بررسی خواص زیست فعالی پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون *Saurida tumbil*

سمیه بهرام[۱*]، محمد خضری[۲]، سید روح الله جوادیان[۳]

[۳،۱] گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران

[۲] گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج.

[*]مسئول مکاتبه: Bahramsomi@gmail.com

تاریخ دریافت : ۹۸/۲/۷

چکیده

پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون با استفاده از آنزیم پاپائین در دو غلظت ۲ و ۴ درصد و در دو زمان ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه تهیه شد و خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی آن ارزیابی شد. بررسی اثرات ضدباکتریایی پروتئین‌های هیدرولیزشده با استفاده از روش انتشار دیسک بر علیه باکتری‌های بیماری‌زای شامل اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، استرپتوکوکوس اینیه و سودوموناس آئروژینوزا، در غلظت‌های مختلف پپتید ۲/۳۴، ۴/۶۸، ۹/۳۷، ۱۸/۷۵، ۳۷/۵، ۷۵، ۱۵۰، ۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر مورد مطالعه قرار گرفت. همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با اندازه‌گیری قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH، ABTS و رادیکال آزاد هیدروکسیل مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین-های هیدرولیزشده بوسیله آنزیم پاپائین هیچ‌گونه فعالیت ضدباکتریایی حتی در بالاترین غلظت مورد مطالعه (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان ندادند. پروتئین‌های هیدرولیزشده فعالیت آنتی اکسیدانی قابل توجهی را نشان دادند و بالاترین میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل به ترتیب ۴۳/۷۲، ۷۸/۶۴ و ۴۶/۰۳ درصد و در تیمار ۴ درصد آنزیم و زمان ۱۸۰ دقیقه به‌دست آمد. پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون فعالیت ضدباکتریایی نشان نداد، امامی‌توان آن رابه‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در نظر گرفت.

واژه‌های کلیدی: ماهی حسون، پروتئین هیدرولیزشده، آنزیم پاپائین، فعالیت ضدباکتریایی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

Journal of Aquatic Caspian Sea (J. A. C. S)

مقدمه

پروتئین‌های موجود در رژیم غذایی به‌طور معمول به‌عنوان منبع انرژی و آمینواسیدهای ضروری در نظر گرفته می‌شوند که جهت رشد و حفظ عملکردهای فیزیولوژیکی موردنیاز هستند، اما در سال‌های اخیر نقش پروتئین‌های غذایی به‌عنوان ترکیباتی که ازنظر فیزیولوژیکی فعال هستند بسیار مورد توجه قرارگرفته است. به‌این‌ترتیب تحقیقات زیادی به تولید و بررسی ویژگی-های پپتیدهای موسوم به پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از منابع گیاهی و حیوانی پرداخته‌اند (مویدی و همکاران، ۱۳۹۵). پپتیدهای زیست فعال به طور عمده از منابع پروتئینی گیاهی و جانوری به‌دست می‌آیند. شواهد علمی روزافزونی وجود دارد که بسیاری از پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز مشتق شده از منابع دریایی قادرند سلامتی انسان را ارتقا داده و از بروز بیماری‌های مزمن جلوگیری کنند (ربیعی و همکاران، ۱۳۹۵).

در طول دهه‌های گذشته به‌دلیل نگرانی مصرف‌کنندگان از اثرات جانبی آنتی‌بیوتیک‌های سنتزی و همچنین تمایل مصرف-کنندگان به مصرف ترکیبات طبیعی، علاقه‌مندی به پپتیدها و هیدرولیز شده‌های ضدمیکروبی بیشتر شده است. این پپتیدها در مقایسه با آنتی‌بیوتیک‌ها و نگهدارنده‌های شیمیایی و سنتزی علیه طیف وسیع‌تری ازعوامل بیماریزا و فسادزا مؤثر می‌باشند درحالیکه سمیت سلولی کمتری برای سلول‌های یوکاریوت دارند (مویدی و همکاران، ۱۳۹۵). پژوهش‌های علمی متعدد نشان داده است که پروتئین هیدرولیز شده آبزیان توانایی آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند و می‌توانند در غذاهای کارکردی، صنایع دارویی و غذاداروها استفاده شوند (خارکی و همکاران، ۱۳۹۶؛ سلیمانی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Jeevitha *et al*., 2014). آنتی‌اکسیدان-ها با اهدای یک اتم هیدروژن یا یک الکترون به رادیکال تشکیل شده از چربی های غیر اشباع مانع اکسیداسیون می شوند و می‌توانند واکنش‌های زنجیره‌ای را با از بین بردن آغازگرها یا رادیکال‌های واسطه از محیط و یا از طریق غیر فعال کردن کاتالیست‌های فلزی خاتمه دهند (رمضان‌زاده و همکاران، ۱۳۹۵). یکی از کارامدترین آنزیم‌ها جهت هیدرولیز پروتئین پاپائین است. پاپائین یک آنزیم پروتئولیتیک است که از شیرابه میوه نارس گیاه خربزه درختی با نام علمی *Carica papaya* L. به دست می‌آید و به‌طور گسترده‌ای در صنایع غذایی استفاده می‌شود (Wisuthiphaet *et al*., 2016).

ماهی حسون (*Saurida tumbil*) گونه‌ای از ماهیان آب شور و از خانواده Synodontidae است. این ماهی با نام کریشو (کیجار بزرگ) به عنوان یکی از گونه‌های صید دور ریز در آب‌های جنوب کشور محسوب می‌شود. در بررسی انجام شده توسط اسکندری و همکاران (۱۳۹۵) این گونه ۳۵/۹۱ درصد از آبزیان دور ریز شده در تور ترال در سواحل خوزستان را تشکیل داده است و به عنوان گونه تجاری ریز از آن نام برده شد. در پژوهش حاضر از آنزیم پاپائین برای تولید پروتئین هیدرولیزشده از ماهی حسون استفاده شد و خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده با استفاده از روش انتشار دیسک و فعالیت آنتی-اکسیدانی آن با اندازه‌گیری درصد مهار رادیکال های DPPH، ABTS و رادیکال آزاد هیدروکسیل بررسی شد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مواد و روش کار

تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی

مطالعه حاضر در آزمایشگاه پارک علم و فناوری مازندران (ساری) در سال ۱۳۹۶ انجام گردید. ماهی‌های حسون (*Saurida tumbil*) با طول متوسط ۳۵ سانتی‌متر از بازار استان بوشهر خریداری شد و پس از انجماد در فریزر با استفاده از ظروف یونولیتی به آزمایشگاه منتقل و تا زمان شروع آزمایش‌ها در آن‌جا نگهداری شد. پس از انجمادزدایی در یخچال، سرزنی، تخلیه امعاء و احشاء، کندن پوست و استخوان‌گیری ماهی‌ها انجام شد و با آب سرد شستشو داده شد. سپس دو بار با چرخ گوشت، چرخ گردید و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس ۵۰ گرم گوشت ماهی در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و به مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری (رادطب نوین، SL 910، ایران) با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیر فعال سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. در ادامه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم اضافه شد. سپس آنزیم با نسبت ۲ و ۴ درصد (بر حسب میزان پروتئین نمونه) اضافه شد و نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور متحرک (نور صنعت فردوس، SHE، ایران) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۹۰ و ۱۸۰دقیقه قرار داده شدند. تیمار دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه برای غیر فعال کردن آنزیم استفاده گردید. پس از خنک شدن در دمای اتاق نمونه‌ها در دمای ۱۰ درجه به مدت ۳۰ دقیقه در دور g ×۷۰۰۰ سانتریفیوژ (Labnet, C6، آمریکا) شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در دستگاه خشک‌کن انجمادی (گزلین طب ایران،GTFD-40، ایران) قرار داده شد تا به‌صورت پودر درآیند (اویسی‌پور و همکاران، ۲۰۰۹).

آنالیز تقریبی گوشت ماهی حسون

میزان رطوبت، چربی و خاکستر نمونه‌ها به روش AOAC (2002) و پروتئین به روش AOAC (2005) اندازه‌گیری شد.

تعیین میزان بازیافت پروتئین

جهت تعیین بازیافت پروتئینی میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت حاصل از هیدرولیز آنزیمی با روش بیورت تعیین شد و میزان بازیافت پروتیئنی از طریق فرمول زیر محاسبه شد (James ، ۱۹۹۵).

$$\text{بازیافت پروتئینی} = \frac{\text{میزان کل پروتیئن محلول}}{\text{پروتئین کل}} \times ۱۰۰$$

آزمون میکروبی

در تحقیق حاضر باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، استرپتوکوکوس اینیه و سودوموناس آئروژینوزا برای بررسی اثرات ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون، مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی اثرات ضدباکتریایی از روش انتشار دیسک استفاده شد. بدین منظور سوسپانسیون فعال هر کدام از باکتری‌های

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

مورد مطالعه روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شدند. غلظت‌های مختلف پروپئین هیدرولیز شده (تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی-لیتر که حداکثر غلظت قابل حل پروتئین هیدرولیز شده بود) تهیه شد و ۲۵ میکرولیتر از این محلول‌ها روی دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر تلقیح شد. پس از خشک شدن دیسک‌ها به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت، بوسیله پنس استریل روی محیط آگار قرار داده شدند. بعد از این مرحله، پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی-گراد به مدت۴۸-۲۴ ساعت قرار گرفتند.. به منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضدباکتریایی از آنتی بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به عنوان کنترل منفی استفاده شد (خضری و همکاران، ۱۳۹۵).

اندازه‌گیری فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH [1]

۱ میلی‌لیتر از هر نمونه پروتئین هیدرولیزشده در غلظت‌های مختلف (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر آب مقطر) با ۱ میلی-لیتر ازمحلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار (تهیه شده در اتانول ۹۹/۵ درصد) مخلوط گردید. سپس به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه داشته شد و جذب رادیکال آزاد در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری گردید. در نمونه کنترل از آب مقطر استفاده شد. فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH با فرمول زیر محاسبه شد (Aleman و همکاران، ۲۰۱۱).

۱۰۰×[(میزان جذب شاهد / میزان جذب نمونه مورد آزمایش – میزان جذب شاهد)- ۱] =درصد مهار رادیکال آزاد DPPH

اندازه‌گیری قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS[2]

۷/۴ ABTS میلی‌مولار با پتاسیم پرسولفات ۲/۶ میلی‌مولار به نسبت (۱:۱) ترکیب و ۱۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده شد. ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیزشده با ۲۸۵۰ میکرولیتر ABTS مخلوط شده و پس از ۲ ساعت در دمای اتاق جذب نوری آن اندازه‌گیری شد. در نمونه کنترل از آب مقطر استفاده شد. درصد مهار رادیکال‌های ABTS با فرمول زیر محاسبه شد (Aleman *et al.*, 2011).

۱۰۰×[(میزان جذب شاهد / میزان جذب نمونه مورد آزمایش)- ۱] =درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل

۰/۱ فنانترولین و نمونه پروتئین هیدرولیزه به لوله آزمایش اضافه و مخلوط شدند. سپس محلول FeSO4 به میزان ۱میلی-لیتر مخلوط اضافه و در نهایت با افزودن ۱ میلی‌لیتر H_2O_2 واکنش آغاز شد. پس از ۶۰ دقیقه جذب نوری در ۵۳۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط فاقد پروتئین هیدرولیز کنترل منفی و مخلوط فاقد H_2O_2 و حاوی پروتئین هیدرولیز به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد با فرمول زیر محاسبه شد (Smirnoff and Cumbes, 1999).

[1] 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazyl

[2] 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل (درصد)$=\frac{(\text{جذب نوری نمونه}-\text{جذب نوری کنترل منفی})}{(\text{جذب نوری بلانک}-\text{جذب نوری کنترل منفی})}\times 100$

تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار SPSS نسخه ۱۸ برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، از روش آنالیز واریانس (ANOVA) و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. نتایج به صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شد و و از نرم افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج و بحث

تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی عضله ماهی حسون در جدول ۱ نشان داده شده است.

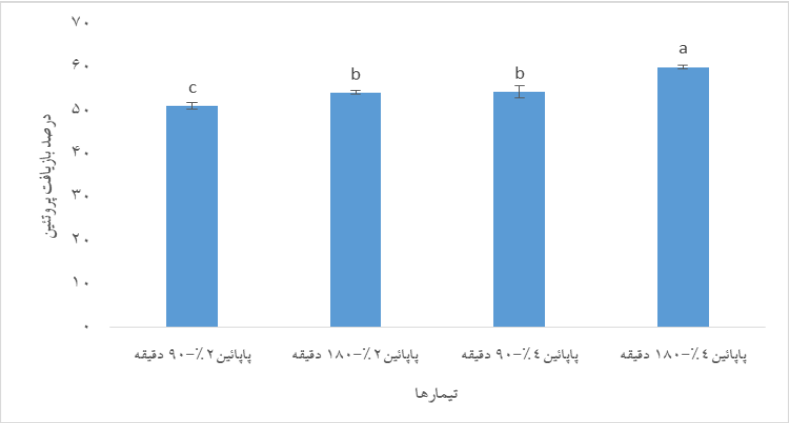
جدول ۱- ترکیبات شیمیایی ماهی حسون (میانگین±انحراف معیار)

پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
۱۹/۷۱±۱/۶۸	۴/۴۱±۰/۰۹	۷۴/۸۰±۱/۹۹	۱/۲۹±۰/۰۱

میزان بازیافت پروتئین

نتایج مربوط به میزان بازیافت پروتئین (شکل ۱) نشان می‌دهد که با افزایش غلظت آنزیم از ۲ درصد به ۴ درصد و نیز با افزایش زمان هیدرولیز از ۹۰ دقیقه به ۱۸۰ دقیقه، میزان بازیافت پروتئین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ($P<0/05$). میزان بازیافت پروتئینی نشان دهنده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های یک ماده می باشدکه به خصوصیات ماده مورد نظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیم بستگی دارد (رفعتی‌نیا و رومیانی، ۱۳۹۷). در پژوهش حاضر با افزایش غلظت آنزیم و نیز با افزایش زمان هیدرولیز میزان بازیافت پروتئین افزایش یافت و بالاترین میزان بازیافت پروتئین (۵۹/۹ درصد) در تیمار ۴ درصد آنزیم و زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد. بالارفتن میزان بازیافت پروتئین با افزایش غلظت آنزیم و زمان می‌تواند به دلیل افزایش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم و نیز افزایش سرعت واکنش باشد (پاسدار و همکاران، ۱۳۹۲). رفعتی‌نیا و رومیانی (۱۳۹۷) با پژوهش بر روی پروتئین هیدرولیزشده ماهی کپور علفخوار (*Ctenopharyngodon idella*) و پاسدار و همکاران (۱۳۹۲) با تحقیق روی پروتئین هیدرولیزشده ماهی تون زردباله (*Thunus albacara*) به نتایج مشابه دست یافتند.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)



شکل۱- میزان بازیافت پروتئین هیدرولیز شده بوسیله آنزیم پاپایین در تیمارهای مختلف

داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<۰/۰۵$).

فعالیت ضدمیکروبی

همان‌طورکه در جدول ۲ مشاهده می‌شود، پروتئین‌های هیدرولیز شده بوسیله آنزیم پاپائین هیچ‌گونه فعالیت ضدباکتریایی حتی در بالاترین غلظت مورد مطالعه (۳۰۰ و ۶۰۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه نشان ندادند. پژوهش‌های متعدد نشان داده‌اند که پپتیدهای جداشده از آبزیان دارای خواص ضدباکتریایی هستند (Liu *et al.*, 2008 ; Pezeshk *et al.*, 2017)، که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت دارد. در این راستا گزارش شده‌است که برای تولید پپتیدهای ضدمیکروبی نیاز به هیدرولیز شدید پروتئین و تولید پپتیدهای بسیار کوچک نیست (مویدی و همکاران، ۱۳۹۵). هیدرولیز شده‌های دارای درجه هیدرولیز بسیار پایین و بسیار بالا، فاقد فعالیت ضدباکتریایی هستند. برعکس در درجه هیدرولیزهای بینابینی فعالیت ضدباکتریایی مطلوبی حاصل می‌شود (Sila *et al.*, 2014). با این وجود گزارشاتی نیز مبنی بر عدم فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده در درجه هیدرولیز خاص وجود دارد، که نتایج مطالعه حاضر را تایید می‌کنند (Zhang *et al.*, 2015 ; Kumar, 2013). Zhang و همکاران (۲۰۱۵) با پژوهش روی اویستر (*Crassostrea gigas*) گزارش نمودند فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده اویستر به میزان درجه هیدرولیز بستگی دارد، به‌طوریکه در درجه هیدرولیزهای ۳۰/۱۲ ، ۳۲/۶۹ و۳۸/۴۷ درصد و غلظت‌های ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر پپتید هیچ‌گونه فعالیت ضدباکتریایی علیه باکتری‌های اشریشیاکلی، باسیلوس سرئوس، استافیلوکوکوس اورئوس، لیستریا مونوسیتوژنز، سودوموناس آئروژینوزا و چند گونه از جنس ویبریو مشاهده نشد، اما با افزایش درجه هیدرولیز به ٪۳۹/۸۹ و در غلظت‌های بالای پپتید اثر ضدباکتریایی مشاهده شد.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

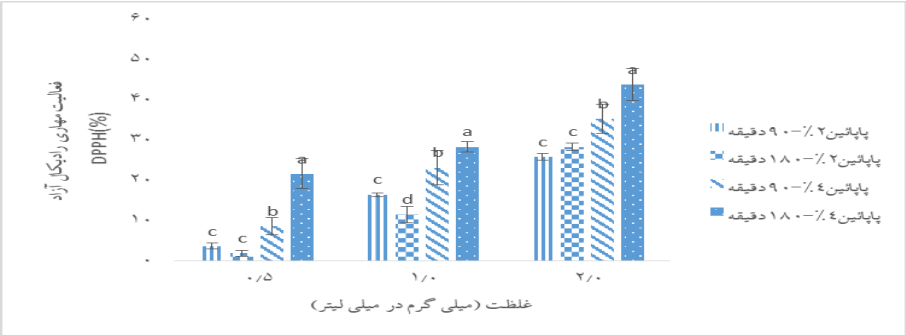
جدول ۲– فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده در غلظت‌های مختلف بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه

غلظت پپتید (میلی‌گرم/میلی لیتر)	*E coli*	*Pseudomonas aeruginosa*	*S. aureus*	*streptococcus iniae*	*B. cereus*	*L. monocytogenes*
۶۰۰	-	-	-	-	-	-
۳۰۰	-	-	-	-	-	-
۱۵۰	-	-	-	-	-	-
۷۵	-	-	-	-	-	-
۳۷/۵	-	-	-	-	-	-
۱۸/۷۵	-	-	-	-	-	-
۹/۳۷	-	-	-	-	-	-
۴/۶۸	-	-	-	-	-	-
۲/۳۴	-	-	-	-	-	-

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH

در شکل ۲ نتایج مربوط به درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH نشان می‌دهد که همه غلظت‌های پروتئین هیدرولیز شده توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را دارند. بالاترین فعالیت مهارکنندگی در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید و در تیمار پاپایین ۴٪ و زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه (به میزان ۴۳/۷۲ درصد) مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). در پژوهش حاضر با افزایش غلظت پپتید و آنزیم، میزان مهار رادیکال آزاد افزایش یافت که با نتایج سایر پژوهشگران در این زمینه مطابقت دارد. رمضان‌زاده و همکاران (۱۳۹۵)، نیز گزارش کردند که با افزایش غلظت ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. در پژوهش سلیمانی و همکاران (۱۳۹۵) نیز روی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) با افزایش غلظت آنزیم آلکالاز قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت پپتید می‌تواند به‌دلیل افزایش سرعت واکنش باشد (خواجوی و همکاران ۱۳۹۵). همچنین بالارفتن قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت آنزیم و نیز با افزایش زمان هیدرولیز می‌تواند به دلیل هیدرولیز بیشتر پروتئین وکوچکتر شدن اندازه پپتید باشد (Jeevitha et al., 2014؛ معتمدزادگان و همکاران، ۱۳۸۸). پژوهش معتمدزادگان و همکاران (۱۳۸۸) نیز نشان داد با افزایش فعالیت آنزیم پاپائین و زمان اثر آن درجه هیدرولیز پروتئین میوفیبریلار ماهی کیلکا افزایش و طول زنجیره پپتیدی حاصل از هیدرولیز کاهش یافت.

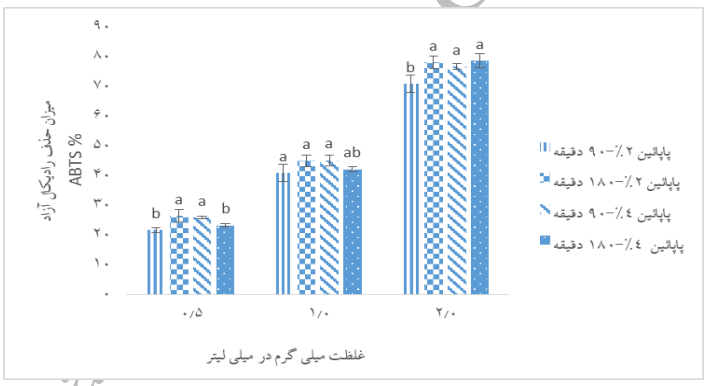
Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)



شکل ۲- قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده بوسیله آنزیم پاپایین در تیمارهای مختلف
داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS

شکل ۳ فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS توسط پروتئین هیدرولیز شده را نشان می‌دهد. با افزایش غلظت پپتید میزان مهار رادیکال آزاد ABTS افزایش یافت. بالاترین میزان مهار رادیکال آزاد در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید و در تیمار ۴٪ پاپائین و زمان ۱۸۰ دقیقه و به میزان ۷۷/۳۴ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین با افزایش غلظت پپتید میزان مهار رادیکال آزاد افزایش پیدا کرد. اسمعیلی خارکی و همکاران (۱۳۹۶)، نیز افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS را با افزایش غلظت پپتید در پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) گزارش نمودند. سلیمانی و همکاران (۱۳۹۵) نیز افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS را با افزایش غلظت پپتید در ماهی کیلکای معمولی گزارش نمودند که با نتایج پژوهش حاضر مطابقت دارد.



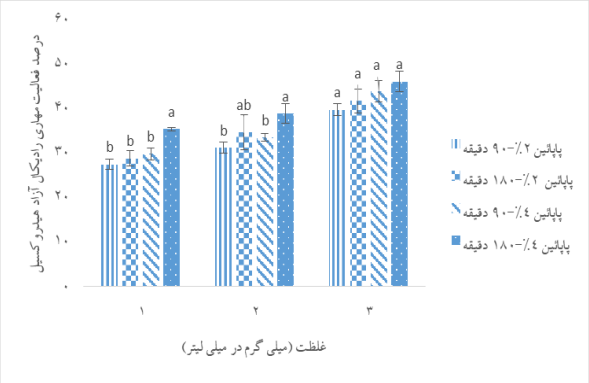
شکل ۳- قدرت مهار رادیکال آزاد Abts پروتئین هیدرولیز شده بوسیله آنزیم پاپایین در تیمارهای مختلف
داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل

همانطورکه در شکل ۴ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت پپتید و درصد آنزیم قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل افزایش یافت (P<۰/۰۵)، اما افزایش زمان هیدرولیز تاثیر معنی داری در افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل نداشت

Journal of Caspian Sea (J.A.C.S)

(P≥۰/۰۵). بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید و تیمار ۴ درصد آنزیم پاپائین مشاهد شد (۴۳/۰۳). قائمی و همکاران (۱۳۹۶) نیز با پژوهش روی پروتئین هیدرولیزشده ماهی کیلکای معمولی و Je و همکاران (۲۰۰۵) با تحقیق روی ماهی پروتئین هیدرولیزشده ماهی پولاک آلاسکا (*Theragra chalcogramma*) نشان دادند که فعالیت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل به غلظت پپتید وابسته است.



شکل ۴- قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده بوسیله آنزیم پاپایین در تیمارهای مختلف داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

یافته ترویجی

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که آنزیم پاپائین کارایی مناسبی در هیدرولیز ماهی حسون داشت و بازیافت پروتئین قابل توجهی را حاصل نمود. همچنین پروتئین هیدرولیز شده عضله ماهی حسون فاقد خواص ضدباکتریایی بر علیه باکتری‌های مورد مطالعه بود، اما با مهار رادیکال‌های آزاد خواص آنتی‌اکسیدانی مناسبی نشان داد. بر اساس نتایج به‌دست آمده تیمار ۴ درصد آنزیم و زمان ۱۸۰ دقیقه برای هیدرولیز پروتئین ماهی حسون پیشنهاد می‌گردد، هر چند که انجام مطالعات بیشتر در رابطه با ارتباط درجه هیدرولیز پروتئین و بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز جهت دستیابی به حداکثر کارایی آنزیم و تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص زیست فعالی بالاتر جهت کابرد به‌عنوان ترکیب طبیعی آنتی‌اکسیدانی به جای ترکیبات سنتتیک ضروری می‌باشد.

منابع

اسکندری، غ.، کوچک‌نژاد، ع.، میاحی، ی. و انصاری، ه.، ۱۳۹۵. صید دورریز در تور ترال توسط لنج‌های صیادی در شمال غرب خلیج فارس (خوزستان-ایران). مجله علوم و فنون دریایی، ۱۵(۱): ۹۹-۸۴.

اسمعیلی خارکی، م.، رضایی، م.، خدابنده، ص. و معتمدزادگان، ع.، ۱۳۹۶. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سرماهی هوور مسقطی. مجله علوم و فنون شیلات، ۷ (۱):۶۴-۵۷.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

پاسدار، ن.، معتمدزادگان، ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۲. اثر شرایط هیدرولیز بر اندازه مولکولی و درجه هیدرولیز پروتئین سر ماهی تون زردباله (*Thunus albacara*) با آنزیم آلکالاز. مجلّه ی نوآوری در علوم و فنّاوری غذایی، ۵(۱)، : ۶۲-۵۵.

حکمت‌پور، ف. و اسکندری، غ.، ۱۳۹۵. ارزش غذایی گونه های آبزی صید دورریز در سواحل استان خوزستان. نشریه فن آوری های نوین در توسعه آبزی پروری، ۱(۳): ۳۸-۲۷.

خضری احمداباد، م.، رضائی، م. و ذوالفقاری، م.، ۱۳۹۵. مطالعه امکان استفاده از عصاره جلبک *Enteromorpha intestinalis* به منظور کنترل برخی پاتوژن‌های غذایی. فصلنامه علوم و صنایع غذایی، ۵۸(۱۳): ۸۱-۹۱.

خواجوی، س.، زکی‌پور رحیم آباد، ا.، غفاری‌مقدم، م.، شهرکی، ه.، میر، ل. و زند کریمی، م.، ۱۳۹۵. اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات پروتئین ضایعات ماهی شیزوتراکس (*Schizothorax zarudnyi*). شیلات، مجله منابع طبیعی ایران، ۶۹(۳): ۳۵۸-۳۵۱.

رمضان‌زاده، ل.، حسینی، س. ف. و نیکخواه، م.، ۱۳۹۵. هیدرولیز آنزیمی ژلاتین پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی آن. مجله علوم و فنون شیلات، ۵(۲): ۴۴-۲۹.

ربیعی، ش.، نیکو، م.، رضایی، م. و رفیعیان کوپایی، م.، ۱۳۹۵. مروری بر اثرات درمانی پپتیدهای زیست فعال آبزیان در مدلهای جانوری و انسان. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، ۲(۲) ،: ۷۹-۶۷.

رفعتی‌نیا، آ. و رومیانی، ل.، ۱۳۹۷. اثر آنزیم، زمان و دما بر برخی ویژگی های پروتئین هیدرولیز شدهٔ امعاواحشا کپور علف خوار. مجله پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۷(۳) : ۲۶۹-۲۸۰.

سلیمانی، م.، حسینی، س. ف. و نیکخواه، م.، ۱۳۹۵. ارزیابی فعالیت ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*). مجله علوم و فنون شیلات، ۵(۳)۵: ۹۵-۱۰۸.

قائمی، و.، علیزاده دوغیکلایی، ا. و کردجزی، م.، ۱۳۹۶. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultriventris caspia*) و عصاره جلبک قهوه‌ای *Colpomenia sinuosa*. فیزیولوژی و بیوتکنولوژی، ۵(۴): ۲۵-۱.

معتمدزادگان، ع.، شهیدی، ف.، مرتضوی، س.ع.، پورآذرنگ، ه.، حمزه، ش.، شهیدی یاساقی، س. ا.، قربانی حسن سرآیی، آ. و خانی‌پور، ا.، ۱۳۸۸. اثر آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا. مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، ۱۶(۳):۱۰-۱.

مویدی، ع.، نیک پیام، م.، خمیری، م. و امیری عقدایی، س.س.، ۱۳۹۵. فعالیت ضدباکتریایی هیدرولیز شده های پروتئینی به-دست آمده از هضم آنزیمی ایزوله پروتئینی سویا بر برخی باکتری‌های شاخص مواد غذایی. فصلنامه میکروبیولوژی کاربردی در صنایع غذایی، ۳ (۲): ۳۱-۲۲.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

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

AOAC. 2005. Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.

AOAC (Association of Official Analytical Chemists),. 2002. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.), Washington DC.

James, C.S., 1995. Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic and Professional.

Je, J.Y., Park, P.J. and Kim, S.K., 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Research International, 38: 45–50.

Jeevitha, K., mohana priya, K. and Samanta, S.K., 2014. Antioxidant activity of Fish Protein Hydrolysates from *Sardinellalongiceps.* International Journal of Drug Development and Research, 6 (4): 137-145.

Kumar, L.V., 2013. Antimicrobial activity of biopeptides extracted from fish protein hydrolaysate. Thesis submitted in part fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Fisheries Science in Fish Processing Technology to the Tamilnadu Veterinary and Animal Science University, Chennai. 79 pp.

Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H. and Zhao, Y., 2008. Production of cysteine-rich antimicrobialpeptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. Food Control,19: 231-235.

Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. and EsmaeiliMolla, A., 2009. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. Journal of International AquaticResearch, 1: 31-38.

Pezeshk, S., Ojagh, S.M. Rezaei, M. and Shabanpour, B., 2017. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. Journal of Genetic Resources, 3(2):103-112.

Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R. and Nasri, M., 2014. Antibacterial peptides from barbelmuscle protein hydrolysates: Activity against somepathogenic bacteria. Food Science and Technology, 55(1): 183-8.

Smirnoff, N. and Cumbes, Q.J., 1999. Hydroxyl radical scavenging activity of compatible solutes. Phytochemistry, 28: 1057–1060.

Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bubmann, B. and Beermann, C., 2016. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chemistry, 205: 221-228.

Wisuthiphaet, N., Klinchan, S., Kongruang, S., 2016. Fish protein hyrolysate production by acid and enzymatic hydrolysis. International Journal of Applied Science and Technology, 9 (4): 261-270.

Zhang, L., Liu, Y., Tian, X. and Tian, Z., 2015. Antimicrobial capacity and antioxidant activity of enzaymatic hydrolysates of protein from rushan bay oyster (*Crassostrea gigas*). Food Processing and Preservation, 39: 404–412.

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)

Evaluation of bioactivity of protein hydrolysate of *Saurida tumbil*

Somayeh Bahram[1*], Mohammad Khezri[2], Seyed Rohollah Javadian[3]

[1,3] Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

[2] Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran.

Bahramsomi@gmail.com

Abstract*:*

Fish protein hydrolysate (FPH) from lizardfish (*Saurida tumbil*) using papain enzyme at two concentrations of 2 and 4% at two hydrolysis times of 90 and 180 min was prepared and its antibacterial and antioxidant activity were evaluated. The antibacterial activity of FPH against pathogenic bacteria including *Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Streptococcus iniae* and *Pseudomonas aeruginosa* at different concentrations of peptide (2.34, 4.68, 9.37, 18.75, 37.5, 75, 150, 300 and 600 mg / ml) were studied using agar disc diffusion method. Also, the antioxidant activity of FPH was investigated by measuring DPPH, ABTS and OH free radical scavenging activity. Hydrolyzed proteins by the papain enzyme did not show any antibacterial activity against studied bacteria even at the highest studied FPH concentrations (3300 and 600 mg/ml). Protein hydrolysates showed remarkable antioxidant activity and the highest DPPH (43.72%), ABTS (78.64%) and OH (46.03%) free radical scavenging were observed respectively in 4% enzyme and 180 min treatments. The hydrolyzed protein of *Saurida tumbil* did not show antibacterial activity, but it can be considered as a natural antioxidant.

Keywords: Lizardfish, Fish Protein Hydrolysates, Papain Enzyme, Antibacterial activity, Antioxidant activity

Journal of Aquatic Caspian Sea (J.A.C.S)