

بررسی خصوصیت آنتی اکسیدانی دو نوع پروتئین آبکافت حاصل از صدف اویستر

علی طاهری^{۱*}، امین اوجی فرد^۲، سمیرا جلالی نژاد^۳، بهنام (ع) مظفری^۴

چکیده

زمینه و هدف: امروزه، استرس اکسیداتیو که منجر به تغییر کیفیت ماده غذایی و بروز بیماری‌های مختلف مانند سرطان یا گستره‌ای از بیماری‌های دیگر در بدن انسان می‌شود مورد توجه است. در این مطالعه خواص آنتی اکسیدانی و پروفیل اسیدآمینه محصولات تولیدی بررسی شد.

روش بررسی: در این مطالعه، پروتئین آبکافت صدف اویستر (*Saccostrea cucullata*) با استفاده از آنزیم‌های پاپائین و تریپسین تولید شد. فعالیت آنتی اکسیدانی محصول با آزمون‌های فعالیت مهار رادیکال آزاد (DPPH)، فعالیت کلاته کنندگی و فعالیت کاهندگی آهن در دو غلظت ۰/۵ و ۱ میلی گرم در میلی لیتر پروتئین بررسی گردید. همچنین ترکیب اسیدآمینه محصولات با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع فاز بالا، سنجش و شاخص شیمیایی محاسبه شد.

یافته‌ها: بالاترین میزان فعالیت مهار رادیکال DPPH، فعالیت کلاته کنندگی و فعالیت کاهندگی آهن برای محصول پاپائین به ترتیب $0.31 \pm 0.67/66\%$ ، $0.12 \pm 0.88/34\%$ و $0.12 \pm 0.99/9\%$ و برای محصول آنزیم تریپسین به ترتیب $0.22 \pm 0.52/17\%$ ، $0.09 \pm 0.77/11\%$ و $0.02 \pm 0.65/8\%$ برآورد شد. بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی در ۱ میلی گرم در میلی لیتر دیده شد ($p < 0.05$). بیشترین میزان اسیدهای آمینه ضروری شامل: هیستیدین، لیزین، لوسین و متیونین بود. شاخص شیمیایی برای اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین، بالاتر از ۱ و بقیه اسیدهای آمینه ضروری، کمتر از یک تعیین گردید.

نتیجه گیری: پروتئین آبکافت تولیدشده از صدف اویستر با آنزیم پاپائین، سپس تریپسین، قدرت آنتی اکسیدانی خوبی نشان می‌دهد که ترکیب اسیدهای آمینه آبگیر مناسب در این مسئله دخیل است. محصولات تولیدی در صورت کارآزمایی بالینی می‌تواند جهت صادرات دارویی به کار رود.

کلید واژه‌ها: پروتئین آبکافت؛ آنتی اکسیدان؛ پاپائین؛ تریپسین؛ آمینواسیدها.

^۱دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران.

^۲دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه خلیج فارس بوشهر، بوشهر، ایران.

^۳دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

^۴دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران.

*نویسنده مسئول مکاتبات:

علی طاهری، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران؛

آدرس پست الکترونیکی:

taheri@cmu.ac.ir

تاریخ دریافت: ۹۳/۷/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۲/۱۵

لطفاً به این مقاله به صورت زیر استناد نمایید:

Taheri A, Ojifard A, Jalalinezhad S, Mozaffari B. A study of antioxidant properties of two types of protein hydrolysate produced by oyster. Qom Univ Med Sci J 2016;9(11):60-68. [Full Text in Persian]

مقدمه

در دهه اخیر، بحث استرس اکسیداتیو که منجر به تغییر کیفیت ماده غذایی و بروز بیماری‌های مختلف مانند سرطان یا گستره‌ای از بیماری‌های دیگر در بدن انسان می‌شود بسیار مطرح بوده است (۱). در شرایط نرمال فیزیولوژیک، یک تعادل همواستاتیک بین تشکیل گونه‌های اکسیژن فعال و برداشتن آنها به وسیله ترکیبات آنتی اکسیدان درونی برقرار است (۲). استرس اکسیداتیو زمانی که این تعادل به هم بخورد با تولید کنترل نشده گونه‌های اکسیژن فعال شامل سوپراکسیدها، پراکسید هیدروژن و رادیکال‌های هیدروکسیل یا توسط دفاع ناکافی ترکیبات آنتی اکسیدان اتفاق می‌افتد. آنتی اکسیدان‌های کلیدی می‌توانند با مکانیسم‌های مختلف گونه‌های فعال اکسیژن را کاهش دهند (۳).

بسیاری از آنتی اکسیدان‌های صناعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول، بوتیل هیدروکسی تولوئن، بوتیل هیدروکسیون و پروپیل گالات برای جلوگیری از ایجاد اکسیداسیون به غذا اضافه می‌شوند. اما مسائل مربوط به سلامت و نگرانی مصرف کنندگان از مصرف محصولات سنتزی مصنوعی، محدودیت‌هایی را برای استفاده از این مواد به وجود آورده است (۴). بنابراین، علاقه و توجه زیادی برای شناسایی منابع جدید و طبیعی آنتی اکسیدان از صنایع لبنی، گیاهان و جانوران به وجود آمده که تحقیقات گسترده‌ای را در سالهای اخیر به خود اختصاص داده است (۵).

مطالعات و بررسی‌های زیادی مبنی بر توانایی پروتئین‌ها در جلوگیری از اکسایش لیپید در غذاها موجود است. براساس گزارشها، پپتیدهای زیست فعال تهیه شده از منابع مختلف غذایی دارای خواص ضد فشار خون (۵)، آنتی اکسیدان، ضد سرطان (۶) و ضد میکروبی می‌باشند.

پروتئین‌های آبکافت و پپتیدها از منابع غذایی مختلف، به عنوان ترکیبات فعال یا زیست فعال فیزیولوژیکی شناخته می‌شوند. پپتیدهای غذایی، خواص زیست فعال متعددی چون خواص ضد میکروبی، کاهش اثر فشار خون، توانایی کاهش کلسترول و خواص آنتی اکسیدانی دارند (۷). پروتئین آبکافت و پپتیدهای زیست فعال حاصل از آن، که پپتیدهای کوتاه زنجیر با خواص زیست فعال ویژه هستند؛ در توالی پروتئین مادری غیر فعال بوده و پس از آبکافت آنزیمی، فعالیت آن آزاد می‌شود.

این پپتیدها شامل ۲۰-۳ اسید آمینه هستند و فعالیت آنها وابسته به ترکیب اسیدهای آمینه و توالی آنها می‌باشد (۸). در مطالعات، گزارشهایی مبنی بر استفاده از ضایعات صنایع شیلاتی برای بازیافت این ترکیبات ارزشمند آمده است. اخیراً خواص آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت از منابع مختلف دریایی مثل ساردین، اویستر، صدف کَلَم و فلاندر گزارش شده است (۹-۱۲). افزودن آنزیم‌های خارجی می‌تواند روند آبکافت را قابل کنترل کرده و آن را تکرارپذیر کند. آنزیم‌های میکروبی و گیاهی به دلیل تولید پروتئین آبکافت در کوتاه ترین زمان و در شرایط متعادل نسبت به آنزیم‌های خنثی یا اسیدی به طور گسترده مورد استفاده قرار می‌گیرند (۱۳). مطالعات گسترده‌ای روی آبکافت آنزیمی ماهیان مختلف و احشای آنها توسط آنزیم‌هایی چون آلکالاز، پروتامکس و فلاووروزایم انجام شده است. در این خصوص، استفاده از آنزیم‌های گیاهی کمتر مطرح شده و آنزیم‌هایی چون پاپائین می‌تواند بدین منظور مفید باشد.

در بین منابع مختلف زیست دریایی موجود در جنوب ایران، فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای حاصل از آبکافت صدف اویستر که پراکنش وسیعی در آبهای سواحل چابهار دارد بررسی و مطالعه نشده است. بنابراین، در این مطالعه به شناسایی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف دریایی اویستر سواحل چابهار پرداخته شد.

روش بررسی

صدف اویستر (*Saccostrea cucullata*) در فصل پاییز از ساحل صخره‌ای بندر تیس در چابهار تهیه و تا زمان مصرف در دمای ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. آنزیم پاپائین نیز از شرکت سینوفارم تهیه و تا زمان مصرف در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. آنزیم تریپسین از شرکت مرک تهیه گردید. تمامی مواد مورد استفاده با خصوصیات آزمایشگاهی تهیه شدند.

صدف‌ها با دیلم و چکش خرد شده و گوشت آنها خارج و پس از چرخ شدن به ارلن مایرهای ۱۰۰ میلی لیتری اضافه گردید. ارلن‌ها برای ۲۰ دقیقه در ۸۵ درجه سانتیگراد برای غیر فعال کردن آنزیم‌های درونی، گرمادهی شدند (۱۴). نمونه‌ها در دمای اتاق خنک شده و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد برای ۲۰ دقیقه در

۶۰۰۰ دور جهت جدا کردن اضافات گوشت و چربی سانتریفوژ شدند. هر نمونه حاوی نسبت ۱:۱ از ۲۰ گرم گوشت چرخ شده و تیمارشده دمایی با آب مقطر بود که پس از اضافه کردن مقدار مورد نیاز آنزیم در دما و زمان مشخص، انکوباسیون صورت گرفت. پس از تیمار در مدت زمان مورد نیاز، مخلوط در حمام آبی ۸۵ درجه سانتیگراد قرار گرفت و آنزیم ها غیرفعال شدند. پروتئین آبکافت اویستر به وسیله دستگاه فریز درایر خشک و به پودر تبدیل گردید و تا زمان آزمایش در ۲۰- درجه سانتیگراد نگهداری شد. به منظور بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد، طبق روش Amit و همکاران (سال ۲۰۱۱)، محلول حاوی رادیکال آزاد DPPH به میزان ۰/۱۶ میلی مولار (۲ میلی لیتر) با نمونه مخلوط شد. جذب در ۵۱۷ نانومتر پس از نیم ساعت در دمای اتاق سنجیده شد. برای کنترل از محلول اتانول استفاده گردید و بوتیل هیدروکسی تولوئن در غلظت ۰/۰۲ میلی گرم بر میلی لیتر به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. فعالیت حذف رادیکال آزاد براساس فرمول ۱ سنجیده شد (۱۵).

فرمول ۱:

$$DPPH \text{ radical scavenging capacity } (\%) = 1 - \frac{A_{517} \text{ sample}}{A_{517} \text{ control}} \times 100$$

از روش Benjakul و همکاران (سال ۲۰۰۵) جهت سنجش فعالیت کلاته کردن یون آهن (II) استفاده گردید. محلول ۲ میلی مولار یون آهن فرو به نمونه اضافه و واکنش با افزودن ۲۰۰ میکرو لیتر فروزین ۵ میلی مولار متوقف گردید. مخلوط پس از تکان دادن، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. جذب در طول موج ۵۶۲ نانومتر مورد سنجش قرار گرفت و از یک شاهد بدون نمونه نیز استفاده گردید. اتیلن دی آمین تترا آمینو استیک اسید، به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ظرفیت کلاته کردن با فرمول ۲ ارزیابی گردید (۱۶):

فرمول ۲:

$$Fe^{2+} \text{ Chelating activity } (\%) = \frac{Blank - Sample}{Blank} \times 100$$

جدول شماره ۱: درصد فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف اویستر حاصل از آنزیم پاپائین

غلظت پروتئین محلول	فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH	فعالیت کلاته کردن یون آهن	قدرت کاهشی
۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر	۴۵/۳۳±۰/۵۱ ^c	۶۹/۱۹±۰/۰۵ ^c	۰/۷۸±۰/۱۱ ^b
۱ میلی گرم در میلی لیتر	۶۷/۶۶±۰/۳۱ ^b	۸۸/۳۴±۰/۱۲ ^b	۰/۹۹±۰/۱۲ ^b
شاهد	۸۰/۳۲±۱ ^a	۹۹/۲۳±۰/۱ ^a	۲/۲±۰/۰۲ ^a

مقادیر براساس انحراف معیار± میانگین بیان شده اند و حروف غیر هم نام در هر ستون نشان از اختلاف معنی دار می باشد

از روش Yildirim و همکاران (سال ۲۰۰۱)، جهت سنجش قدرت کاهندگی استفاده شد. ۱ میلی لیتر نمونه، فسفات بافر (۶/۶pH) و پتاسیم فری سیانید ۱٪ با هم ترکیب شدند. مخلوط، ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتیگراد انکوبه و سپس ۲/۵ میلی لیتر مخلوط تری کلرو استیک اسید ۱۰٪ به آن افزوده شد. قسمتی از مخلوط با ۲ میلی لیتر آب مقطر مخلوط شده و بعد از افزودن کلرید فریک ۱۰٪ و ۱۰ دقیقه جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر، سنجیده شد. از آسکوربیک اسید نیز به عنوان استاندارد استفاده گردید (۱۷).

پس از هضم در اسید کلریدریک ۶ مولار (دمای ۱۱۰ درجه سانتیگراد برای ۲۲ ساعت)، از کروماتوگرافی مایع فاز بالا (مدل کنوئر آلمان)، ستون و دتکتور فلوئورسنس استفاده شد (۱۸). شاخص شیمیایی پروتئین آبکافت شده براساس نسبت اسیدهای آمینه ضروری نمونه به اسیدهای آمینه ضروری استاندارد براساس فرمول ۳ سنجیده شد (۱۹، ۲۰).

فرمول ۳:

$$\text{اسید آمینه ضروری نمونه} = \frac{\text{اسید آمینه ضروری استاندارد}}{\text{شاخص شیمیایی}}$$

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۲۱، آزمون واریانس یک طرفه و دانکن آنالیز آماری شدند.

یافته ها

در خصوص فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH؛ غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر فعالیت، حذف بالاتری نسبت به غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر نشان داد و هر دو مورد اختلاف معنی داری با شاهد داشتند ($p < ۰/۰۵$). همچنین نتایج فعالیت کلاته کردن یون فلزی مشابه فعالیت حذف رادیکال آزاد بود ($p < ۰/۰۵$). اما در مورد قدرت کاهشی بین دو غلظت متفاوت پروتئینی، تفاوت معنی داری دیده نشد و هر دو با شاهد، اختلاف معنی دار داشتند ($p < ۰/۰۵$). در تمامی اندازه گیری ها، شاهد بالاترین اثر را نشان داد (جدول شماره ۱).

غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر، قدرت کلاته کنندگی به مراتب بالاتری از ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر نشان داد ($p < 0/05$). درمورد قدرت کاهشی نیز بین دو غلظت متفاوت پروتئینی، تفاوت معنی داری مشاهده شد و هر دو با شاهد، اختلاف معنی دار داشتند ($p < 0/05$). در تمامی اندازه گیری ها، شاهد بالاترین اثر را نشان داد (جدول شماره ۲).

درخصوص فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH؛ غلظت یک میلی گرم در میلی لیتر فعالیت، حذف بالاتری نسبت به غلظت ۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر نشان داد و هر دو مورد اختلاف معنی داری با شاهد داشتند ($p < 0/05$). همچنین درخصوص فعالیت کلاته کردن یون فلزی، بالاترین فعالیت مربوط به شاهد بود که با دو غلظت متفاوت پروتئینی، اختلاف معنی داری داشت.

جدول شماره ۲: درصد فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت صدف اویستر حاصل از آنزیم تریپسین

غلظت پروتئین محلول	فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH	فعالیت کلاته کردن یون آهن	قدرت کاهشی
۰/۵ میلی گرم در میلی لیتر	$35/24 \pm 0/14^c$	$60/08 \pm 0/02^c$	$0/44 \pm 0/01^c$
۱ میلی گرم در میلی لیتر	$52/17 \pm 0/22^b$	$77/11 \pm 0/09^b$	$0/65 \pm 0/02^b$
شاهد	$80/32 \pm 1^a$	$99/23 \pm 0/1^a$	$2/2 \pm 0/02^a$

مقادیر براساس انحراف معیار $\pm$ میانگین بیان شده اند و حروف غیرهمنام در هر ستون نشان از اختلاف معنی داری می باشد.

یک گزارش شد. در مورد محصول آبکافت حاصل از آنزیم تریپسین نیز همین نتایج مشاهده گردید، اما سطح اسیدهای آمینه ضروری نسبت به محصول پاپائین کمتر بود و شاخص شیمیایی ضعیف تری را نشان داد (جدول شماره ۳).

در مورد محصول آنزیم پاپائین، بیشترین میزان مربوط به اسیدهای آمینه ضروری هیستیدین، لیزین، لوسین و متیونین بود و بیشترین اسیدهای آمینه غیرضروری شامل سیستئین، گلوتامیک اسید و گلیسین بود. شاخص شیمیایی در مورد اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و متیونین، بالاتر از ۱ و بقیه اسیدهای آمینه ضروری، کمتر از

جدول شماره ۳: ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت صدف اویستر به وسیله آنزیم های پاپائین، تریپسین و شاخص شیمیایی آن در مقایسه با

پروتئین رفرنس FAO/WHO

شاخص شیمیایی		درصد اسید آمینه در محصول			اسید آمینه
الف	ب	پروتئین رفرنس ^۱	محصول تریپسین (ب)	محصول پاپائین (الف)	
۴/۴۵	۳/۷۲	۲	۷/۴۵	۸/۹	هیستیدین
۰/۶۱	۰/۵۷	۴	۲/۳۱	۲/۴۴	ایزولوسین
۰/۵۹	۰/۵۷	۷	۴	۴/۱۲	لوسین
۱/۰۹	۱	۵/۵	۵/۵	۶/۰۲	لیزین
۱/۲۴	۱/۲۶	۳/۵	۴/۴	۴/۳۶	متیونین
۰/۹۶	۰/۸۷	۴/۲۹	۲	۲/۲	فنیل آلانین
-	-	-	۱/۷۲	۱/۹۱	تیروزین
۰/۵۹	۰/۵	۴	۲	۲/۳۵	ترئونین
۰/۴۲	۰/۴۴	۵	۲/۲	۲/۱۲	آرژنین
۰/۲۲	۰/۲	۵/۴۲	۱/۱۱	۱/۲۳	والین
-	-	-	۶/۶۸	۶/۶۶	آسپارتیک اسید
-	-	-	۱۲/۶۶	۱۲/۵۶	گلوتامیک اسید
-	-	-	۱/۱۲	۱/۱۲	سریں
-	-	-	۱۱/۱	۱۱/۱۱	گلیسین
-	-	-	۱	۰/۹	آلانین
-	-	-	۱۳	۱۳/۵	سیستئین
-	-	-	۷/۸	۸/۴	پرولین

^۱میزان مورد نیاز اسید آمینه براساس رفرنس FAO/WHO

بحث

نتایج مطالعه حاضر نشان داد هر دو نوع پروتئین آبکافت، خواص آنتی اکسیدان خوبی دارند و غلظت پروتئین بر خواص مختلف تأثیر گذار است؛ به طوری که غلظت بالاتر، خواص بهتری را نشان داد. در کل، پروتئین آبکافت حاصل از آنزیم پاپائین، خواص آنتی اکسیدانی بیشتری نسبت به محصول تریپسین داشت. مکانیسم دقیق فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها، ناشناخته است، اما مطالعات متعدد نشان می دهد این پپتیدها پراکسیداسیون لیپیدها را محدود و رادیکال های آزاد را جمع می کنند (۲۱)، همچنین کلاته کننده یا انتقال دهنده یون های فلزی هستند (۱۳). به علاوه، گزارش شده است پپتیدهای آنتی اکسیدان، سلول ها را از آسیب به وسیله گونه های فعال اکسیژن با تحریک ژن ها حفظ می کنند.

در تحقیق حاضر، فعالیت حذف رادیکال آزاد برای محصول آبکافت پاپائین و تریپسین به ترتیب $67/66 \pm 0/31$ و $52/17 \pm 0/22$ بود. حذف رادیکال آزاد، مکانیسم اولیه ای است که به وسیله آن مواد آنتی اکسیدان می توانند از واکنش های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یکی از معدود رادیکال های آزادی است که در دمای اتاق پایدار است (۲۲). اثر آنتی اکسید آنها روی حذف رادیکال آزاد DPPH به دلیل فعالیت هیدروژن دهنده گی بوده و لذا می توانند واکنش زنجیره ای اکسیداسیون را مهار کنند.

مطالعه روی پروتئین آبکافت اویستر (*S. cucullata*) نیز نشان داد این پروتئین در غلظت ۱ میلی گرم در میلی لیتر، فعالیت حذف رادیکال آزاد بالایی دارد ($85/7 \pm 0/37$). همچنین گزارش شده است پروتئین آبکافت اویستر احتمالاً حاوی پپتیدهایی است که الکترون دهنده بوده و می توانند با رادیکال های آزاد برای تبدیل آنها به محصولات پایدار و خنثی نمودن واکنش زنجیره ای رادیکال واکنش نشان دهند (۲۳).

در مطالعه حاضر فعالیت کلاته کنندگی یون فلزی برای محصول آبکافت پاپائین و تریپسین به ترتیب $88/34 \pm 0/12$ و $77/11 \pm 0/09$ به دست آمد. آهن به دلیل داشتن توانایی در تولید رادیکال آزاد از واکنش فنتون، حایز اهمیت است. واکنش فنتون، واکنشی بین نمک آهن فرو و پراکسیدها بوده که رادیکال هیدروکسیل تولید می کند.

حمله رادیکال های هیدروکسیل نیز می تواند منجر به آغاز پراکسیداسیون لیپیدها در بدن انسان شود. همچنین به حداقل رساندن یون فرو در واکنش فنتون می تواند جلوی خسارت های اکسیداسیونی را بگیرد (۲۴). Alemán و همکاران (سال ۲۰۱۱) نیز گزارش کردند بیشترین فعالیت حذف یون آهن، در ژلاتین آبکافت پوست اسکویید تولید شده با آلکالاز و در ژلاتین آبکافت پوست ماهی تن تولید شده با تریپسین اتفاق می افتد (۲۵).

در تحقیق حاضر میزان قدرت کاهشی نسبت به شاهد، اختلاف معنی داری داشت و کمتر بود، اما با افزایش غلظت پروتئین، قدرت کاهشی نیز افزایش یافت. در تحقیقی گزارش شده است قدرت کاهشی پروتئین آبکافت اویستر (*S. cucullata*) با افزایش غلظت افزایش می یابد، که این یافته با نتایج تحقیق حاضر همخوانی داشت (۲۳). در مطالعات متعددی نیز آمده است ارتباط مستقیمی بین فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت کاهشی ترکیبات زیست فعال وجود دارد.

در مطالعات دیگر، پروتئین آبکافت کاتالیز شده با آنزیم های مختلف، سطوح متفاوتی از فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داده است. مکانیسم زیست فعال چنین پپتیدهایی، به خوبی شناسایی نشده و فقط تعداد کمی از مطالعات به ارتباط بین فعالیت و ساختار درونی پرداخته است (۲۶). به علاوه، بیشتر محققین با حضور اسیدهای آمینه متفاوت که در پپتیدها نقش مهمی در خصوصیات آنتی اکسیدان بازی می کنند توافق دارند. بنابراین، مکانیسم منفرد آنتی اکسیدانی نمی تواند برای توجیه فعالیت آنتی اکسیدانی کل به کار رود. خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدها بیشتر وابسته به ترکیب، ساختار و آبگریزی می باشد (۲۷). در این میان، ترکیب اسیدهای آمینه، نقش اساسی ایفا می کند. مطالعات متعدد نشان می دهد سطح و ترکیب اسیدهای آمینه و پپتیدها، خواص آنتی اکسیدان پروتئین آبکافت را تعیین می کند. همچنین توالی اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز در این امر مهم است. برای مثال اسیدهای آمینه آبگریز اسیدی از اکسیداسیون لیپیدها جلوگیری کرده و به عنوان دهنده پروتون به رادیکال های پروکسیل هیدروکسیل، همچنین کلاته کننده یون فلزی عمل می کنند. به علاوه پپتیدهای حاوی هیستیدین نیز به عنوان کلاته کننده

از سوی دیگر، ارزش غذایی مواد غذایی به نوع و مقدار اسیدهای آمینه موجود مورد نیاز برای بدن بستگی دارد. در مطالعه حاضر از شاخص شیمیایی جهت تعیین ارزش غذایی این پروتئین آبکافت استفاده گردید. نتایج نشان داد شاخص شیمیایی محصولات تولیدی بجز در اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین و فیل آلانین در بقیه اسیدهای آمینه ضروری، از حد استاندارد کمتر است، لذا این محصولات در صورت تأیید نهایی، از ارزش غذایی بالایی برخوردار نبوده و تنها از نظر داشتن خواص آنتی اکسیدانی مهم می باشند. بنابراین، نمی توان برای این محصولات، توصیه غذایی کرد و کارآزمایی بالینی توجیه پذیر است. در جمع بندی می توان گفت پروتئین آبکافت تولیدشده از صدف اویستر با آنزیم پاپاین و پس از آن تریپسین، قدرت آنتی اکسیدانی خوبی نشان می دهد و ترکیب اسیدهای آمینه مناسب در این مسئله دخیل است.

نتیجه گیری

صدف اویستر منبع بسیار خوبی برای تهیه محصولات با ارزش افزوده می باشد و در صورتی که از این منبع پروتئین آبکافت تولید شود پپتیدها و اسیدهای آمینه تولیدی، توانایی بسیار خوبی در حفاظت از اکسیداسیون خواهند داشت و می توانند سیستم های بیولوژیک و غذایی را از خطر این رادیکال های آزاد و اکسیداسیون حفظ کنند. لذا استفاده از این پروتئین آبکافت در صنایع دارویی به عنوان مکمل می تواند اثر سلامتی بخش داشته باشد و در صورت برنامه ریزی، تولید صنعتی نیز می تواند زمینه سازی برای صادرات این محصول محسوب گردد. در این خصوص، مطالعات تکمیلی در سیستم های مدل و درون موجود زنده برای توصیه غذایی این فرآورده ضروری است.

تشکر و قدردانی

این تحقیق در دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار انجام شده است و نویسندگان مقاله، از این دانشگاه به جهت حمایت از تحقیق، کمال تشکر را دارند.

یون فلزی عمل کرده که شاید به دلیل ساختار حلقه ای آن باشد (۲۵). در تحقیق حاضر میزان اسیدهای آمینه هیستیدین، لیزین، متیونین، لوسین، سیستئین و پرولین در هر دو نوع پروتئین آبکافت، بالا بود. گزارش شده است اسیدهای آمینه عطرزا مثل تیروزین، هیستیدین، تریپتوفان و فیل آلانین (۱۳) و اسیدهای آمینه آبگریز مانند والین، لوسین، آلانین و متیونین، نقش حیاتی در فعالیت آنتی اکسیدانی ایفا می کنند (۲۸). Suetsuna و همکاران (سال ۲۰۰۰) نشان دادند گروه های فنولیک هیدروکسیل در اسیدهای آمینه آروماتیک، عامل مهار رادیکال آزاد (به عنوان دهنده الکترون) می باشند و اسیدهای آمینه هیستیدین، پرولین، آلانین و لوسین نیز در این امر دخیل هستند (۲۹). محققین گزارش کردند بین اسیدهای آمینه؛ تیروزین، تریپتوفان و متیونین، بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی و سپس هیستیدین، سیستئین و فیل آلانین قرار دارند. البته باید توجه داشت در کنار ترکیب اسیدهای آمینه، توالی قرار گرفتن اسیدهای آمینه در پپتیدها نیز مهم است. در تحقیقی، Rajapakse و همکاران (سال ۲۰۰۵) نشان دادند فعالیت بالای حذف رادیکال آزاد پروتئین آبکافت یا پپتیدهای مشتق از ماهیچه اسکویید غول پیکر، عموماً در ارتباط با ترکیب بالای اسیدهای آمینه هیدروفوبیک و یا آبگریزی بالای این پپتیدها می باشد. نتایج اثبات کرده است کارآیی هیدروژن دهنده گی پپتیدها در محصول آبکافت، وابسته به نوع آنزیم به کار رفته است (۱۳). همچنین Suetsuna و همکاران (سال ۲۰۰۰) دریافتند تغییر در اندازه، سطح و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد پپتیدها روی خاصیت آنتی اکسیدانی تأثیر می گذارد (۲۹). پروتئاز در انواع مختلف، پیوندهای پپتیدی را در جایگاه های مختلف می شکند و محصولات متفاوتی با خواص آنتی اکسیدانی متفاوت ایجاد می کند. پاپاین خواص نسبتاً گسترده ای دارد. این آنزیم برای سوبسترا، اختصاصی عمل کرده و ابتدا روی پیوندهای اسیدهای آمینه آبگریز یا عطرزا می نشیند (۳۰). در تحقیق حاضر شاید چنین خصوصیتی در مقایسه با تریپسین منجر به بروز خواص آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به محصول پاپاین شده است.

References:

1. Borek C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J Nutr* 2001;131(3s):1010-15.
2. Gutteridge JM, Mitchell J. Redox imbalance in the critically ill. *Br Med Bull* 1999;55(1):49-75.
3. Nazeer RA, Deeptha R, Jaiganesh R, Sampatkumar NS, Yousef-Naghsh S. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyrna barracuda*) and Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. *Int J Peptide Res Ther* 2011;17(3):209-16.
4. Hettiarachchy NS, Glenn KC, Gnanasambandam R, Johnson MG. Natural antioxidant extracts from fenugreek (*Trigonella foenumgraecum*) for ground beef patties. *J Food Sci* 1996;61(3):516-19.
5. Suetsuna K, Maekawa K, Chen J. Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 2004;15(5):267-72.
6. Picot L, Bordenave S, Didelot FAI, Fruitier-Arnaudin I, Sannier F, Thorkelsson G, et al. Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochem* 2006;41(5):1217-22.
7. Hartmann R, Meisel H. Food derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Curr Opin Biotechnol* 2007;18(2):163-69.
8. Pihlanto-Leppala A. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: Opioid and ACE-inhibitory peptides. *Trends Food Sci Technol* 2001;11(9-10):347-56.
9. Bougatef A, Arroume NN, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem* 2010;118(3):559-65.
10. Qian ZJ, Jung WK, Byun HG, Kim SK. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster (*Crassastrea gigas*) against free radical induced DNA damage. *Bioresour Technol* 2008;99(9):3365-71.
11. Nazeer RA, Divya Prabha KR, Sampath Kumar NS, Jai Ganesh R. Isolation of antioxidant peptides from clam, *Meretrix casta* (Chemnitz). *J Food Sci Technol* 2013;50(4):777-83.
12. Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using proteases. *Food Chem Toxicol* 2013;52:113-20.
13. Rajapakse N, Mendis E, Jung WK, Je JY, Kim SK. Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food Res Int* 2005;38(2):175-82.
14. Taheri A, Abedian Kenari A, Motamedzadegan A, Habibi Rezaie M. Optimization of gold stripe sardine (*Sardinella gibbosa*) protein hydrolysate using Alcalase® 2.4L by RSM. *CyTA J Food* 2011;9(2):114-20.
15. Amit KR, Jini R, Swapna HC, Sachindra NM, Bhaskar N, Baskaran V. Application of native lactic acid bacteria (LAB) for fermentative recovery of lipids and proteins from fish processing wastes: Bioactivities of fermentation products. *J Aquatic Food Product Technol* 2011;20(1):32-44.
16. Benjakul S, Visessanguan W, Phongkanpai V, Tanaka M. Antioxidative activity of caramelisation products and their preventive effect on lipid oxidation in fish mince. *Food Chem* 2005;90(1-2):231-9.
17. Yildirim A, Mavi A, Kara AA. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *J Agric Food Chem* 2001;49(8):4083-9.
18. Flynn KJ. Some practical aspects of measurements of dissolved free amino acids in natural waters and within microalgae by the use of HPLC. *Chem Ecol* 1988;3(4):269-93.

19. Cheison SC, Wang Z, Xu SY. Use of response surface methodology to optimise the hydrolysis of whey protein isolate in a tangential flow filter membrane reactor. *J Food Eng* 2007;80(4):1134-45.
20. FAO/WHO. Energy and protein requirements. Report of Joint FAO/WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. Geneva: FAO/WHO and United Nations University, Series No. 724; 1985. p. 116-29.
21. Qian ZJ, Jung WK, Kim SK. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Ranacates beiana* Shaw. *Bioresource Technology* 2008;99(6):1690-8.
22. Zhong S, Ma C, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chem* 2011;126(4):1636-42.
23. Umayaparvathi S, Arumugam M, Meenakshi S, Dräger G, Kirschning A, Balasubramanian T. Purification and characterization of antioxidant peptides from oyster (*Saccostrea cucullata*) hydrolysate and the anticancer activity of hydrolysate on human colon cancer cell lines. *Int J Peptide Res Ther* 2014;20(2):231-43.
24. Borah A, Yadav RNS, Unni BG. In vitro antioxidant and free radical scavenging activity of *Alternanthera sessilis*. *Int J Res Pharm Sci* 2011;2(6):1502-6.
25. Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudin I, Gómez-Guillén MC, Montero P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res Int* 2011;44(4):1044-51.
26. Hernández-Ledesma B, Contreras MM, Recio I. Antihypertensive peptides: Production, bioavailability and incorporation into foods. *Adv Colloid Interface Sci* 2011;165(1):23-5.
27. Chen HM, Muramoto K, Yamauchi F, Fujimoto K, Nokihara K. Antioxidative properties of histidine-containing peptides designed from peptide fragments found in the digests of a soybean protein. *J Agric Food Chem* 1998;46(1):49-53.
28. Mendis E, Rajapakse N, Kim SK. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *J Agric Food Chem* 2005;53(3):581-7.
29. Suetsuna K, Ukeda H, Ochi H. Isolation and characterization of free radical scavenging activities peptides derived from casein. *J Nutr Biochem* 2000;11(3):128-31.
30. Tavano OL. Protein hydrolysis using proteases: An important tool for food biotechnology. *J Mol Catal B Enzym* 2013;90:1-11.

A Study of Antioxidant Properties of Two Types of Protein Hydrolysate Produced by Oyster

Ali Taheri^{1*}, Amin Ojifard², Samira Jalalinezhad³, Behnam Mozaffari⁴

¹Faculty of Marine Sciences,
Chabahar Maritime
University, Chabahar, Iran.

²Faculty of Agriculture &
Natural Resources, Persian
Gulf University Bushehr,
Bushehr, Iran.

³Shahid Beheshti University
of Medical Sciences, Tehran,
Iran.

⁴Shiraz University of Medical
Sciences, Shiraz, Iran.

***Corresponding Author:**
Ali Taheri, Faculty of
Marine Sciences, Chabahar
Maritime University,
Chabahar, Iran.

Email:
taheri@cmu.ac.ir

Received: 9 Oct, 2014

Accepted: 5 May, 2015

Abstract

Background and Objectives: Today's, oxidative stress that leads to change in the quality of food and incidence of various diseases, such as cancer and other diseases in the human body, has drawn attention. In this study, antioxidant effects and profile of amino acid composition of products were investigated.

Methods: In this study, protein hydrolysate was produced from oyster (*Saccostrea cucullata*) by papain and trypsin enzymes. The antioxidant activity of the product was measured using free radical scavenging activity (DPPH), chelating activity, and iron reduction activity in two different concentrations of 0.5 and 1 mg/ml protein. Also, the amino acid composition of the products was assessed by high-performance liquid chromatography, and the chemical score was calculated.

Results: The highest DPPH free radical scavenging activity, chelating activity, and iron reduction power for papain products were respectively determined to be $67.66 \pm 0.31\%$, $88.34 \pm 0.12\%$, and 0.99 ± 0.12 and for trypsin products were estimated $52.17 \pm 0.22\%$, $77.11 \pm 0.09\%$, and 0.65 ± 0.02 , respectively. The highest antioxidant activity was seen in the concentration of 1mg/ml ($p < 0.05$). The highest percentage of the essential amino acids was for histidine, lysine, leucine, and methionine. The chemical index for histidine, lysine, and methionine was above 1 and for the other essential amino acids was determined below one.

Conclusion: According to the findings of this study, the protein hydrolysate produced from oyster by the papain and then trypsin enzymes, showed a good antioxidant activity, in which the appropriate hydrophobic amino acid composition involves. The products could be used for pharmaceutical exports after clinical trial.

Keywords Protein hydrolysates; Antioxidants; Papain; Trypsin; Amino acids.