نشریه شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۶۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۲
ص ۳۱۷-۲۹۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۳/۳۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۰/۳۰

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت حاصل از ماهیچه و احشای ماهی یال اسبی (*Trichiurus lepturus*) صیدشده از دریای عمان

❖ **علی طاهری*:** استادیارگروه شیلات، دانشکدهٔ علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، ایران

چکیده

در مطالعهٔ حاضر خواص آنتی‌اکسیدان پروتئین آبکافت تولیدشده با آنزیم پروتامکس از امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی بررسی شد و فاکتورهای زیر طی ۷ ساعت آبکافت آنزیمی سنجش شد. بیشترین میزان بازیافت نیتروژن امعا و احشا و گوشت به ترتیب ۶±۸۹٪ و ۸±۹۳٪ و بیشترین میزان درجهٔ آبکافت نیز به ترتیب به میزان ۳±۶۵٪ و ۷±۷۹٪ در ساعت هفتم دیده شد. در پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت بیشترین میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل به ترتیب ۶±۸۸٪ و ۹۰٪ در ساعت‌های آخر دیده شد که اختلاف معنی‌داری با ساعت‌های دیگر داشت ($P<0/05$). بیشترین میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر برای پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت به ترتیب ۰/۰۵±۰/۹۹ و ۰/۰۴±۰/۹۹ در ساعت هفتم آبکافت دیده شد. بیشترین میزان کلاته‌کنندگی پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت به ترتیب ۴±۸۰٪ و ۳±۸۸٪ بود. فعالیت جلوگیری از اکسایش لیپید در سیستم امولسیون روغن ماهی در آب تا ۷۲ ساعت پس از شروع واکنش حفظ شد ($P<0/05$). به غیر از فعالیت کلاته‌کنندگی، دیگر واکنش‌ها اختلاف معنی‌داری نسبت به شاهد نشان ندادند. بررسی اسیدهای آمینه نشان داد که گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید بیشترین میزان را داراست. در نتیجه می‌توان گفت آبکافت آنزیمی امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی منجر به تولید پپتیدهای با خواص آنتی‌اکسیدانی مطلوب می‌شود و این پروتئین‌های تولیدی قابلیت استفاده به‌منزلهٔ مکمل غذایی و دارویی را دارند.

واژگان کلیدی: آنتی‌اکسیدان، پروتامکس، پروتئین آبکافت، رادیکال آزاد، ماهی یال اسبی.

* نویسندهٔ مسئول تلفن: ۰۹۱۲۶۴۸۷۴۱۷
Email: taheri@cmu.ac.ir

۱.مقدمه

ماهی یال‌اسبی (*Trichiurus lepturus*) از ماهیان صیدشده در آب‌های خلیج فارس و عمان است که بیشترین درصد صید ماهیان غیر معمول در آب‌های جنوبی ایران را به خود اختصاص می‌دهد. تمرکز پراکنش این ماهی در اقیانوس‌های اطلس، آرام، و هند است. این ماهی دارای بدنی کشیده و فاقد فلس است. چشم‌ها تقریباً درشت‌اند. آرواره‌ها اغلب دارای دندان‌های نیش‌اند. طول بدن به ۱۲۰ سانتی‌متر می رسد، اما میانگین طول زیر ۱۰۰ سانتی متر است. بالهٔ پشتی بسیار کشیده در طول بدن دارد که بخش دارای شعاع نرم آن اغلب بلندتر از بخش سخت آن است. این ماهیان در مناطق نیمه‌گرمسیری و آب‌های کم‌عمق ساحلی یافت می‌شوند و هنگام شب اغلب به سطح آب نزدیک می‌شوند. این ماهی شکارچی سخت‌پوستان، سرپایان، و ماهیان کوچک است (Yan *et al.*, 2012)، و از طریق تراولرها، تور گوشگیر، و پرساینرها صید می‌شود. از نظر شیلاتی، به علت گوشت لذیذ در بسیاری کشورها اهمیت دارد، اما در ایران خورده نمی‌شود و بیشتر به مصرف تهیهٔ آرد ماهی می‌رسد یا به کشورهایی مثل چین صادر می‌شود و ارزان‌قیمت است.

از سوی دیگر، اکسایش روغن‌ها و چربی‌ها در زمان فرآوری و نگه‌داری غذا ارزش غذایی و کیفیت آنها را کاهش خواهد داد و مصرف این ترکیبات سمی می‌تواند باعث چندین نوع بیماری شود (Rajapakse *et al.*, 2005). گونه‌های اکسیژن فعال و رادیکال آزاد مثل آنیون سوپر اکساید ($O_2^{\bullet-}$)، رادیکال هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، و پراکسید هیدروژن (H_2O_2) محصولات ناخواستهٔ متابولیسم هوازی‌اند که نقش مهمی در بسیاری از بیماری‌ها ایفا می‌کنند (Je *et al.*, 2004). بنابراین، امروزه نیاز به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی یا طبیعی احساس می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مثل بوتیل هیدروکسی تولوئن و بوتیل هیدروکسی آنیزول کارا و مقرون به صرفه‌اند، اما تأثیراتی سمی و خطرناک دارند (Ito *et al.*, 1985). گزارش شده که بوتیل هیدروکسی تولوئن و بوتیل هیدروکسی آنیزول مسئول آسیب کبدی و سرطان‌زایی‌اند (Grice, 1998). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی حاصل از غذا به دلیل مزایای سلامتی آنها که بدون اثر جانبی‌اند یا اثر جانبی کمی دارند بسیار مورد توجه‌اند. بنابراین، در سال‌های اخیر تلاش برای یافتن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی که می‌توانند بدن انسان را از رادیکال‌های آزاد و گونه‌های اکسیژن فعال حفظ کنند و از بروز بسیاری بیماری‌ها مبرا کنند افزایش یافته است (Gulcin *et al.*, 2004).

مطالعات و بررسی‌های بسیاری مبنی بر توانایی پروتئین‌ها در جلوگیری از اکسایش لیپید در غذاها در دسترس است. بر اساس گزارش‌ها پپتیدهای زیست فعالی که از منابع مختلف غذایی تهیه می‌شوند خواص ضد فشار خون (Suetsuna *et al.*, 2004)، آنتی‌اکسیدان، ضد سرطان (Picot *et al.*, 2006)، و ضد میکروبی دارند. مکانیسم دقیق فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها کاملاً شناخته‌شده نیست، اما مطالعات متعدد نشان داده است که این پپتیدها پراکسایش لیپیدها را محدود می‌کنند (Qian *et al.*, 2008)، رادیکال‌های آزاد را جمع می‌کنند (Moure *et al.*, 2006)، و کلاته‌کننده یا انتقال‌دهندهٔ یون‌های فلزی‌اند (Rajapakse *et al.*, 2005). به علاوه،

گزارش شده است که پپتیدهای آنتی‌اکسیدان سلول‌ها را از آسیب گونه‌های فعال اکسیژن با تحریک ژن‌ها حفظ می‌کنند. مطالعه‌ای نیز نشان داده است که این پروتئین‌ها قادر به افزایش فعالیت گلوتاتیون پراکسیداز و سوپر اکسید دیسموتاز و کاهش غلظت مالون آلدهید در مطالعات درون سلولی‌اند (Fu, 2003). مطالعات اخیر گزارش‌هایی در استفاده از ضایعات صنایع شیلاتی با آبکافت آنزیمی برای بازیافت ترکیبات ارزشمند را نشان می‌دهد (Slizyte *et al.*, 2005). این آبکافت با آنزیم‌های میکروبی، گیاهی، یا جانوری انجام می‌شود و مطالعات نشان داده است که آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، و پاپایین توانایی بالایی در تولید پپتیدهای زیست فعال دارند.

مطالعات منابع مختلف نشان می‌دهد پروتئین آبکافت می‌تواند از اکسایش لیپیدها جلوگیری کند و قابلیت کاربرد به‌منزلهٔ آنتی‌اکسیدان طبیعی در غذا و سیستم‌های بیولوژیکی را داراست (Mendis *et al.*, 2005). دربارهٔ خاصیت آنتی‌اکسیدان نیز مطالعات دربارهٔ میگو (Suetsuna *et al.*, 2000)، عصارهٔ پخت ماهی تن (Jao and Ko, 2002)، پولاک آلاسکا (Je *et al.*, 2004)، استخوان ستون فقرات ماهی تن (Je *et al.*, 2007)، گیش زرد باله (Klompong *et al.*, 2009)، و اسکاد گرد (Thiansilakul *et al.*, 2007) فعالیت آنتی آکسیداتیو پروتئین آبکافت تولیدی از این گونه‌ها را تأیید کرد.

از آنجا که گونهٔ یال اسبی ماهی بیشترین میزان صید ماهیان غیر معمول را در چابهار شامل می‌شود و در ایران تاکنون تحقیقی دربارهٔ خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت تولیدشده از این گونهٔ ارزان‌قیمت انجام نشده است، در مطالعهٔ حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی، که با آنزیم پروتامکس تولیدشده، بررسی شده است.

۲. مواد و روش‌ها

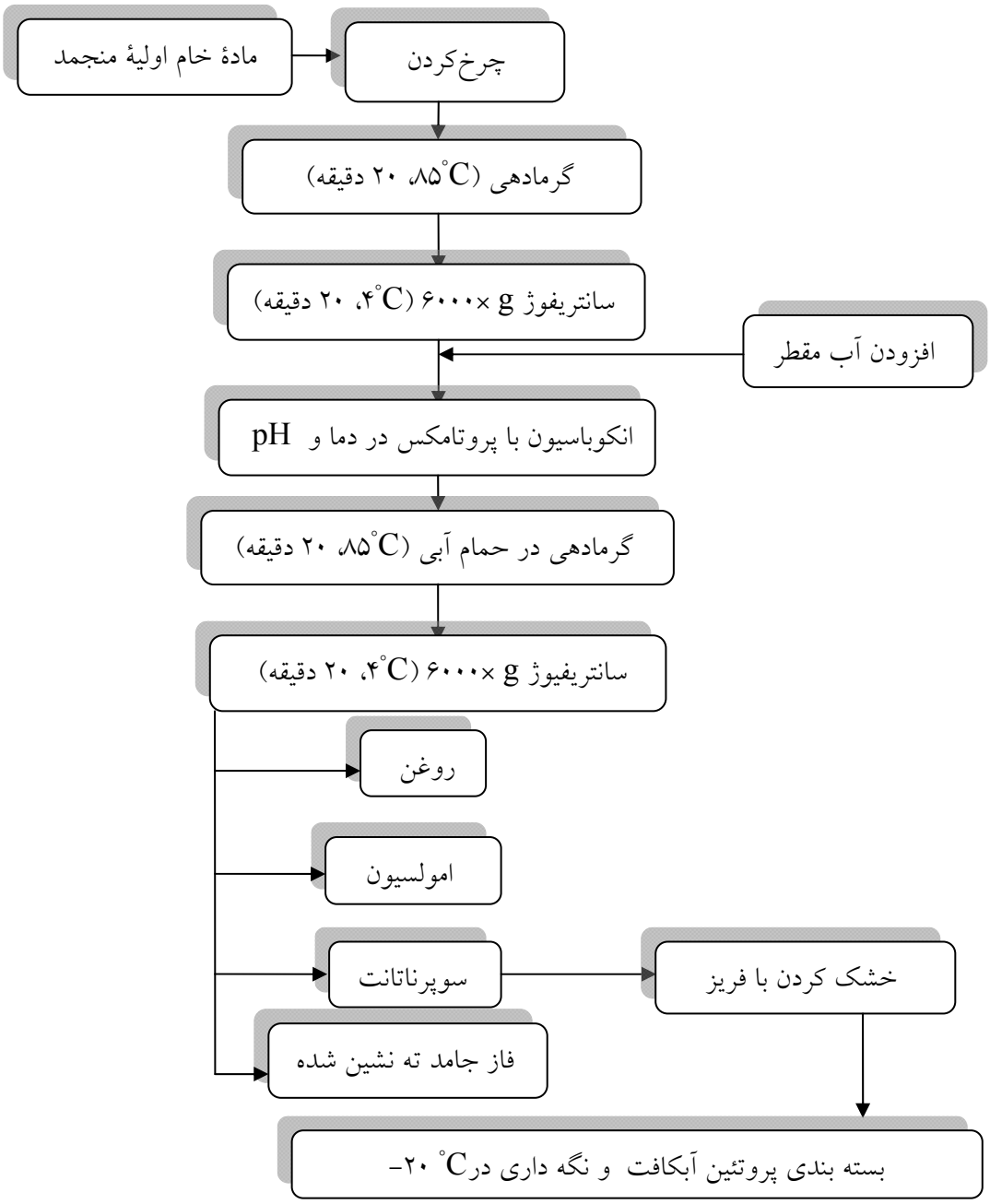
۱.۲. تهیهٔ نمونه

تعداد ۱۰۰ عدد ماهی، از صیادانی که در فصل پاییز در آب‌های دریایی عمان صید می‌کردند، دریافت شد و بلافاصله پس از صید و تحویل در ساحل کنارک چابهار در جعبه‌های یونولیتی حاوی نسبت ۲ به ۱، یخ به ماهی، به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار منتقل شدند و پس از شست‌وشوی اولیه با آب ۴ درجهٔ سانتی‌گراد تخلیهٔ شکمی شدند سپس، با چاقو به قطعات ۲۰۰ گرمی فیله شدند. امعا و احشا و فیلهٔ ماهی در کیسه‌های زیپ‌دار بسته‌بندی و تا زمان آزمایش در دمای ۲۰- درجهٔ سانتی‌گراد نگه‌داری شدند.

۲.۲. تولید پروتئین آبکافت

آبکافت آنزیمی با استفاده از آنزیم پروتامکس بر اساس روند (Taheri *et al.*, 2011) با اندکی تغییر انجام پذیرفت (شکل ۱). بر این اساس، نمونه‌ها اعم از امعا و احشا یا فیلهٔ ماهی یال اسبی به صورت جداگانه در یک چرخ گوشت (مولینکس ۱۶۰۰، هلند) چرخ شدند سپس، به ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری اضافه شدند. ارلن‌ها برای ۲۰ دقیقه در $^{\circ}C$ ۸۵ گرمادهی شدند تا آنزیم‌های داخلی آنها غیر فعال شوند و چربی گوشت آزاد شود (Guerard *et al.*, 2001). پس از سانتریفوژ در g × ۶۰۰۰ به مدت ۲۰

دقیقه (۴°C) هر نمونه حاوی نسبت ۱ به ۲ از ۱۰۰ گرم امعا و احشا و گوشت چرخ‌شده و آب مقطر بود که با اضافه‌کردن ۲٪ آنزیم پروتامکس در دمای ۶۰ درجهٔ سانتی‌گراد و زمان ۵۵ دقیقه (طبق یک آزمایش پیش‌تیمار) در شیکرانکوباتور قرار داده شد. پس از طی این زمان آنزیم پروتامکس با قراردادن مجدد در حمام آبی غیر فعال شد. نمونه‌ها در ۶۰۰۰ × g سانتریفوژ شدند (۴°C) و سوپرناتانت حاصله با دستگاه فریزدرایر (Operon, Korea) خشک و تا زمان مصرف درون کیسه‌های پلی‌اتیلنی بسته در ۲۰°C- نگه‌داری شد (Taheri *et al.*, 2011).



شکل ۱. مراحل تهیهٔ پروتئین آبکافت

۳.۲. تعیین میزان و درجهٔ آبکافت (DH) و بازیافت نیتروژن

به ۰/۵ میلی‌لیتر از سوپرناتانت حاصله ۰/۴۴ مول در لیتر تری کلرو استیک اسید اضافه شد. مخلوط برای سی دقیقه در دمای اتاق انکوبه سپس، سانتریفوژ شد. محلول ۰/۲۲ مول در لیتر تری کلرو استیک اسید حاصله برای تعیین محتوای پروتئین با روش بیورت سنجیده شد. درجهٔ آبکافت نیز با فرمول زیر سنجیده شد (Tsumura *et al.*, 1999).

(معادلهٔ ۱)

$$\text{درجه هیدرولیزاسیون} = \frac{\text{پروتئین موجود در محلول ۰/۲۲ مول در لیتر تری کلرو استیک اسید}}{\text{پروتئین موجود در هیدرولیزات}}$$

بازیافت نیتروژن بر اساس روش (Liaset *et al.*, 2002) طبق فرمول زیر سنجش شد:

(معادلهٔ ۲)

$$\text{بازیافت‌نیتروژن} = \frac{\text{گرم‌هیدرولیزات} \times \text{نیتروژن‌موجود در هیدرولیزات}}{\text{گرم‌ماده‌خام} \times \text{نیتروژن‌موجود در ماده خام‌مصرفی}}$$

۴.۲. آنالیز تقریبی

آنالیز چربی به روش (Bligh and Dyer, 1959) انجام و به منظور آنالیز محتوی پروتئین از روش بیورت استفاده شد. بر این اساس ۴/۵ میلی‌گرم سدیم پتاسیم تارتارات، ۱/۵ میلی‌گرم سولفات مس ۵ آبه، و ۲/۵ میلی‌گرم یدید پتاسیم در ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۲ مولار سود حل شدند و به حجم ۵۰۰ سی‌سی رسانده شدند. به ۵۰۰ میکرولیتر از محلول پروتئینی ۴/۵ میلی‌لیتر محلول سنجش افزوده شد و پس از ۲۰ دقیقه در ۵۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر (Jenway, 6305, UK) قرائت شد و با منحنی استاندارد مقایسه شد.

۵.۲. آنالیز اسید آمینه

آنالیز ترکیب اسید آمینهٔ کل با استفاده از دستگاه کرماتوگرافی مایع با نفوذ بالا[1] و شناساگر فلوئورسنت انجام گرفت (RF-530, Knauer, Berlin, Germany). نخست، ۰/۲ گرم نمونه با اسید کلریدریک ۶ نرمال برای ۲۰ ساعت در $110^{\circ}C$ هیدرولیز شد و پس از اشتقاق با اورتو فتیل دی آلدهید[2] با ستون فاز معکوس کرماتوگراف شد. شناساگر فلوئورسنت در طول موج‌های ۲۵۰ و ۳۹۵ نانومتر تنظیم و آزمایش در دمای ثابت $40^{\circ}C$ انجام شد. دستگاه با استفاده از ترکیب اسیدهای آمینهٔ مشخص از ۱۲/۵ تا ۷۵ پیکومول کالیبره شد. شناسایی سیستین به وسیلهٔ تیمار با محلول پرفورمیک اسید قبل از هیدرولیز با اسید کلریدریک انجام شد (Flynn, 1988).

۶.۲. تعیین وزن مولکولی پروتئین با الکتروفورز SDS-PAGE

از الکتروفورز در ژل پلی آکریل آمید در حضور سدیم دودسیل سولفات بر اساس روش Laemlie (1970) استفاده شد. از ژل جداکنندهٔ ۱۲٪ و ژل متراکم‌کنندهٔ ۴٪ استفاده شد. ۴۰ میکرولیتر از نمونه با ۱۰ میکرولیتر بافر نمونه مخلوط و ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده شد. نمونه‌ها ۵ دقیقه در ۱۲۰۰۰ g سانتریفوژ و ۱۰ میکرولیتر از آن در چاهک نمونه لود شد و در ولتاژ ثابت ۱۵۰ میکرو ولت الکتروفورز شد. از استاندارد وزن مولکولی در رنج گسترده به منظور تعیین وزن مولکولی باندها استفاده شد. رنگ‌آمیزی با

1. HPLC
2. OPA

کوماسی برلیانت بلو انجام شد و بررسی و اسکن نهایی ژل انجام پذیرفت.

۷.۲. حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل α,α-diphenyl-β-picrylhydrazyl (DPPH)

فعالیت حذف رادیکال آزاد با روش تغییریافتهٔ Shimada و همکاران انجام گرفت (Shimada *et al.*, 1992). بر این اساس، محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH (۱/۵ میلی‌لیتر) با نمونه مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه در دمای اتاق جذب در ۵۱۷ نانومتر سنجیده شد. برای کنترل محلول اتانول به جای نمونه تهیه شد. بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برای مقایسه استفاده شد. فعالیت حذف رادیکال آزاد بر اساس فرمول زیر سنجیده شد:

$$DPPH\ radical\ scavenging\ capacity\ (\%) = ۱ - \frac{A_{۵۱۷} sample}{A_{۵۱۷} control} \times ۱۰۰$$

۸.۲. تعیین فعالیت کلاته‌کردن یون فرو

فعالیت کلاته‌کردن یون آهن (II) بر اساس روش تغییریافتهٔ Dinis و همکاران سنجش شد (Dinis *et al.*, 1994). بر این اساس، به نمونه (با غلظت‌های متفاوت) محلول ۲ میلی‌مولار یون آهن فرو (۰/۱ میلی‌لیتر) اضافه شد و بعد از ۳ دقیقه واکنش با افزودن فروزین ۵ میلی‌مولار متوقف شد. مخلوط برای ۱۰ دقیقه در دمای اتاق ثابت ماند. جذب مخلوط در ۵۶۲ نانومتر سنجیده شد. شاهدی بدون نمونه به شیوهٔ مشابه تهیه شد. از اتیلن دی آمین تترا آمینو اسید (۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) برای مقایسه استفاده شد. ظرفیت کلاته‌کردن با فرمول زیر سنجش شد.

$$Fe^{۲+} Chelating\ activity\ (\%) = \frac{Blank - Sample}{Blank} \times ۱۰۰$$

۹.۲. تعیین قدرت کاهندگی

قدرت کاهندگی بر اساس روش تغییریافتهٔ Oyaizu سنجیده شد (Oyaizu, 1986). بر این اساس، ۱ میلی‌لیتر نمونه (در غلظت‌های نهایی متفاوت) با ۱ میلی‌لیتر فسفات بافر و ۱ میلی‌لیتر پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. مخلوط در ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد انکوبه شد سپس، مخلوط تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به میزان ۱ میلی‌لیتر افزوده شد. قسمتی از مخلوط با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شد و ۰/۴ میلی‌لیتر کلرید فریک اضافه شد. بعد از ۱۰ دقیقه جذب در ۷۰۰ نانومتر سنجیده شد. افزایش میزان جذب نشان‌دهندهٔ افزایش قدرت کاهندگی است. آسکوربیک اسید (۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به‌منزلهٔ استاندارد استفاده شد.

۱۰.۲. فعالیت آنتی‌اکسیدان در سیستم امولسیون ۵٪ روغن ماهی در آب

امولسیون با سیترم ۱٪ به‌منزلهٔ امولسیفایر استفاده شد. ۵ گرم سیترم و ۲۵ گرم روغن ماهی مخلوط شد. ۴۷۰ میلی‌لیتر بافر (ایمیدازول: استات) و نمونه‌های پروتئینی با غلظت ۱ گرم در میلی‌لیتر در بافر حل شد. یک هموژن اولیه به مدت ۳ دقیقه انجام شد و مخلوط روغن ماهی به‌آرامی طی ۱ دقیقه اضافه شد سپس، برای ۲ دقیقه هموژن شد. یک شاهد منفی

بدون آنتی‌اکسیدان و یک شاهد مثبت با بوتیل هیدروکسی تولوئن نیز به شیوهٔ مشابه تولید شد. اکسایش با استفاده از سولفات آهن (۱۰۰ میکرو مولار) آغاز شد. امولسیون تهیه‌شده در ظروف شیشه‌ای پیرکس در ۲۰ درجهٔ سانتی‌گراد و تاریکی به مدت ۷۲ ساعت نگه‌داری شد. نمونه‌گیری در ساعت‌های ۰، ۱۲، ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت انجام شد و سنجش پراکساید مستقیماً روی چربی استخراج‌شده به روش Bligh و Dyer طبق روش رنگ‌سنجی تیوسیانات آهن بر اساس استاندارد بین‌المللی IDF (۱۹۹۱) انجام شد.

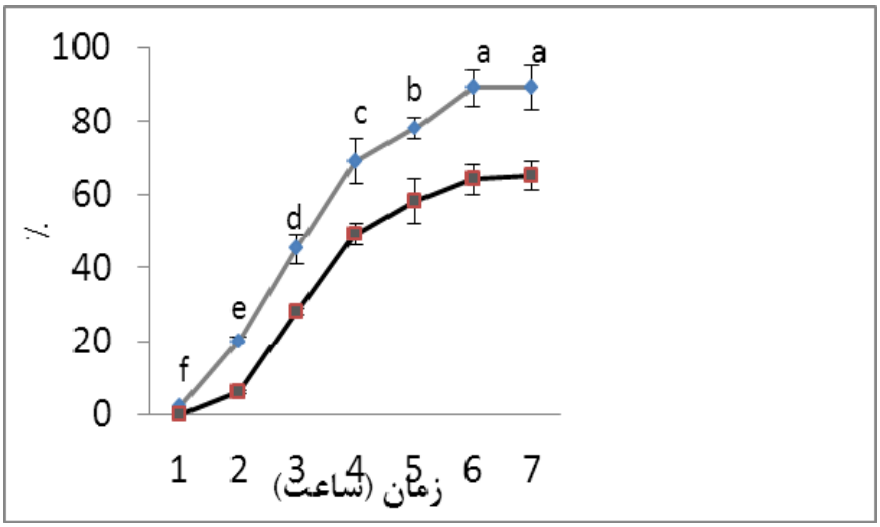
۱۱.۲. آنالیز آماری

تمامی آزمایش‌ها در ۷ تیمار برای هر آنالیز و حداقل ۳ تکرار انجام شد. از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One way ANOVA) برای بررسی وجود اختلاف استفاده شد و برای بررسی معنی‌داری اختلافات بین میانگین‌ها از آزمون دانکن (Duncan multiple range test) در سطح آلفای ۰/۰۵ استفاده شد. نتایج با استفاده از نرم‌افزار Graphpad prism 5 (Graphpad Softwarer Inc., San Diego, USA) آنالیز شد.

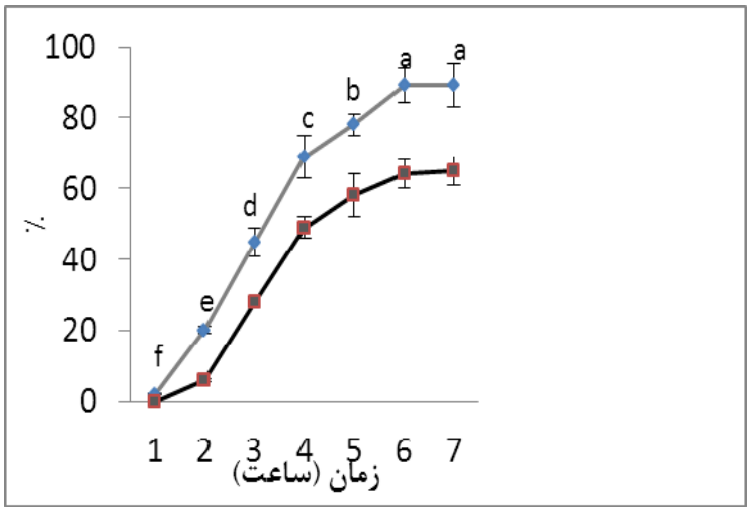
۳. نتایج

۱.۳. بازیافت نیتروژن و درجهٔ آبکافت

درصد بازیافت نیتروژن و درجهٔ آبکافت پروتئین، آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی در ساعات مختلف در نمودار ۱ و ۲ آورده شده است. آن‌چنان که مشاهده می‌شود با افزایش ساعات آبکافت میزان محلول‌شدن نیتروژن و در نتیجه درجهٔ آبکافت افزایش می‌یابد. بیشترین میزان بازیافت نیتروژن امعا و احشا و گوشت به ترتیب ۶±۸۹٪ و ۸±۹۳٪ در ساعت هفتم دیده شد. بیشترین میزان درجهٔ آبکافت نیز به ترتیب به میزان ۳±۶۵٪ و ۷±۷۹٪ در همین ساعت به دست آمد.



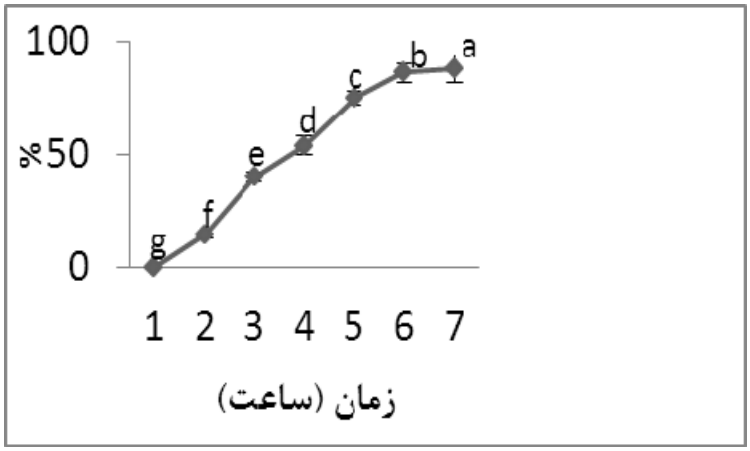
نمودار ۱. درصد بازیافت نیتروژن و درجهٔ آبکافت پروتئین، آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).



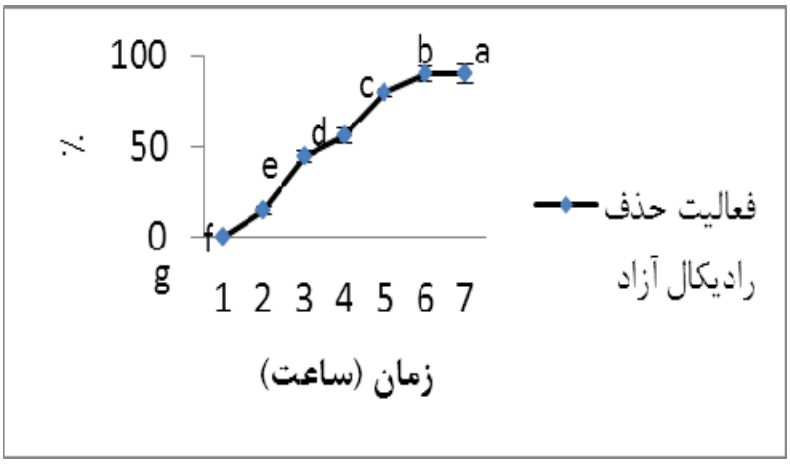
نمودار ۲. درصد بازیافت نیتروژن و درجهٔ آبکافت پروتئین، آبکافت گوشت ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).

۲.۳. فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH

درصد فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH با پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی در ساعات مختلف آبکافت به ترتیب در نمودار ۳ و ۴ آورده شده است. در پروتئین آبکافت امعا و احشا کمترین میزان حذف در ساعت دوم به میزان ۱±۱۴٪ و بیشترین میزان ۶±۸۸٪ در ساعت‌های آخر دیده شد که اختلاف معنی‌داری با ساعت‌های دیگر داشت (P<۰/۰۵). در پروتئین آبکافت گوشت کمترین میزان حذف در ساعت دوم به میزان ۲±۱۵٪ و بیشترین میزان در ساعات پنجم و ششم به میزان ۹۰٪ دیده شد که با ساعات دیگر اختلاف معنی‌داری را نشان داد (P<۰/۰۵). به طور کلی، با افزایش زمان آبکافت میزان حذف رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل نیز افزایش می‌یابد. از بوتیل هیدروکسی تولوئن به‌منزلهٔ شاهد استفاده شد که ۰/۳±۹۱٪ فعالیت حذف رادیکال آزاد نشان داد و با نتایج بیشترین میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد از هر دو منبع پروتئین آبکافت اختلاف معنی‌داری نداشت (P<۰/۰۵).



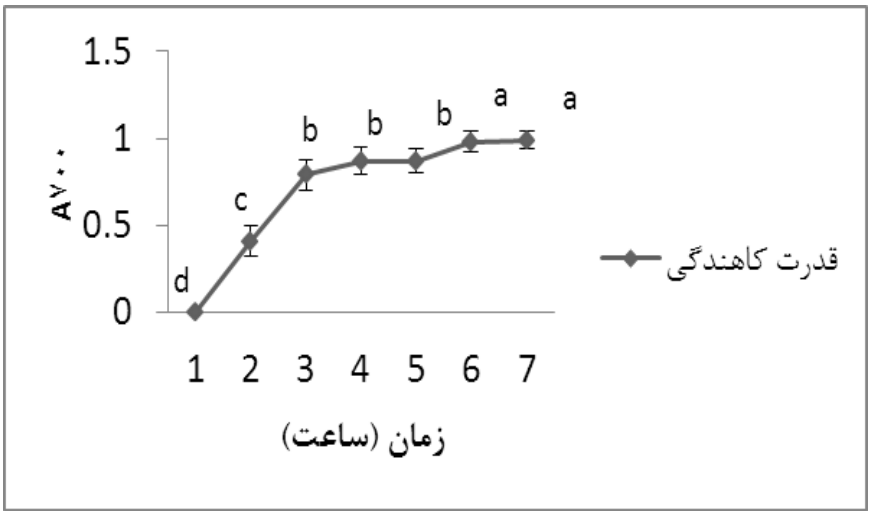
نمودار ۳. درصد فعالیت حذف رادیکال آزاد با پروتئین آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).



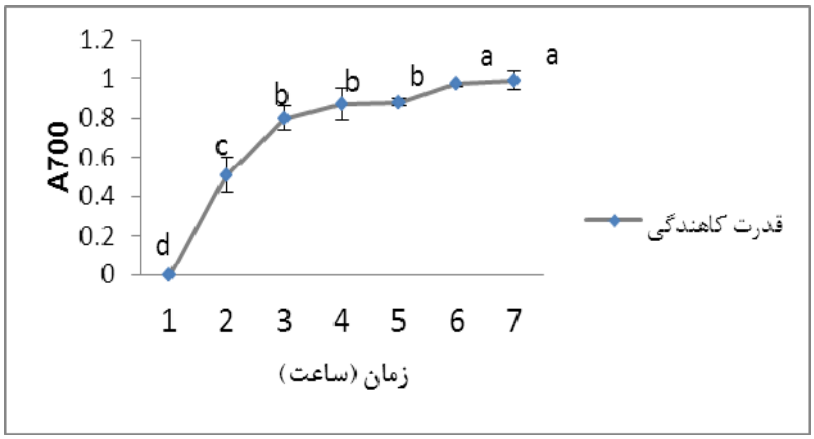
نمودار ۴. درصد فعالیت حذف رادیکال آزاد با پروتئین آبکافت گوشت ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).

۳.۳. فعالیت کاهندگی پروتئین آبکافت

میزان قدرت کاهندگی پروتئین آبکافت در ساعات مختلف با پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی به ترتیب در نمودارهای ۵ و ۶ آورده شده است. کمترین و بیشترین میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر برای پروتئین آبکافت امعا و احشا به ترتیب ۰/۰۹±۰/۴۱ و ۰/۰۵±۰/۹۹ در ساعت‌های دوم و هفتم آبکافت دیده شد. این میزان برای پروتئین آبکافت گوشت به ترتیب ۰/۰۹±۰/۵۱ و ۰/۰۴±۰/۹۹ در همان ساعات بود. اختلاف معنی‌داری با میزان جذب اسید آسکوربیک به‌منزلهٔ شاهد در ساعات ششم و هفتم دیده نشد (P>۰/۰۵).



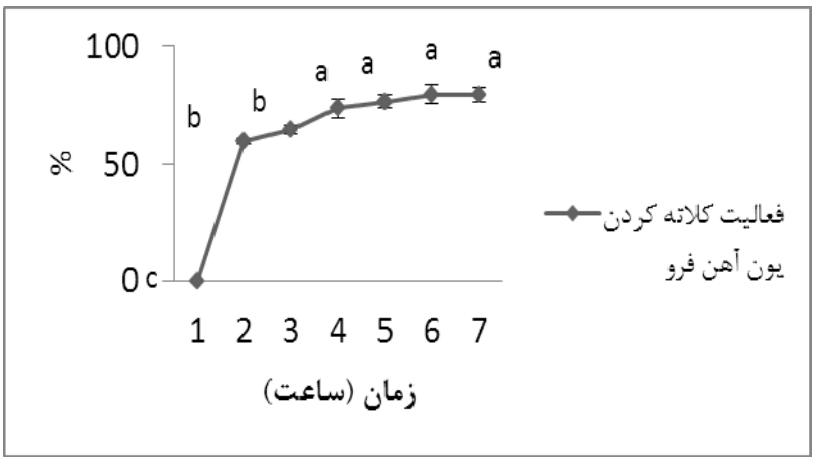
نمودار ۵. میزان قدرت کاهندگی پروتئین آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).



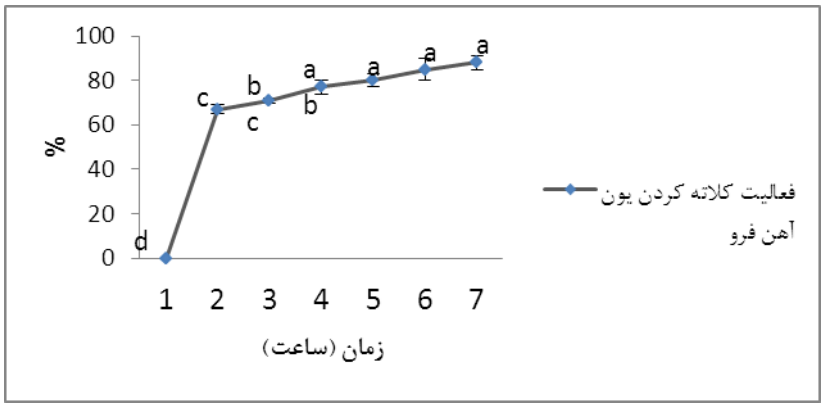
نمودار ۶. میزان قدرت کاهندگی پروتئین آبکافت گوشت ماهی یال اسبی در ساعات مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).

۴.۳. فعالیت کلاته‌کنندگی پروتئین آبکافت

میزان کلاته‌کنندگی پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی در نمودارهای ۷ و ۸ آورده شده است. کمترین و بیشترین میزان کلاته‌کنندگی پروتئین آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی در ساعات دوم و ششم و هفتم دیده شد که به ترتیب ۱±۶۰٪ و ۴±۸۰٪ بود. میزان کلاته‌کنندگی پروتئین آبکافت گوشت ماهی یال اسبی نیز شایان توجه بود. کمترین میزان با ۲±۶۷٪ در ساعت دوم و بیشترین میزان با ۳±۸۸٪ در ساعت پایانی دیده شد. هر دو نوع پروتئین آبکافت در بیشترین میزان فعالیت خود اختلاف معنی‌داری با اتیلن دی آمین ترا استیک اسید (۰/۷±۹۸٪) نشان دادند ($P<0/05$).



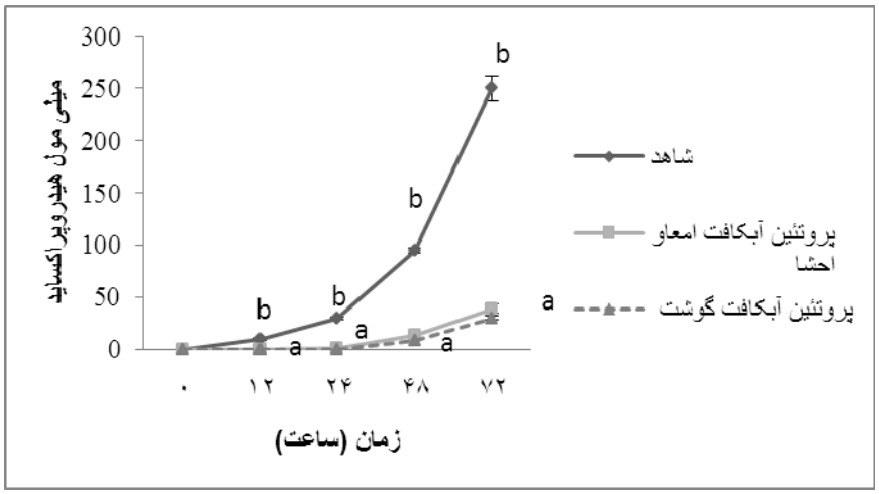
نمودار ۷. فعالیت کلاته‌کردن یون آهن فرو با پروتئین آبکافت امعا و احشا در ساعت‌های مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).



نمودار ۸. فعالیت کلاته‌کردن یون آهن فرو با پروتئین آبکافت گوشت در ساعت‌های مختلف (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).

۵.۳. جلوگیری از اکسایش در سیستم امولسیون روغن ماهی

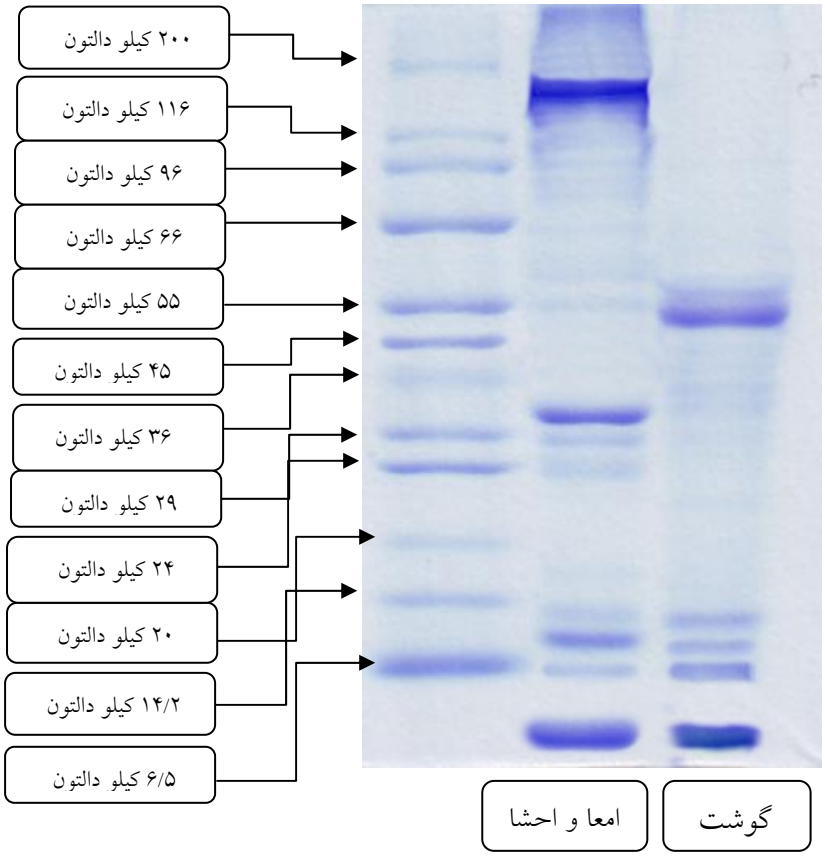
میزان پراکساید در سیستم امولسیون روغن ماهی با استفاده از پروتئین آبکافت به‌منزلهٔ آنتی‌اکسیدان در نمودار ۹ دیده می‌شود. همان طور که مشاهده می‌شود، در شاهد که فاقد آنتی‌اکسیدان است از ساعت شروع اکسایش میزان پراکساید بالا می‌رود و ۷۲ ساعت پس از آغاز واکنش به ۱۲±۲۵۰٪ می‌رسد، اما در نمونهٔ حاوی پروتئین آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی تا ۲۴ ساعت پس از آغاز واکنش میزان پراکساید پایین است و ۷۲ ساعت پس از آغاز واکنش به ۴±۳۹٪ می‌رسد (P<۰/۰۵). این مسئله در مورد پروتئین آبکافت گوشت ماهی نیز دیده شد به شکلی که ۷۲ ساعت پس از آغاز واکنش به ۲±۳۰٪ می‌رسد (P<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری بین آنتی‌اکسیدان شاهد و پروتئین‌های آبکافت در جلوگیری از اکسیداسیون سیستم دیده نشد (نمودار به دلیل همپوشانی نشان داده نشده است) (P<۰/۰۵).



نمودار ۹. نتایج قدرت محافظتی پروتئین‌های آبکافت گوشت و امعا و احشای ماهی یال اسبی در سیستم امولسیون ۵٪ روغن ماهی در آب در جلوگیری از گسترش هیدرو پراکساید طی زمان ۷۲ ساعت (حروف غیر هم‌نام نشان‌دهندهٔ اختلاف معنی‌دار است).

۶.۳. بررسی وزن مولکولی با SDS-PAGE الکتروفورز

شکل ۲ تصویر الکتروفورز پروتئین‌های آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی در ساعت هفتم آبکافت را نشان می‌دهد. در این بررسی از مارکر مولکولی پروتئین با رنج گسترده به‌منزلهٔ استاندارد استفاده شد. در بررسی پروتئین آبکافت امعا و احشای ماهی یال اسبی مشخص شد که سه دستهٔ پروتئینی و پپتیدی حدود ۲۰۰، ۴۰، و زیر ۶/۵ کیلو دالتون بیشترین مقدار وزن مولکولی را داراست و ۶ دسته پروتئینی دیگر با وزن‌های مولکولی ۵۵، ۳۶، ۲۹، ۱۴، ۱۰، و ۶/۵ کیلو دالتون نیز دیده می‌شود. در بررسی وزن مولکولی پروتئین آبکافت گوشت ماهی یال اسبی نیز مشخص شد که دو رنج مولکولی با وزن‌های ۵۵ و زیر ۶/۵ کیلو دالتون بیشترین و پررنگ‌ترین باندها را داشتند و ۳ دستهٔ پروتئینی و پپتیدی دیگر با وزن‌های حدود ۱۴/۲، ۱۰، و ۶/۵ کیلو دالتون نیز دیده شد.



شکل ۲. تصویر ژل الکتروفورز گوشت و امعا و احشای ماهی یال اسبی پس از رنگ‌آمیزی. از شاخص مولکولی با رنج گستردهٔ سیگما برای استاندارد استفاده شده است.

۷.۳. ترکیب اسیدهای آمینه

جدول ۱ ترکیب اسیدهای آمینهٔ پروتئین آبکافت گوشت و امعا و احشای ماهی یال اسبی را در کنار شاخص شیمیایی اسیدهای آمینهٔ ضروری آن نشان می‌دهد. در این تحقیق از ترکیب اسید آمینهٔ پروتئین استاندارد FAO/WHO به منظور محاسبهٔ شاخص شیمیایی استفاده شد. در بررسی مشخص شد که ترکیب اسیدهای آمینهٔ هر دو نوع پروتئین آبکافت مشابه است و بیشترین میزان اسیدهای آمینهٔ ضروری به ترتیب لیزین، لوسین، و آرژنین است و اسیدهای آمینهٔ والین، ایزولوسین و ترئونین در رده‌های بعدی قرار می‌گیرند. از میان اسیدهای آمینهٔ غیر ضروری نیز گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید بیشترین میزان را در ترکیب دارا بودند و گلیسین، آلانین، و سرین در رده‌های بعدی بودند. بیشترین میزان اسید آمینه مربوط به گلوتامیک اسید و کمترین مربوط به هیستیدین بود. در بررسی شاخص شیمیایی نیز مشخص شد که به غیر از اسید آمینهٔ متیونین که شاخص ۰/۸۸ را نشان داد بقیهٔ اسیدهای آمینه شاخص بالای یک داشتند.

جدول ۱. ترکیب اسیدهای آمینهٔ پروتئین آبکافت گوشت و امعا و احشای ماهی یال اسبی و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با پروتئین رفرنس

درصد اسید آمینهٔ پروتئین آبکافت			شاخص شیمیایی	
اسیدهای آمینه	گوشت	امعا و احشا	پروتئین رفرنس[۱]	الف	ب
اسیدهای آمینهٔ ضروری					
هیستیدین	۲/۴۸	۲/۴۵	۲	۱/۲۴	۱/۲۲
ایزولوسین	۵/۵	۵/۲	۴	۱/۳۷	۱/۳
لوسین	۹/۱	۹/۱	۷	۱/۳	۱/۳
لیزین	۱۰/۷	۱۰/۱	۵/۵	۱/۹۴	۱/۸۳
متیونین	۳/۰۹	۳/۱	۳/۵	۰/۸۸	۰/۸۸
فنیل آلانین	۴/۴۴	۴/۵	۴/۲۹	۱/۰۳	۱/۰۴
تیروزین	۴/۰۵	۴/۲	-		
ترئونین	۵/۱۴	۵/۲	۴	۱/۲۸	۱/۳
آرژینین	۶/۹۱	۶/۹	۵	۱/۳۸	۱/۳۸
والین	۵/۷	۵/۴۲	۵/۴۲	۱/۰۵	۱
اسیدهای آمینهٔ غیر ضروری					
آسپارتیک اسید	۱۱/۲۶	۱۱/۲			
گلوتامیک اسید	۱۸/۸۶	۱۸/۸			
سرین	۴/۳۷	۴/۴			
گلایسین	۶/۸۸	۶/۸			
آلانین	۶/۳۶	۶/۳۸			

۱. میزان مورد نیاز اسید آمینه بر اساس رفرنس FAO/WHO

۴. بحث

در این مطالعه به بررسی خواص آنتی‌اکسیدان پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی پرداخته شد که با آنزیم پروتامکس تولید شده بود. همان طور که از نتایج برمی‌آید، پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی علیه رادیکال آزاد DPPH، کلاته‌کردن یون فلزی، و همین طور قدرت کاهندگی دارد. در تمامی موارد نیز پروتئین آبکافت گوشت خواص ضد اکسیدانی بالاتری از پروتئین امعا و احشا نشان داد هر چند که اختلاف معنی‌دار نبود.

فعالیت حذف رادیکال آزاد از طریق اسید آسکوربیک در مطالعهٔ حاضر ۷۸٪ بود که نزدیک به مقادیر گزارش‌شده برای پروتئین آبکافت ماهی یال اسبی است. این نتایج با نتایج Naqash و Nazeer همخوانی دارد (Naqash and Nazeer, 2011). همان طور که نتایج نشان می‌دهد، با افزایش زمان آبکافت میزان نیتروژن محلول و درجهٔ آبکافت افزایش می‌یابد. با این افزایش فعالیت حذف رادیکال آزاد نیز افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، با افزایش درجهٔ آبکافت میزان کلاته‌کردن یون فلزی و قدرت کاهندگی نیز افزایش می‌یابد. همین نتایج در مطالعه دربارهٔ گیش پهلو زرد نیز گزارش شده است (Klompong *et al.*, 2009). در مطالعهٔ Batista و همکاران بیشترین حلالیت نیتروژن از طریق پروتامکس دیده شد (۷۶٪) و با افزایش درجهٔ آبکافت از ۲۵٪ به ۵۵٪ میزان حذف رادیکال آزاد و قدرت کاهندگی افزایش یافت (Batista *et al.*, 2010).

مطالعهٔ حاضر نشان‌دهندهٔ ارتباط مستقیم بین درجهٔ آبکافت و ظرفیت الکترون‌دهندگی به رادیکال آزاد است. بر این اساس، قدرت کاهندگی با افزایش درجهٔ آبکافت افزایش می‌یابد. نتایج مشابهی نیز در بررسی خواص آنتی‌اکسیدان ضایعات شمشیر ماهی سیاه به دست آمده است (Batista *et al.*, 2010).

حذف رادیکال آزاد مکانیسم اولیه‌ای است که با آن مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال‌های آزادی است که در دمای اتاق پایدار است (Zhong *et al.*, 2011). وقتی DPPH در حضور ماده‌ای الکترون‌دهنده مثل آنتی‌اکسیدان قرار می‌گیرد، یک الکترون یا هیدروژن می‌پذیرد تا به یک مولکول دی مگنتیک پایدار تبدیل شود و در نتیجه مهار می‌شود. افزایش فعالیت حذف رادیکال آزاد با افزایش درجهٔ آبکافت می‌تواند با فعالیت هیدروژن‌دهندگی پپتیدهای زیست فعال مرتبط باشد که می‌توانند رادیکال‌های آزاد را پایدار کنند و واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را متوقف کنند. افزایش قدرت کاهندگی نیز نشان از قدرت الکترون‌دهندگی پپتیدها دارد. همین نتیجه در مورد پروتئین آبکافت ماهی ماکرل نیز به دست آمده که به شیوهٔ خودهضمی تولید شده بود، ولی در مطالعه‌ای دیگر دربارهٔ گیش پهلو زرد با افزایش درجهٔ آبکافت کاهش قدرت کاهندگی دیده شد (Klompong *et al.*, 2009). همچنین، به منظور درک بیشتر از فعالیت آنتی‌اکسیدانی در سیستمی واقعی، از امولسیون روغن ماهی در آب استفاده شد و محافظت روغن ماهی از اکسایش با پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی سنجش شد. بر اساس نتایج حاضر،

این پروتئین‌ها قابلیت بسیار بالایی در محافظت از روغن ماهی، که حاوی مقادیر بالایی اسیدهای چرب اشباع‌نشده است، در برابر اکسایش دارند به شکلی که تا ۴۸ ساعت پس از شروع اکسایش فعالیت ممانعت‌کنندگی خود را حفظ کردند. باید گفت که در حین آبکافت‌شدن رنج گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک‌تر و اسیدهای آمینهٔ آزاد تولید می‌شوند. میزان و ترکیب این اسیدهای آمینهٔ آزاد و پپتیدها تعیین‌کنندهٔ فعالیت آنتی‌اکسیدان پروتئین آبکافت است (Wu *et al.*, 2003).

جدای از مسائلی که در بالا ذکر شد، فاکتورهای دیگری می‌توانند در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال تأثیر گذارد. شرایط استخراج پروتئین، درجهٔ آبکافت، نوع آنزیم پروتئازی (Gibbs *et al.*, 2004)، ساختار پپتیدی (Saito *et al.*, 2003)، و غلظت پپتیدها از آن عوامل‌اند. به علاوه، وزن مولکولی پپتیدها می‌تواند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تأثیر قرار دهد.

در مطالعهٔ حاضر وجود پروتئین‌های با وزن مولکولی حدود ۲۰۰ کیلو دالتون در پروتئین آبکافت امعا و احشا که در پروتئین آبکافت گوشت دیده نشد شاید به دلیل شرایط حاکم بر تولید این پروتئین باشد. البته نباید از احتمال تفاوت ماهیت ساختاری این دو نوع پروتئین به‌رغم ترکیب نسبتاً مشابه نیز غافل بود، اما حضور ۲ باند پررنگ‌تر زیر ۶/۵ کیلو دالتون نشان از عملکرد آنزیم در خردکردن پپتیدها به قطعات کوچک دارد. بر اساس مطالعات، پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر اثر آنتی‌اکسیدانی بالاتری نشان داده‌اند که این مسئله می‌تواند مؤید نتایج تحقیق حاضر نیز باشد. بیان شده است که وزن مولکولی پروتئین‌ها نقش مهمی در فعالیت کلاته‌کردن یون فلزی ایفا می‌کند و با کاهش وزن مولکولی فعالیت کلاته‌کنندگی افزایش می‌یابد (Dong *et al.*, 2010)، اما اگر طول پپتید خیلی کوتاه باشد، کلاته‌کردن پایدار نخواهد بود (Megías *et al.*, 2008). در مطالعهٔ Aleman و همکاران دربارهٔ پروتئین آبکافت اسکوئید وزن مولکولی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان تولیدشده با پروتامکس رنج مولکولی ۱/۴ تا ۲۶/۶ کیلو دالتون بود (Alemán *et al.*, 2011)؛ البته آن‌ها بیان کردند که فعالیت آنتی‌اکسیدانی مثل حذف رادیکال فقط به وزن مولکولی بستگی ندارد و بیشتر توالی اسیدهای آمینه در پپتید است که اهمیت دارد.

در تحقیق حاضر میزان اسیدهای آمینهٔ گلوتامیک اسید، آسپارتیک اسید، لیزین، لوسین، و آرژنین در بیشترین میزان بود. در تحقیق Klompong و همکاران، پروتئین آبکافت تولیدی با آلکالاز و فلاوروزایمْ متیونین و سیستئین کمی داشتند، اما از نظر گلوتامیک اسید، گلوتامین، آسپارتیک اسید، آسپارژین، و آلانین غنی بودند. لیزین نیز در مقادیر بالا دیده شد، اما محتوای گلایسین، هیستیدین، و فنیل آلانین نسبت به منبع تولیدی کمتر بود (Klompong *et al.*, 2009).

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب، ساختار، و آبگریزی است و ترکیب اسیدهای آمینه نقش اساسی ایفا می‌کند (Chen *et al.*, 1998). مطالعات متعدد نشان می‌دهد که سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها خواص آنتی‌اکسیدان پروتئین آبکافت را تعیین می‌کند (Wu *et al.*, 2003). همچنین، گزارش شده که اسیدهای آمینهٔ عطرزا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان، و فنیل آلانین

(Rajapakse *et al.*, 2005) و اسیدهای آمینهٔ آبگریز والین، لوسین، آلانین، و متیونین نقش حیاتی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی ایفا می‌کنند (Mendis *et al.*, 2005). Suetsuna و همکاران پیشنهاد کردند که گروه‌های فنولیک هیدروکسیل در اسیدهای آمینهٔ آروماتیک عامل مهارکردن رادیکال آزادند که دهندهٔ الکترون‌اند و اسیدهای آمینهٔ هیستیدین، پرولین، آلانین، و لوسین در این امر دخیل‌اند (Suetsuna *et al.*, 2000).

هیستیدین ترکیبی آروماتیک است و قادر به تولید رادیکال‌های آزاد پایدار با انتقال ۱ الکترون است در حالی که، والین حاوی گروه‌های آلیفاتیک غیر قطبی است و قادر به واکنش با اسیدهای چرب بلندزنجیرهٔ غیر اشباع آبگریز است. گروه SH در سیستئین به تنهایی فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارد که به دلیل تداخل مستقیم آن با رادیکال آزاد است (Qian *et al.*, 2008). طبق نظریه‌ای گروه‌های فنولیک هیدروکسیل که در اسیدهای آمینهٔ آروماتیک یافت می‌شوند به دلیل الکترون‌دهندگی باعث حذف رادیکال آزاد می‌شوند (Suetsuna *et al.*, 2000). به علاوه، اسیدهای آمینهٔ دیگری چون هیستیدین، پرولین، آلانین، و لوسین حذف‌کنندهٔ رادیکال آزادند (Kim *et al.*, 2001). ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی تریپتوفان و تیروزین ممکن است به دلیل ظرفیت گروه‌های ایندولیک و فنولیک به‌منزلهٔ دهندهٔ هیدروژن باشد که باعث شکل‌گیری رادیکال‌های بیشتر پایدار ایندویل و فنوکسیل می‌شود. هیستیدین و تریپتوفان مشخصاً حاوی خواص آنتی‌اکسیدانی‌اند، زیرا فعالیت کلاته‌کردن و جذب رادیکال لیپیدی دارند که به دلیل وجود حلقهٔ ایمیدازول در ساختار هیستیدین است (Je *et al.*, 2004). به علاوه، اسیدهای آمینهٔ آروماتیک مثل تریپتوفان می‌توانند به‌راحتی دهندهٔ پروتون به رادیکال‌های دارای کمبود الکترونی باشند و می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی را از طریق ساختار رزونانسی انجام دهند (Rajapakse *et al.*, 2005).

در مطالعه‌ای که دربارهٔ ماهی کوبیا انجام شد (Chow and Yang, 2011) مقدار زیاد پرولین و هیدروکسی پرولین باعث ایجاد فعالیت حذف رادیکال شد. Yang و همکاران گزارش کردند که ژلاتین هیدرولیزشدهٔ کوبیا حاوی اسیدهای آمینهٔ آزاد و پپتیدهای با توالی خاص است که خاصیت الکترون‌دهندگی دارند و زنجیرهٔ فعالیت رادیکال آزاد را قطع می‌کنند (Yang *et al.*, 2008). در مطالعهٔ Ngo و همکاران نیز مشخص شده است که وجود اسیدهای آمینهٔ غیرآروماتیک مثل آلانین، پرولین، والین، و لوسین باعث اثر آنتی‌اکسیدانی می‌شود (Ngo *et al.*, 2010).

در جمع بندی می‌توان گفت پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی از فعالیت آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی برخوردار است. پپتیدهای زیست فعال می‌توانند به‌منزلهٔ ترکیبی اصلی از غذاهای کاربردی، زیست داروها، و مکمل‌های غذایی به کار روند. برخی از پپتیدهای زیست فعال اکنون به مرحلهٔ تولید صنعتی رسیده‌اند و در بازار کشورهایی چون ژاپن یافت می‌شوند. هر چند که پپتیدها می‌توانند با ترکیبات دیگر مثل کربوهیدرات و لیپید واکنش دهند (Korhonen *et al.*, 1998). به علاوه، ممکن است ترکیبات سمی یا حساسیت‌زا باشند بنابراین نیازی برای تحقیقات بیشتر دربارهٔ ایمنی غذاهای حاوی پپتیدهای زیست فعال احساس می‌شود. مطالعات کلینیکی اندکی دربارهٔ تأثیر مثبت

سلامتی پپتیدهای زیست فعال انجام شده است. بنابراین، مطالعات بیشتری باید برای توضیح اهمیت فیزیولوژیکی این پپتیدها در انسان انجام شود. در صورتی که پروتئین آبکافت امعا و احشا و گوشت ماهی یال اسبی از نظر زیستی و ایمنی برای انسان بی‌ضرر باشد و مطالعات کلینیکی آن را تأیید کند، می‌تواند به‌منزلهٔ افزودنی در صنایع غذایی و دارویی استفاده شود، اما قبل از آن نیاز به بررسی برای تولید در مقیاس صنعتی ضروری به نظر می‌رسد.

تقدیر و تشکر

این تحقیق با حمایت مالی و معنوی دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار در قالب طرح پژوهشی انجام شده است و نویسنده از دانشگاه برای فراهم‌کردن امکانات این تحقیق تشکر و قدردانی می‌کند.

References

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

[2]. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M., Nunes, M.L., 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (Aphanopus carbo) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry 45, 18–24.

[3]. Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. Canadian J Biochemistry and Physiology 37, 911–917.

[4]. 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 Agriculture and Food Chemistry 46, 49–53.

[5]. Chow, C.J., Yang, J.I., 2011. The effect of process variables for production of cobia (Rachycentron canadum) skin gelatin hydrolysates with antioxidant properties. Journal of Food Biochemistry 35, 715–734.

[6]. Dinis, T.C.P., Maderia, V.C.M., Almeida, M.L.M., 1994. Action of phenolic derivates as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Archive of Biochemistry and Biophysic 315, 161-169.

[7]. Dong, X.P., Zhu, B.W., Zhao, H.X., Zhou, D.Y., Wu, H.T., Yang, J.F., Li, D.M., Murata, Y., 2010. Preparation and in vitro antioxidant activity of enzymatic hydrolysates from oyster (Crassostrea talienwhannensis) meat. International Journal of Food Science and Technology 45, 978–984.

[8]. Flynn, K.J., 1988. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. Chemical Ecology 3, 269–293.

[9]. Fu, X., 2003. Effect of plant leaf protein on lipotropy peroxidase system of rats. Chinees Journal of Veterinarian Science and Technology 11, 49–50.

[10]. Gibbs, B.F., Zougman, A., Masse, R., Mulligan, C., 2004. Production and characterization of bioactive peptides from soy hydrolysate and soy-fermented food. Food Research International 37, 123–31.

[11]. Grice, H.C., 1998. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. Food Chemical Toxicology 26, 717-723.

[12]. Guerard, F., Duffose, L., De La Broise, D., Binet, A., 2001. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using Alcalase. Journal of Molecular Catalisis B :Enzymatic 11, 1051–1059.

[13]. Gulcin, I., Sat, I., Beydemir, S., Elmastas, M., Kufrevioglu, O.I., 2004. Comparison of

antioxidant activity of clove (Eugenia caryophylata Thunb) buds and lavender (Lavandula stoechas L). Food Chemistry 87, 393-402.

[14]. Ito, N., Fukushima, S., Tsuda, H., 1985. Carcinogenicity and modification of the carcinogenic response by BHA, BHT and other antioxidants. CRC Critical Review in Toxicology 15, 109–150.

[15]. Jao, C.L., Ko, W.C., 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolysates from tuna cooking juice. Fisheries Science 68, 430–435.

[16]. Je, J.Y., Park, P.J., Kim, S.K., 2004. Free radical scavenging properties of terochitooligo saccharides using an ESR spectroscopy. Food Chemical Toxicology 42, 381-387.

[17]. Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K., 2007. Purification and characterization of n antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry 42, 840–846.

[18]. 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 Food Chemistry 49, 1984–1989.

[19]. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Shahidi, F., 2009. Characteristics and Use of Yellow Stripe Trevally Hydrolysate as Culture Media. J Food Sci 74, 6.

[20]. Korhonen, H., Pihlanto-Leppala, A., Rantamaki, P., Tupasela, T., 1998. Impact of processing on bioactive proteins and peptides. Trends in Food Science and Technology 9, 307–319.

[21]. Liaset, B., Nortvedt, R., Lied, E., Espe, M., 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmo salar, L.) frames by protamexTM protease. Process Biochemistry 37, 1263- 1269.

[22]. Megías, C., Pedroche ,J., Yust, M.M., Girón-Calle, J., Alaiz, M., Millán, F., Vioque, J., 2008. Production of copper-chelating peptides after hydrolysis of sunflower proteins with pepsin and pancreatin. Food Science and Technology 41, 1973–1977.

[23]. Mendis, E., Rajapakse, N., Kim, S.K., 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural Food Chemistry 53, 581–587.

[24]. Moure, A., Domínguez, H., Parajó, J.C., 2006. Antioxidant properties of ultrafiltration recovered soy protein fractions from industrial effluents and their hydrolysates. Process Biochemistry 41, 447–456.

[25]. Naqash, S.Y., Nazeer, R.A., 2011. Evaluation of bioactive properties of peptide isolated from Exocoetus volitans backbone. International Journal of Food Science and Technology 46, 37–43.

[26]. Ngo, D.H., Qian, Z.J., Ryu, B., Park, J.W., Kim, S.K., 2010. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (Oreochromis niloticus) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. J Functional Foods 2, 107–117.

[27]. Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction prepared from glucoseamine. Japonian Journal of Nutrition 44, 307-314.

[28]. Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I ,.Sannier, F., Thorkelsson, G., Bergé, J.P., Guérard, F., Chabeaud, A., Piot, J.M., 2006. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. Process Biochemistry 41, 1217–1222.

[29]. Qian, Z.J., Jung, W.K., Kim, S.K., 200 ۸Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, Rana catesbeiana Shaw. Bioresours Technology 99, 1690–1698.

[30]. Rajapakse, N., Mendis, E., Byun, H.G., Kim, S.K., 2005. Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. Journal of Nutrition Biochemistry 16, 562–569.

[31]. Saito, K., Jin, D.H., Ogawa, T., Muramoto, K., Hatakeyama, E., Yasuhara, T., Nokihara, K., 2003. Antioxidative properties of tripeptide libraries prepared by the combinatorial chemistry. Journal of Agricultural Food Chemistry 51, 3668–3674.

[32]. Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K., Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the antioxidantion of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of Agricultural Food Chemistry 40, 945–948.

[33]. Slizyte, R., Dauksas, E., Falch, E., Storrø, I., Rustad, T., 2005. Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (Gadus morhua) byproducts. Process Biochemistry 40, 2021–2033.

[34]. Suetsuna, K., Maekawa, K., Chen, J., 2004. Antihypertensive effects of Undaria pinnatifida (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Journal of Nutrition Biochemistry 15.

[35]. Suetsuna, K., Ukeda ,H., Ochi, H., 2000. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. Journal of Nutrition Biochemistry 11, 128–131.

[36]. Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A., Habibi Rezaie, M., 2011. Optimization of Gold Stripe Sardine (Sardinella Gibossa) Protein Hydrolysate Using Alcalase® 2.4l by RSM. CyTA Journal of Food 9, 114–120.

[37]. Thiansilakul, Y., Benjakul, S., Shahidi, F., 2007. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. Journal of Food Biochemistry 31, 266–287.

[38]. Tsumura, K., Kugimiya, W., Bando, N., Hiemori, M., Ogawa, T., 1999. Preparation of hypoallergenic soybean protein with processing functionality by selective enzymatic hydrolysis. Food Science and Technology 5, 171–175.

[39]. 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, 949−957.

[40]. Yan, Y., Chen, J., Lu, H., Hou, G., Lai, J., 2012. Feeding habits and ontogenetic diet shifts of hairtail, Trichiurus margarites, in the Beibu Gulf of the South China Sea. Acta Ecol Sinica 32, 18–25.

[41]. Yang, J.I., Ho, H.Y., Chu, Y.J., Chow, C.J., 2008. Characteristic and antioxidative activity of retorted gelatin hydrolysate from cobia (Rachycentron canadum) skin. Food Chemistry 110, 128–136.

[42]. Zhong , S., Ma, C., Lin, Y.C., 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, 1636–1642.