه برای فعالیت آنزیم پروتامکس) منتقل و ۶۰ (۱۲۰ و ۱۸۰) دقیقه در این شرایط انکوبه شد تا فرایند آبکافت پروتئین‌ها انجام شود. به‌منظور قطع واکنش آبکافت، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. پس از این مدت و خنک‌شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (فریز درایر) خشک شد (Guerard *et al*., 2002; Ovissipour *et al*., 2009). نتیجه کار تولید سه نوع پروتئین مربوط به سه زمان متفاوت (SPH_1، SPH_2 و SPH_3) بود.

بررسی فرایند آبکافت

درجه آبکافت پودرهای تولیدشده در سه زمان

مختلف: برای محاسبه این شاخص، بعد از پایان فرایند آبکافت (زمان ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه)، محلول تری-کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد با نسبت برابر به مایع رویی (سوپرناتانت) افزوده شد و محلول حاصل با دور g۶۷۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ گردید. سپس نیتروژن موجود در سوپرناتانت جدید به روش بیورت (Layne, 1957) سنجیده شد. درجه آبکافت فرایند از رابطه زیر محاسبه گردید (Hoyle and Merritt, 1994).

۱۰۰ × (نیتروژن کل نمونه/ نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک‌اسید) = درجه آبکافت (٪)

برای رسم منحنی استاندارد و به دست‌آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومتر از سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

بازیافت نیتروژنی (پروتئینی): برای محاسبه بازیافت پروتئین از رابطه زیر استفاده گردید (Liaset *et al*., 2003).

۱۰۰×[(گرم سوبسترا×نیتروژن سوبسترا / گرم پروتئین×نیتروژن پروتئین)] = بازیافت نیتروژنی (٪)

ترکیب شیمیایی سوبسترا (ضایعات میگو) و پودرهای آبکافتی: میزان پروتئین، چربی، رطوبت و خاکستر در سوبسترا و پودرهای آبکافتی مطابق با روش استاندارد AOAC تعیین شد (AOAC, 1995).

آزمون‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و۲ دیفینیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH): ابتدا پروتئین آبکافتی تا غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب حل شد. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از پروتئین‌های محلول به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار رادیکال DPPH در اتانول ۹۹/۵۰ اضافه گردید. محلول حاصل با سرعت بالا هموژن شد و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه (کابینت) و متعاقب جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سرانجام قدرت پروتئین‌های آبکافتی برای مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد (Yen and Wu, 1999). برای مقایسه، از آنتی اکسیدان‌های سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT) و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA) در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

۱۰۰×(جذب شاهد / جذب نمونه)= قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (٪)

فعالیت کلاته‌کردن فلزات: ابتدا محلول ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی تهیه شد و یک میلی‌لیتر از آن به ۳/۷ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس به محلول حاضر ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ میلی‌مولار کلرید آهن و ۰/۲ میلی‌لیتر محلول ۵ میلی‌مولار فروزین اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت و فعالیت کلاته‌کردن از طریق رابطه زیر محاسبه گردید (Decker and Welch, 1990). برای ساخت شاهد، به جای نمونه پروتئینی از آب مقطر استفاده شد. جهت مقایسه، از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل-هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

۱۰۰× [جذب شاهد/ (جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر-۱)] = فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات (٪)

قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (فریک): ابتدا یک میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی با غلظت ۴۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH=۶/۶ و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ۱٪ وزنی-حجمی پتاسیم فریسیانید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه‌سانتی‌گراد انکوبه شد سپس با اضافه‌کردن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری-کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد، واکنش خاتمه یافت. در نهایت ۲/۵ میلی‌لیتر از این مخلوط با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی‌لیتر فریک‌کلرید ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. جذب بالاتر نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بالاتر پروتئین‌های آبکافتی است (Oyaiza, 1986). برای مقایسه، از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک

بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

فعالیت مهار رادیکال ۲،۲- آزینو- بیس- ۳- اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک‌اسید (ABTS): به‌منظور اندازه‌گیری این خاصیت در ابتدا محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. پس از سپری‌شدن این مدت، محلول تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (پروتئین با غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه زیر تعیین و بر حسب درصد گزارش شد (Alemán *et al*., 2011). جهت مقایسه، از آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی-تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

جذب نمونه شاهد/ [۱۰۰× (جذب نمونه– جذب نمونه شاهد)] = قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS (٪)

فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل: ابتدا ۲۰۰ میکرولیتر سولفات آهن آبدار (با غلظت ۱۰ میلی-مول)، ۲۰۰ میکرولیتر EDTA (با غلظت ۱۰ میلی-مول)، ۲۰۰ میکرولیتر دی‌اکسی‌ریبوز (با غلظت ۱۰ میلی‌مول)، ۲۰۰ میکرولیتر محلول پروتئین آبکافتی (با غلظت ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) و یک میلی‌لیتر محلول بافر فسفات ۰/۲ مولار (pH=۷/۴) مخلوط شدند. در مرحله بعد به این ترکیب، ۲۰۰ میکرولیتر H_2O_2 (با غلظت ۱۰ میلی‌مول) اضافه و مخلوط حاصل ۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوباتور قرار گرفت. پس از این زمان، یک میلی‌لیتر TCA ۲/۸ درصد و یک میلی‌لیتر TBA ۲۰ میلی‌مول به این مخلوط اضافه شد. این نمونه ۱۵ دقیقه در حمام آبی با دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و نهایتاً پس از سردشدن جذب آن در طول موج ۵۳۲ نانومتر قرائت گردید. نتایج به شکل درصد مهار رادیکال هیدروکسیل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد. لازم به ذکر است که در نمونه شاهد به جای پروتئین از آب مقطر استفاده شد (Chung and Kawakishi, 1997). به‌منظور مقایسه، از آنتی-اکسیدان‌های سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

۱۰۰× (جذب شاهد/جذب نمونه– ۱) = قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (٪)

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک اسید: ابتدا ۴۰۰ میلی‌گرم از پروتئین آبکافتی در ۱۰ میلی‌لیتر بافر فسفات ۵۰ میلی مول (pH=۷)، ۱/۳ میلی‌لیتر لینولئیک‌اسید و ۱۰ میلی‌لیتر اتانول ۹۹/۵ درصد حل شد. سپس حجم این محلول با آب مقطر به ۲۵ میلی-لیتر رسانده شد. این مخلوط در یک لوله آزمایش ۳۰ میلی‌لیتری ریخته (با درپوش پیچی) و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ روز انکوبه شد. شرایط اتاق تاریک با بسته‌بندی با فویل آلومینیوم و کاغذ ضخیم‌تر حفظ شد. درجه اکسیداسیون اسیدلینولئیک با استفاده از روش تیوسیانات فریک اندازه‌گیری شد (Mitsuda, 1966). به ۰/۱ میلی‌لیتر از مخلوط واکنش، ۴/۷ میلی‌لیتر اتانول ۰/۷۵، ۰/۱ میلی‌لیتر آمونیوم تیوسانات ۳۰ درصد و ۰/۱ میلی‌لیتر فروزکلرید ۲۰ میلی‌مول محلول در HCL (۳/۵ درصد) اضافه شد. پس از سه دقیقه جذب محلول در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. از بافر فسفات ۵۰ میلی‌مول (pH=۷) به عنوان شاهد استفاده شد. از رابطه زیر جهت محاسبه فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید استفاده گردید (Osawa and Namiki, 1985). به‌منظور مقایسه، از آنتی‌اکسیدان های سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل-هیدروکسی‌آنیزول در غلظت ۲۰۰ppm استفاده شد.

۱۰۰× (جذب شاهد/جذب نمونه) -۱ = فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید (٪)

تجزیه و تحلیل آماری: تحقیق حاضر در قالب طرح

جدول ۱- ترکیب شیمیایی سوبسترا و پروتئین‌های آبکافتی (٪).

سوبسترا و پروتئین‌های آبکافتی	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
سوبسترا (ضایعات میگو)	۱۴/۹۳±۰/۱۲	۸/۳۴±۱/۳۷	۵۸/۳۱±۰/۹۶	۱۷/۱۴±۱/۴۵
SPH_1	۷۹/۳۴±۱/۰۲^{b}	۰/۹۸±۰/۲۶^{a}	۳/۱۲±۰/۶۱^{a}	۱۵/۶۶±۲/۱۱^{a}
SPH_2	۷۹/۸۶±۱/۲۴^{b}	۱/۰۳±۰/۳۱^{a}	۳/۱۸±۰/۸۳^{a}	۱۵/۲۳±۱/۱۹^{a}
SPH_3	۸۵/۵۱±۱/۵۳^{a}	۰/۹۹±۰/۴۵^{a}	۳/۱۵±۰/۲۸^{a}	۹/۴۱±۰/۵۹^{b}

*حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دادها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی فرایند.

پروتئین‌های آبکافتی	درجه آبکافت (٪)	بازیافت نیتروژنی (٪)
SPH_1	۸/۹۲±۰/۶۵^{c}	۶۱/۳۴±۰/۱۲^{c}
SPH_2	۱۴/۵۱±۰/۹۳^{b}	۷۲/۴۴±۰/۱۵^{b}
SPH_3	۱۸/۱۱±۱/۴۶^{a}	۷۹/۵۱±۰/۲۶^{a}

*حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دادها می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

کاملاً تصادفی اجرا و به‌منظور آنالیز آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید. داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه آنالیز و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح اطمینان ۹۵ درصد ارزیابی شد.

نتایج

ترکیب شیمیایی سوبسترا (ضایعات میگو) و پروتئین‌های آبکافتی: در جدول ۱، ترکیب شیمیایی سوبسترا و پروتئین‌های آبکافتی حاصل از آن ارائه شده است. مطابق این جدول، سوبسترای مورد بررسی در تحقیق حاضر حدود ۱۵ درصد پروتئین دارد که با تکنیک آبکافت به پودرهایی تبدیل شد که بالای ۷۹ درصد پروتئین دارند. بیشترین ($P<۰/۰۵$) میزان پروتئین در SPH_3 اندازه‌گیری شد (۸۵/۵۱±۱/۵۳٪). SPH_1 و SPH_2 از این نظر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$).

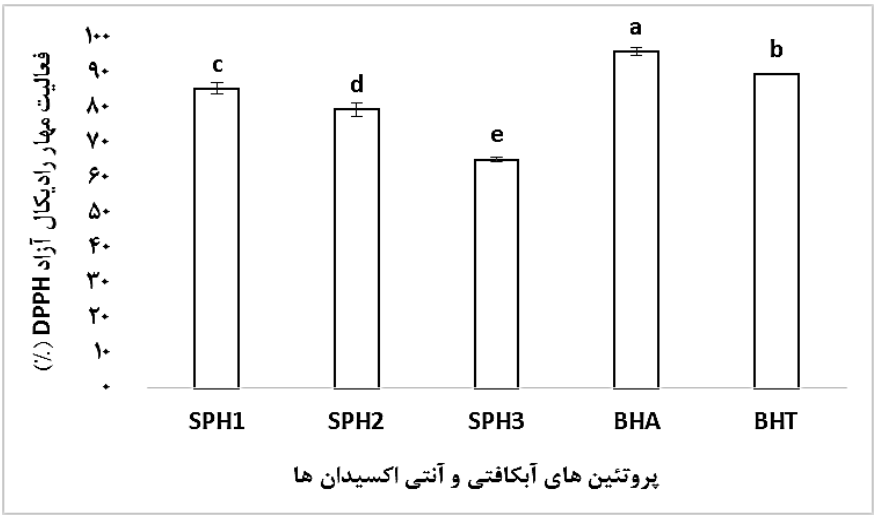
همچنین مقادیر چربی و رطوبت در هر سه پودر پروتئینی تقریباً یکسان گزارش شده است ($P>۰/۰۵$). کمترین ($P<۰/۰۵$) میزان خاکستر در SPH_3 (۹/۴۱±۰/۵۹٪) ثبت شد؛ ضمن اینکه SPH_1 و SPH_2 از نظر میزان خاکستر اختلاف معنی‌داری نداشتند ($P>۰/۰۵$).

درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی: جدول ۲ درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی فرایند را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج با افزایش زمان واکنش آبکافت از ۶۰ به ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه، درجه آبکافت نیز به صورت معنی داری افزایش یافته است ($P<۰/۰۵$). همین وضعیت در مورد بازیافت نیتروژنی نیز ثبت شده است. حداکثر درجه آبکافت و بازیافت نیتروژنی در تحقیق حاضر مربوط به SPH_3 می‌باشد (به ترتیب ۱۸/۱۱±۱/۴۶ و ۷۹/۵۱±۰/۲۶ درصد).

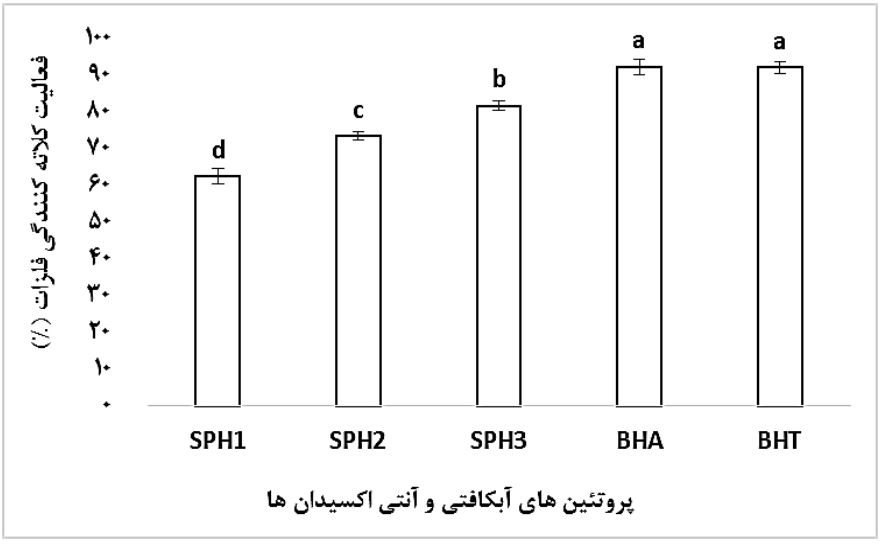
آزمون‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین های آبکافتی

فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH: شکل ۱ فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده طی سه زمان مختلف (اختلاف در درجات آبکافت) و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک را نشان می دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، هر سه پروتئین آبکافتی به صورت معنی‌داری از نظر شاخص آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی با هم اختلاف معنی‌داری دارند ($P<۰/۰۵$) و بیشترین میزان قدرت مهار (در بین سه نوع پروتئین) در SPH_1 (۸۵/۴۱±۱/۶۵٪) ثبت شد. همچنین با افزایش زمان آبکافت از ۶۰ به ۱۸۰ دقیقه (با افزایش درجه آبکافت)، روند این شاخص نزولی بود ($P<۰/۰۵$).

فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات: در شکل ۲، فعالیت



شکل ۱- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های آبکافتی (حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین دادها می‌باشد (P<۰/۰۵).

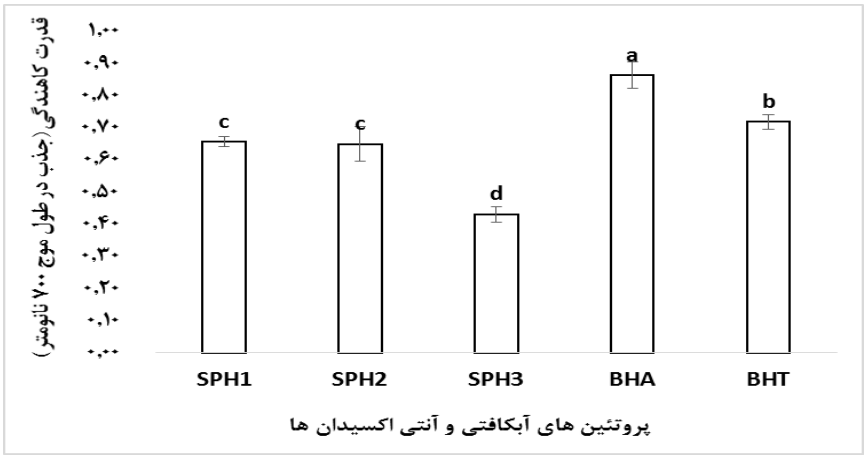


شکل ۲- فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات پروتئین‌های آبکافتی.

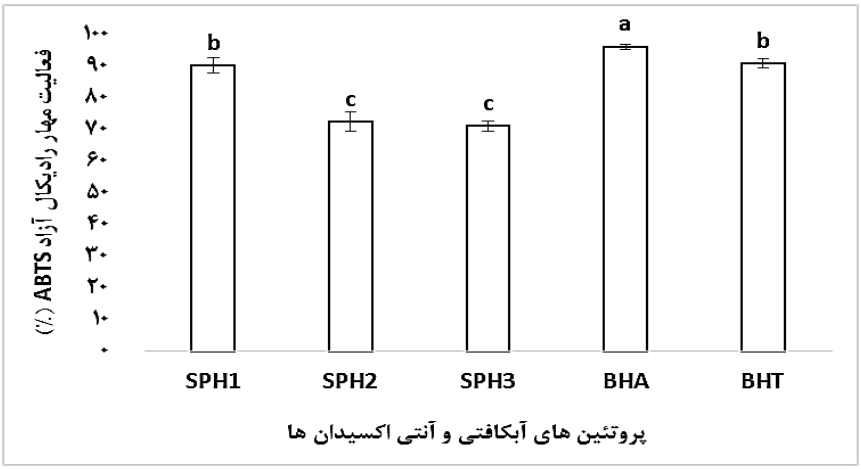
کلاته‌کنندگی پروتئین‌های آبکافتی و آنتی‌اکسیدان های سنتتیک ارائه شده است. براساس نتایج، در بین پروتئین‌های آبکافتی، بیشترین میزان فعالیت کلاته-کنندگی در SPH_3 (۱/۳۲٪±۸۱/۵۷٪) اندازه‌گیری شد (P<۰/۰۵). همچنین روند این شاخص با افزایش زمان آبکافت از یک به سه ساعت، صعودی می‌باشد (P<۰/۰۵).

قدرت کاهندگی یون فریک: شکل ۳ قدرت کاهندگی سه نوع پروتئین آبکافتی را نشان می‌دهد. مطابق شکل، با افزایش زمان فرایند از ۶۰ به ۱۲۰ دقیقه (با وجود افزایش معنی‌دار درجه آبکافت)، اختلاف معنی داری بین قدرت کاهندگی SPH_1 و SPH_2 وجود نداشت (P>۰/۰۵) و دو پروتئین تقریباً مقادیر یکسانی از شاخص مذکور را ارائه کردند. با افزایش زمان فرایند آبکافت از ۱۲۰ به ۱۸۰ دقیقه، قدرت کاهندگی پروتئین کاهش یافت و کمترین میزان این شاخص در SPH_3 (جذب ۰/۰۲۴±۰/۴۳۱ در طول موج ۷۰۰ نانومتر) ثبت شد (P<۰/۰۵).

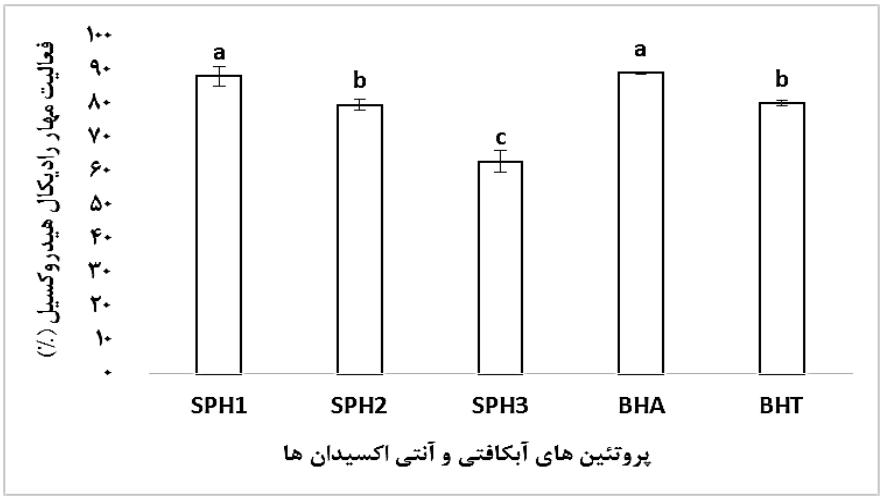
فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS: شکل ۴ فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS را در پروتئین‌های آبکافتی و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک نشان می‌دهد. مطابق نتایج به‌دست آمده با افزایش زمان فرایند و درجه



شکل ۳- قدرت کاهندگی پروتئین‌های آبکافتی.

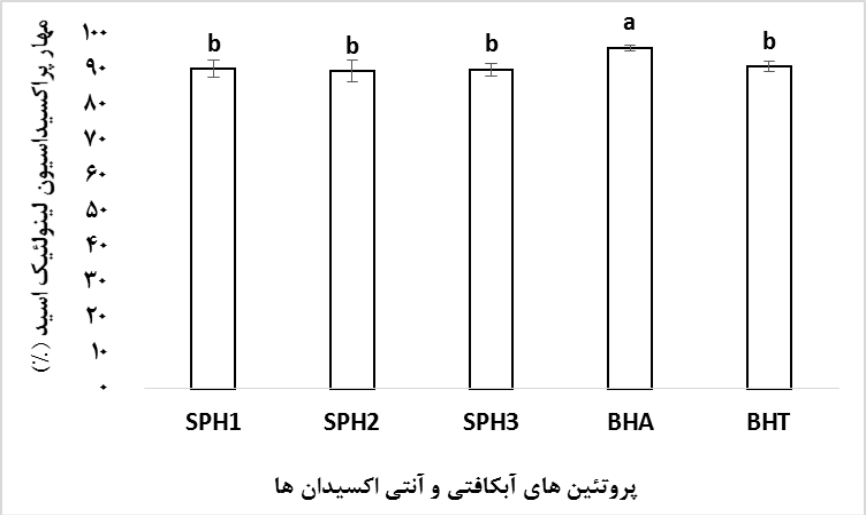


شکل ۴- فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS پروتئین‌های آبکافتی.



شکل ۵- فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین‌های آبکافتی.

آبکافت پروتئین‌ها، روند فعالیت مهار رادیکال آزاد آن ها کاهشی می‌باشد؛ گرچه اختلاف بین SPH_2 و SPH_3 معنی‌دار نیست ($P>0/05$). در بین سه پروتئین، بیشترین میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS مربوط به SPH_1 (۹۰/۲۲±۲/۳۸٪) بود که (این پروتئین) از این نظر اختلاف معنی‌داری با آنتی اکسیدان سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (۹۰/۸۴±۱/۳۵٪) ندارد ($P>0/05$).



شکل ۶- فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید پروتئین‌های آبکافتی.

فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل: با افزایش زمان فرایند و درجه آبکافت، فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین‌ها به صورت معنی‌دا ری کاهش یافته است. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، هر سه پروتئین از نظر شاخص میزان فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل اختلاف قابل ملاحظه‌ای دارند و بیشترین مقدار این شاخص در SPH_1 (۸۸/۲۱±۲/۹۵٪) اندازه‌گیری شد ($P<$۰/۰۵). این پروتئین از نظر شاخص مذکور اختلاف چندانی با آنتی‌اکسیدان سنتتیک بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول نداشت ($P>$۰/۰۵).

فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید: در شکل ۶ میزان فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک-اسید پروتئین‌های آبکافتی متفاوت از نظر درجه آبکافت و آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک ارائه شده است. با افزایش زمان فرایند آبکافت و به دنبال آن درجه آبکافت، تغییری در فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید پروتئین‌های آبکافتی ایجاد نشده است. در واقع SPH_1، SPH_2 و SPH_3 از نظر شاخص مذکور اختلاف معنی‌داری با یکدیگر (و همچنین بوتیل-هیدروکسی‌تولوئن) ندارند ($P>$۰/۰۵).

بحث

در تحقیق حاضر با افزایش زمان آبکافت، روند میزان پروتئین در پودرهای آبکافتی افزایشی بود؛ گرچه اختلاف بین SPH_1 و SPH_2 معنی‌دار نبود. احتمالاً با افزایش زمان آبکافت، آنزیم پروتئاز می‌تواند مقادیر بیشتری از پروتئین را از سوبسترای اولیه جداسازی کند؛ لذا میزان پروتئین در پودرها با افزایش زمان، افزایش می‌یابد. در مطالعه ریحانی پول و جعفرپور (۱۳۹۶) نیز رابطه خطی و مستقیم بین زمان فرایند آبکافت (درجه آبکافت) و میزان پروتئین در پودرهای آبکافتی ثبت شد. اما این یک قانون کلی نیست و در بسیاری از مطالعات اصلاً رابطه‌ای (مستقیم و عکس) بین زمان آبکافت (درجه آبکافت) و میزان پروتئین پودرهای آبکافتی گزارش نشده است (Souissi *et al.*, 2007; Pacheco-Aguilar *et al.*, 2008). در این تحقیق مانند سایر پژوهش‌ها (Souissi *et al.*, 2007؛ ریحانی‌پول و جعفرپور، ۱۳۹۶؛ یگانه و همکاران، ۱۳۹۹؛ احمدی و همکاران، ۱۳۹۹) با افزایش زمان آبکافت، درجه آبکافت فرایند روند افزایشی داشته است که امر بدیهی می‌باشد. با افزایش زمان، سطوح بیشتری از سوبسترا در معرض جایگاه فعال آنزیم پروتئازی قرار می‌گیرد و لذا مقدار بیشتری از پروتئین‌ها شکسته خواهند شد. با این توضیح، افزایش معنی‌دار بازیافت نیتروژنی با افزایش زمان فرایند آبکافت قابل توجیه است. به نظر می‌رسد با افزایش درجه آبکافت در هر پروتئین، بازیافت

نیتروژنی نیز افزایش (رابطه خطی) می‌یابد (Pacheco-Aguilar *et al*., 2008). لازم به ذکر است که ثبات روند صعودی درجه آبکافت با افزایش زمان فرایند آبکافت به عوامل مختلفی از جمله میزان (زمان بهینه فعالیت یا فعال‌بودن آنزیم) فعالیت آنزیم، قراگیری سوبسترای جدید در جایگاه فعال، شرایط واکنش (مانند دما و pH) و ... بستگی دارد. ممکن است پس از مدتی از فرایند آبکافت به دلیل عدم کارائی آنزیم (به دلیل شرایط فرایند آبکافت و یا ماهیت آنزیم) و یا عدم دسترسی آنزیم به سوبسترای تازه، روند صعودی به روند سکون تبدیل شود (Souissi *et al*., 2007).

در تحقیق حاضر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین های آبکافتی حاصل از ضایعات مراکز فراوری میگو که در سه زمان تولید شده و درجات آبکافت مختلفی داشتند، ارزیابی شد. جهت بررسی فعالیت آنتی-اکسیدانی این پروتئین‌ها از شش شاخص سنجش استفاده شد. شاخص اول که تقریباً رایج‌ترین شاخص ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی مواد مختلف است، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH بود. در تحقیق حاضر با افزایش زمان فرایند آبکافت، شاخص مذکور روند کاهشی داشت. در مطالعات Klompong و همکاران (۲۰۰۷)، ریحانی‌پول و جعفرپور (۱۳۹۶) و بخشان و همکاران (۱۳۹۳) نیز مانند پژوهش رو، کاهش فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش زمان فرایند آبکافت (درجه آبکافت) گزارش شد. برعکس نتایج تحقیق حاضر، در مطالعه احمدی و همکاران (۱۳۹۹) و یگانه و همکاران (۱۳۹۹) با افزایش زمان فرایند آبکافت، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) افزایش یافت. در تحقیق حاضر پروتئین‌های آبکافتی در طی سه زمان از ۶۵ تا ۸۶ درصد قابلیت مهار رادیکال آزاد DPPH داشتند که این مقادیر در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک (بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول) و پروتئین‌های تولیدشده در سایر مطالعات تقریباً مطلوب است. پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی کپور آب شیرین (*Catla catla*) با استفاده از آنزیم پروتامکس در همین غلظت دارای قدرت مهاری معادل ۶۷/۹±۰/۴۲ درصد بود که این میزان از قدرت مهار SPH_1 (تحقیق حاضر) کمتر است. پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم پروتامکس در غلظتی برابر، قدرت مهاری معادل ۷۳/۱۱±۱/۳۴ درصد داشت (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۷). شاخص دوم ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها در پژوهش پیش‌رو، فعالیت کلاته‌کردن فلزات بود. در تحقیق حاضر رابطه خطی بین زمان فرایند آبکافت (درجه آبکافت) و فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات پروتئین‌ها گزارش شد. تحقیقات Klompong و همکاران (۲۰۰۷) و ریحانی‌پول و جعفرپور (۱۳۹۶) نیز مانند تحقیق حاضر وجود رابطه مستقیم بین زمان فرایند آبکافت (درجه آبکافت) و فعالیت کلاته‌کنندگی فلزات پروتئین‌های آبکافتی را تائید کردند. اما نتیجه مطالعه بخشان و همکاران (۱۳۹۳) در این زمینه عکس یافته پژوهش حاضر است (وجود رابطه معکوس بین دو شاخص مذکور). قدرت کلاته‌کنندگی سه پروتئین تولیدشده در تحقیق حاضر از حدود ۶۲ تا ۸۲ درصد متغیر بود که نسبت به سایر مطالعات در سطح ایده‌الی قرار داشت. فعالیت کلاته‌کنندگی پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با استفاده از آنزیم پروتامکس (در غلظتی برابر با مطالعه حاضر) ۶۲/۹۹±۴/۲۶ درصد گزارش شد (ریحانی‌پول و همکاران، ۱۳۹۷) که این میزان از SPH_3 کمتر است. سومین شاخص مورد بررسی، قدرت کاهندگی یون فریک (آهن سه ظرفیتی) بود. بر خلاف یافته تحقیق پیش‌رو در این زمینه، در تحقیق طاهری و بیتا (۱۳۸۹) با افزایش درجه آبکافت (زمان)، قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی یال اسبی (*Trichiurus lepturus*)، افزایش یافت. در تحقیقی که فریم و سر ماهی کپور معمولی با

استفاده از نئوتراز آبکافت شد، رابطه مستقیم و یا عکس بین زمان فرایند آبکافت و قدرت کاهندگی پروتئین‌ها ثبت نشد و سه پروتئین تولیدشده در سه زمان مختلف (با وجود اختلاف در درجه آبکافت)، از نظر قدرت کاهندگی اختلاف معنی‌داری ارائه نکردند (ریحانی‌پول و جعفرپور، ۱۳۹۶). پژوهشی که اثر درجه آبکافت بر قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی تولیدشده از ماهی تراولی نوار زرد (*Selaroides leptolepis*) با استفاده از آلکالاز و فلاورزایم را مورد ارزیابی قرار داد گزارش کرد که با افزایش درجه آبکافت، قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی تولیدشده با آلکالاز روند کاهشی دارد اما چنین وضعیتی برای پروتئین آبکافتی تولیدشده با فلاورزایم ثبت نشد (Klompong *et al*., 2007).

پروتئینی که از آبکافت ماهی کپور آب شیرین با استفاده از آنزیم پروتامکس تولید شد، در غلظتی برابر، دارای قدرت کاهندگی حدود جذب ۰/۶ در طول موج ۷۰۰ نانومتر بود (Elavarasan *et al*., 2007). قدرت کاهندگی پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ماهی تراولی نوار زرد با استفاده از آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در سه درجه آبکافت (در غلظتی برابر) از حدود جذب ۰/۴ تا ۰/۶ در طول موج ۷۰۰ نانومتر متغیر بود (Klompong *et al*., 2007). در تحقیقی که فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از استخوان ماهی و مرغ با استفاده از آنزیم‌های فلاورزایم، کیموتریپسین و تریپسین بررسی شد، قدرت کاهندگی شش نوع پروتئین تولیدشده بین جذب ۰/۱ تا ۰/۲ در طول موج ۷۰۰ نانومتر متغیر بود (Centenaro *et al*., 2011). مقایسه مقادیر ذکرشده برای قدرت کاهندگی پروتئین‌ها در سه تحقیق مذکور و پژوهش حاضر نشان می‌دهد ضایعات مراکز فراوری میگو منبع مناسبی جهت استخراج ترکیباتی با فعالیت ایده‌آل آنتی‌اکسیدانی هستند.

یکی دیگر از شاخص‌های سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌ها در تحقیق حاضر، فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS بود. در پژوهش پیش‌رو، رابطه معکوس بین زمان فرایند آبکافت (درجه آبکافت) و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS برقرار بود. برخلاف این نتیجه، در تحقیقی که سر ماهی کپور معمولی با استفاده از آلکالاز در زمان‌های مختلف آبکافت شد، رابطه مستقیمی بین زمان فرایند آبکافت و فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS گزارش گردید (یگانه و همکاران، ۱۳۹۹). در پژوهشی که اثر زمان فرایند آبکافت بر فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS پروتئین آبکافتی تولیدشده از احشای ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت، روند افزایشی این شاخص با افزایش زمان فرایند ثبت شد (احمدی و همکاران، ۱۳۹۹) که مغایر با نتیجه تحقیق حاضر می‌باشد.

مقادیر ارائه‌شده برای قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS سه پروتئین تحقیق حاضر در مقایسه با آنتی اکسیدان‌های سنتتیک (بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول) و پروتئین‌های تولیدشده در سایر تحقیقات در سطح بسیار مطلوبی قرار دارند. قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS پروتئین آبکافتی تولیدشده از سر ماهی کپور معمولی با استفاده از آلکالاز در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر و زمان سه ساعت معادل ۰/۹۹±۲۳/۱۵ درصد بود (یگانه و همکاران، ۱۳۹۹) که در مقایسه با SPH_3 (۱/۶۹±۷۱/۰۵ درصد) بسیار کمتر است.

پنجمین شاخص ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی که در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفت، شاخص فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل بود. روند این شاخص (مانند شاخص فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH) با افزایش زمان فرایند آبکافت، کاهشی بود. مطابق نتایج این تحقیق، فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل سه پروتئین تولیدشده از ۶۲ تا ۸۹ درصد متغیر می‌باشد.

این میزان از فعالیت مهار برای یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در مقایسه با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک بسیار مطلوب است. فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل در SPH_1 و بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (آنتی‌اکسیدان سنتتیک) اختلاف معنی‌داری ندارند

($P>۰/۰۵$). این وضعیت بین SPH_2 و بوتیل-هیدروکسی‌تولوئن نیز ثبت شده است. این موارد به خاصیت آنتی‌اکسیدانی ایده‌آل پروتئین‌های تولیدشده در تحقیق حاضر اشاره دارد. فعالیت مهار رادیکال هیدروکسیل در پروتئین تولیدشده از استخوان ماهی و مرغ با استفاده از آنزیم فلاورزایم به ترتیب معادل ۲۸/۱ و ۱۲/۸ درصد گزارش شد (Centenaro, 2011) که در مقایسه با SPH_1، SPH_2 و SPH_3 در سطوح بسیار پائین‌تری قرار دارند.

شاخص بعدی مورد استفاده جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های تولیدشده در تحقیق حاضر، فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید بود. برخلاف پنج شاخص دیگر، این شاخص با افزایش زمان فرایند آبکافت تغییر معنی‌داری نکرد. این سه پروتئین بیش از ۸۹ درصد قابلیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید را دارا بودند که این سطح از مهار برای یک آنتی‌اکسیدان طبیعی بسیار مطلوب است. فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک-اسید سه پروتئین تولیدشده در تحقیق پیش‌رو نسبت به این قابلیت در پروتئین‌های تولیدشده در سایر پژوهش‌ها در سطح ایده‌آلی قرار دارد. فعالیت مهار پراکسیداسیون لینولئیک‌اسید پروتئینی که از آبکافت ماهی کپور آب شیرین (در غلظتی برابر با تحقیق حاضر) با استفاده از پروتامکس تولیدشده بود، معادل ۳۶ درصد گزارش شد (Elavarasan *et al*., 2007). این میزان نسبت به قابلیت مهار SPH_1، SPH_2 و SPH_3 در سطح بسیار پائینی قرار دارد. مطابق نتایج شش آزمون سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، با افزایش زمان فرایند، تغییراتی در میزان خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها ثبت شد. از آنجا که با افزایش زمان فرایند آبکافت در یک پروتئین، اولین، مهم‌ترین و اثرگذارترین شاخصی که تغییر می‌کند، درجه آبکافت است، لذا روند افزایشی و یا کاهشی شاخص‌های سنجش با تغییر زمان را می‌توان به درجه آبکافت پروتئین‌ها نسبت داد. در پروتئین‌های تولیدشده از یک منبع با درجات مختلف آبکافت، ترکیب و توالی اسیدهای آمینه می‌تواند متفاوت باشد. همین موضوع به شدت خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی را تحت تاثیر می‌دهد (Chen *et al*., 1998, Kim *et al*., 2003, Wu *et al*., 2003). نتیجه بعدی که با تغییر زمان آبکافت و به دنبال آن تغییر درجه آبکافت حاصل می‌شود، تغییر اندازه پپتیدها است. با افزایش درجه آبکافت، غلظت پپتیدهایی با سایز کوتاه‌تر (وزن مولکولی کمتر) بیشتر می‌شود. سایز پپتیدها (وزن مولکولی پپتیدها) عامل دیگری است که طبق گزارشات بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها موثر می‌باشد (Jun *et al*., 2004, Je *et al*., 2007, Ren *et al*., 2008, Bougatef *et al*., 2010). نتیجه احتمالی دیگر افزایش زمان آبکافت، افزایش تجزیه گروه‌هایی است که واکنش بین پپتیدها و رادیکال‌های آزاد را تسهیل و تسریع می‌کنند. لذا این مورد نیز می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های تولیدشده از یک منبع در زمان‌های مختلف (درجات آبکافت متفاوت) را تحت تاثیر قرار دهد (بخشان و همکاران، ۱۳۹۳).

نتیجه‌گیری

پروتئین‌های حاصل از آبکافت ضایعات مراکز فراوری و بسته‌بندی میگو با استفاده از آنزیم‌های تجاری، در مقایسه با سایر منابع پروتئینی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی از خود بروز می‌دهند. زمان فرایند آبکافت به‌واسطه اثری که بر درجه آبکافت پروتئین‌های آبکافتی دارد، یکی از مهم‌ترین مولفه‌ها در تعیین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها محسوب می-شود. مطابق یافته‌ها می‌توان ادعا کرد، اثر فاکتور زمان یا درجه آبکافت بر شاخص‌های مختلف ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌تواند متفاوت باشد. برای مثال ممکن است با افزایش زمان (درجه آبکافت)، فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH کاهش یابد، اما قدرت کلاته‌کنندگی روند صعودی در پیش گیرد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش با حمایت مالی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری تحت قرارداد با شماره ۰۲-۱۴۰۰-۰۳ انجام شد که به این وسیله سپاسگزاری می‌شود.

منابع

احمدی ح.، یگانه س.، اسمعیلی خاریکی م. ۱۳۹۹. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). نشریه شیلات، ۷۳(۴): ۶۰۶-۵۹۳.

بخشان ع.، علیزاده دوغیکلایی ا.، طاهری ع. ۱۳۹۳. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی بدست آمده از ضایعات، در فرایند فیله‌کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای، ۱۱(۱): ۱۱۵۲-۱۱۴۳.

جدی س.، یگانه س.، جعفرپور ع.، ناصری م. ۱۳۹۸. تاثیر پوشش نگهدارنده خوراکی کیتوزان حاوی اسانس مرزنجوش (*Origanum vulgare L*) بر ماندگاری ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در یخچال. نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۱۱(۱): ۳۸-۲۳.

ریحانی پول س.، جعفرپور ع. ۱۳۹۶. اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و صنایع غذایی ایران، ۶۸(۱۴): ۱۲۴-۱۱۳.

ریحانی پول س.، جعفرپور ع.، صفری ر. ۱۳۹۷. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص عملکردی و آنتی-اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۴(۱): ۱۷۶-۱۶۲.

ریحانی پول س.، عالیشاهی ع.، عادلی ا.، نرگسیان ع.، اجاق م. ۱۳۹۸. مطالعه رفتار، اولویت‌ها و موانع مصرف میگو در کشور. مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۶): ۴۶-۳۵.

شعبانپور ب.، کردجزی م. نظری خ. ۱۳۹۴. بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین ضایعات سر سینه میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) با استفاده از روش پاسخ سطح. بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۴(۳): ۵۰-۲۹.

طاهری ع.، بیتا س. ۱۳۸۹. خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده احشای ماهی یال اسبی (*Trichiurus lepturus*) تولید شده با آنزیم پروتامکس. طرح پژوهشی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به شماره ۴۸/۱۶۳۲.

یگانه س.، اسماعیلی م.، احمدی ح. ۱۳۹۹. تاثیر زمان آبکافت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۹(۶): ۴۲-۲۹.

AOAC W.H. 2005. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. *Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA*.

Alemán A., Pérez-Santín E., Bordenave-Juchereau S., Arnaudin I., Gómez-Guillén M.C., Montero P. 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International* 44(4), 1044-1051.

Bougatef A., Nedjar-Arroume N., Manni L., Ravallec R., Barkia A., Guillochon D., Nasri M. 2010. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry* 118(3), 559-565.

Chung S.K., Osawa T., Kawakishi S. 1997. Hydroxyl radical scavenging effects of spices and scavengers from Brown Mustard (*Brassica nigra*). *Journal of Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 61, 118-123.

Chen H. M., Muramoto K., Yamauchi F., Fujimoto K., Nokihara K. 1998. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 46(1), 49-53.

Centenaro G.S., Centenaro M.S., Hernandez C.P. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Advance Journal of Food Science and Technology* 3(4), 280-288

Decker E. A., Welch B. 1990. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 38(3), 674-677.

Elavarasan K., Naveen Kumar V., Shamasundar B.A. 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.

Fallah-Delavar M., Farmani J. 2018. Recovery and Characterization of Enzymatic Protein Hydrolyzates and Fat from Chicken Skin. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 95(9), 1151-1161.

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

Hoyle N.T., Merritt J.O.H.N. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59(1), 76-79.

Jun S.Y., Park P.J., Jung W.K., Kim S.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.

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

Kim S.K., Kim Y.T., Byun H.G., Nam K.S., Joo D.S., Shahidi F. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptides from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(4), 1984-1989.

Klompong V., Benjakul S., Kantachote D., 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.

Kostaki M., Giatrakou V., Savvaidis I. N., Kontominas M. G. 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology* 26(5), 475-482.

Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology* 3, 447-454.

Liaset B., Julshamn K., Espe M. 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymic hydrolysis of salmon frames with Protamex™. *Process Biochemistry* 38(12), 1747-1759.

Mitsuda H. 1966. Antioxidative action of indole compounds during the autoxidation of linoleic acid. *Eiyo to Shokuryo* 19, 210-221.

Min S., Krochta J.M. 2007. Ascorbic acid-containing whey protein film coatings for control of oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55(8), 2964-2969.

Osawa T., Namiki M. 1985. Natural antioxidants isolated from Eucalyptus leaf waxes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 33(5), 777-780.

Oyaiza M. 1986. Studies on products of browning reaction: Antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Journal of nutrition*. 44, 307–315.

Ovissipour M., Abedian A., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry* 115(1), 238-242.

Ren J., Zhao M., Shi J., Wang J., Jiang Y., Cui C., Xue S.J. 2008. Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* 108(2), 727-736.

Souissi N., Bougatef A., Triki-Ellouz Y., Nasri M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* 45(2), 187-194.

Taheri A., Anvar S.A.A., Ahari H., Fogliano V. 2013. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 12(1), 154-169.

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

Yen G.C., Wu J.Y. 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. *Food Chemistry* 65(3), 375-37.

Evaluation of antioxidant properties of peptides from enzymatic hydrolysis of shrimp processing wastes using protamex enzyme

Soheyl Reyhani Poul[1], Sakineh Yeganeh[2*]

[1]Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
[2]Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
*Corresponding author: skyeganeh@gmail.com; s.yeganeh@sanru.ac.ir
Received: 2022/1/2 Accepted: 2022/3/1

Abstract

Given the concerns of consumers about the use of synthetic antioxidants in the food industry, it seems necessary to pay attention to substances containing natural antioxidants, including hydrolyzed proteins. The aim of the present study was to investigate the antioxidant activity of hydrolyzed proteins produced from shrimp processing centers wastes (including shell, head and …) at three different times. For this purpose, the wastes of shrimp processing centers were hydrolyzed using Protamex enzyme in three times of 60, 120 and 180 minutes and three types of protein powders were produced (SPH_1, SPH_2 and SPH_3). The results showed that with increasing the hydrolysis process time, the degree of hydrolysis (DH) and nitrogen (protein) recovery (PR) of proteins increased significantly (P<0.05). Among the three types of proteins produced, the highest level of scavenging activity DPPH and ABTS and hydroxyl free radicals was related to SPH_1 (85.41±1.65, 90.22±2.38 and 88.21±2.95%). Also, the highest amount of chelating activity (81.57±1.32%) and the lowest reducing power (absorption 0.431±0.024 at a wavelength of 700 nm) were recorded in SPH_3 (P<0.05). With the change of hydrolysis time (degree of hydrolysis), no change in the inhibition of linoleic acid peroxidation activity of proteins was recorded and all three proteins provided almost the same values of this index (P>0.05). Based on the results, hydrolyzed proteins produced from wastes of shrimp processing centers by enzymatic method have desirable antioxidant activity. The hydrolysis process time is one of the most effective factors in the antioxidant properties of hydrolyzed proteins due to its effect on the degree of hydrolysis of proteins.

Keywords: Shrimp wastes, Protamex, Hydrolyzed protein, Antioxidant activity.