تولید کمپلکس پروتئینی هیدرولیز و غنی شده با آهن از میگوی آب شیرین (*Macrobrachium nipponense*)

رضوان موسوی ندوشن*[۱]، روزبه حلت آبادی فراهانی[۱]

*Mousavi.nadushan@gmail.com

۱-گروه شیلات و صنایع غذایی، دانشکده علوم و فنون دریایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران شمال

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: مهر ۱۳۹۷

چکیده

در این تحقیق میگوی *Macrobrachium nipponense* صید شده، بصورت تازه همگن و توسط آنزیم پپسین هیدرولیز گردید؛ تا در نهایت یک فرآورده فراسودمند و مکمل آهن تولید شود. طی مراحل تحقیق، درجه هیدرولیز بر اساس آزمون محلول TCA، میزان پیشرفت پروتئولیز از طریق تعیین مقدار (غلظت) پروتئین به روش *UV*-اسپکتروفوتومتری و پتانسیل جذب آهن از طریق آزمون رنگی سنجی مبتنی بر معرف اورتوفنانترولین تعیین گردید. نتیجه آزمایش بر اساس آنالیز TCA، نشان داد طی ۶ ساعت درجه هیدرولیز افزایش یافت و پس از ۸ ساعت میزان هیدرولیز به حالت پایدار و فاز ثالث رسید. بالاترین ظرفیت جذب آهن (۴۹/۷ میکروگرم در میلیگرم پپتید/پروتئین) برای میگوی با درجه هیدرولیز ۳۶/۵ درصد بدست آمد. طی هیدرولیز نسبی انجام شده توسط پپسین، میزان آمینو اسیدهای تولید شده، نشان دهنده سطوح بالای گلیسین، پرولین، آرژینین، آلانین، آرژنین و والین بود. به نظر می رسد که در هیدرولیز میگوی *M. nipponense*، پیوندهای پپتیدی گلیسین، پرولین، آلانین و همچنین گروه آمینو یا ایمینو از زنجیره جانبی آرژینین باعث افزایش جذب آهن می‌شوند. این میگو به فراوانی در بسیاری از منابع آبی کشور وجود دارد و هیدرولیز آنزیمی و غنی سازی، یک روش و استراتژی مناسب در جهت بهره برداری از آن و تولید یک محصول فراسودمند بشمار می رود.

لغات کلیدی: پروتئین، پپسین، *Macrobrachium nipponense*، هیدرولیز، کمپلکس آهن

*نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

مقدمه

آهن یک ماده معدنی ضروری برای تمام موجودات زنده است. بیست درصد از مردم سراسر جهان که اغلب زنان، بچه ها و افراد مسن هستند، از کمبود آهن رنج می‌برند (Chiplonkar *et al*., Girelli *et al*., 2018; 1999) و همواره به آنها توصیه می‌شود از مکملهای خوراکی که حاوی اشکال مختلف آهن مانند نمک‌های معدنی، عنصرآهن و پروتئین های حاوی پپتید جاذب آهن هستند، استفاده کنند (Gaucheron, 2000; Hurrell, 2002). مکمل‌های رایج آهن حاوی نمک آهن هستند که در بدن، آهن موجود در آنها به علت واکنش‌پذیری با سایر مواد غذایی بخوبی جذب نمی‌شود و استفاده از آنها اغلب سبب عوارض جانبی از جمله مشکلات گوارشی (یبوست و در برخی افراد اسهال و تهوع) و تغییر رنگ دندان‌ها بخصوص در کودکان می‌شود. از سوی دیگر، تحقیقات کنونی نشان می‌دهد که پپتیدها و پروتئین‌های حاوی آهن، پایداری، امکان جذب و قابلیت دستیابی و استفاده از آهن را از طریق ترکیبات بیولوژیک با منشأ طبیعی افزایش می‌دهند (Miquel and Farre, 2007).

امروزه به منظور مقابله با کمبود گسترده عناصر معدنی، اقداماتی از قبیل غنی‌سازی مواد غذایی و تولید مکمل‌های فراسودمند در حال توسعه می‌باشند. به طور کلی، مولکول‌های زیست فعال یا به عبارت دیگر، مولکول‌های غذا-دارو، اغلب در فرم فعال خود از سیستم گوارش عبور می‌کنند، از طریق روده جذب می‌گردند و از طریق سیستم گردش خون جهت بروز خواص و عملکردهای زیستی متنوع به اندام‌ها و بافت‌های مختلف بدن منتقل می‌شوند (Monsen, 1988). آنها به طور طبیعی از مواد غذائی دریافت می‌شوند یا به صورت مصنوعی از طریق آنزیم‌ها از مواد طبیعی مشتق می‌شوند که علاوه بر ارزش تغذیه‌ای، اثرات و عملکردهای خاص فیزیولوژیک را برعهده دارند (Tapiero *et al*., 2001). اعتقاد بر این است که مصرف این ترکیبات زیست فعال، از بروز بیماری‌های مزمن جلوگیری می‌کند و موجب تقویت سیستم ایمنی، مهار اثرات استرس در بافت‌ها و اندام‌ها، کنترل وزن بدن، تنظیم سطح گلوکز خون، تقویت حافظه، تاخیر در فرآیندهای افزایش سن و در نهایت افزایش امید به زندگی می‌گردد (Craig, 1999; Wargovichi *et al*., 2001; Orona-Tamayo *et al*., 2018). موجودات دریایی و آب شیرین، منابع بالقوه و غنی از مولکول‌ها و ترکیبات طبیعی زیست فعال هستند. مولکول‌های زیست فعال، بخصوص پپتیدها، می‌توانند به طور مستقیم و به صورت دست نخورده از منابع پروتئینی استخراج شوند یا از طریق هضم و شکستن مولکول‌های پروتئینی بدست آیند. در سال‌های اخیر، به طور گسترده از هیدرولیز آنزیمی بافت‌های موجودات دریایی و آب شیرین در تولید پروتئین/پپتیدهای زیست فعال، تولید اجزای غذایی با ارزش افزوده و غنی‌سازی شده یا فرآورده‌های صنعتی استفاده شده است (یاسمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Kristinsson and Rasco, 2000). از آن جمله می‌توان به پپتیدهای ضد میکروبی (Liu *et al*., 2008; Battison *et al*., 2008; Li *et al*., 2008)، پپتیدهای حامل مینرال‌ها (Jung *et al*., 2006; Jung and Kim, 2007)، پپتیدهای زیست فعال و فراسودمند تولیدی از میگو (Guerard *et al*., 2007) و پپتیدهای حامل فلزات مشتق شده از صدف (Chen *et al*., 2013)، ماهی کولی (Wu *et al*., 2012) و چندین پپتید که خصوصیات عملکردی خاصی نشان می دهند، اشاره نمود.

حداکثر اندازه میگوی *Macrobrachium nipponense*، در جنس نر ۸۶ میلی متر وجنس ماده ۷۵ میلی متر(Holthuis, 1980) می‌باشد. پراکنندگی وسیعی دارد و در منابع مختلف آب شیرین و زیستگاههای آب لب شور مشاهده گردیده است (Wong and McAndrew, 1990; Holthuis, 1980) و در حال حاضر، یکی از گونه‌های آب شیرین است که به صورت گسترده در جهان پرورش داده می‌شود. همچنین این میگو در استخرهای پرورش ماهی و در اکثر منابع آبی شمال ایران و اطراف دریای خزر یافت شده است (اتفاق دوست و همکاران، ۱۳۹۴) و بنظر می‌رسد *M. nipponense* به طورتصادفی از طریق مخازن حمل انتقال ماهی قزل آلا به این منابع آبی راه یافته باشد. اخیراً تعداد این گونه میگو در محیط های طبیعی به طور قابل توجهی افزایش یافته است، از

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

جمله حضور و پراکنش آن از تالاب‌های آلاگل، آلماگل و آجی گل استان گلستان (Gholamali *et al*., 2013) رود جیرده، استان گیلان (Khasmakhi *et al*., 2015)، تالاب انزلی، استان گیلان اعلام گردیده است (Khanipour *et al*., 2017).

این میگو جمعیتی پایدار با تولید و تکثیر طبیعی را بوجود آورده است، اما با وجود این واقعیت که سرشار از پروتئین با کیفیت بالا می‌باشد، مورد بهره برداری قرار نگرفته است. در صورتیکه اگر هیدرولیز گردد، می‌تواند به لحاظ اقتصادی منبع خوبی برای درآمدزایی می‌باشد. لذا پژوهش حاضر با هدف بهینه‌سازی پپتید جاذب آهن به عنوان پپتیدهای فراسودمند از هیدرولیز میگوی *M. nipponense*، طراحی گردید. این امر می‌تواند منجر به استفاده بهینه از این میگوی بومی وحشی و تولید یک مکمل جاذب آهن در صنایع غذایی گردد.

مواد و روش کار

در اولین مرحله میگو *M. nipponense* از دریاچه‌های اطراف تهران (دریاچه پارک ارم، تابستان ۱۳۹۶) صید و جمع‌آوری گردید. پس از شستشو، میگوها به طور کامل (بدون جداسازی ضایعات بدن) برای همگن‌سازی در مخلوط کن ریخته شدند تا پروتئین‌های تمامی بخش‌های بدن میگو در آزمایش مورد استفاده قرار گیرد.

میگو چرخ شده در کیسه های پلاستیکی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان استفاده، بسته‌بندی گردید. برای انجام عملیات هیدرولیز، ابتدا مواد همگن شده، جهت یخ زدایی در دمای اتاق قرار گرفت و سپس به نسبت ۱۰: ۱ با آب مقطر مخلوط شد. سپس جهت انجام هیدرولیزهای آنزیمی، ابتدا pH با استفاده از 2M HCL درحد ۳ تنظیم شد و در مرحله بعدی آنزیم پپسین به منظور هیدرولیز پروتئین میگو (بر اساس فعالیت آنزیمی ۶۰۰ U به ازای هر گرم پروتئین)، به مخلوط اضافه گردید. سپس جهت ادامه واکنش هیدرولیز مخلوط درون انکوباتور- شیکر قرار داده شد و دمای دستگاه بر ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با ۱۷۵ دور در دقیقه تنظیم گردید. در زمان‌های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت بخشی از نمونه برداشته شد و با قرار دادن در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه آنزیم غیرفعال گردید. پس از مراحل فوق، حرارت مخلوط هیدرولیز شده تا رسیدن به دمای اتاق کاهش داده شد و به منظور جداسازی مایعات، مخلوط همگن به مدت ۱۵ دقیقه، در دور ۱۳۰۰۰ سانتریفیوژ گردید (Malak, 1998).

درجه هیدرولیز (DH)[1] به صورت افزایش درصد نیتروژن کل در پروتئین هیدرولیز شده، در مقایسه با نیتروژن کل نمونه خام اولیه محاسبه گردید. بدین صورت که در مرحله اول، میگوی همگن شده با اسید تری کلرواستیک ۲۰٪ (TCA) ترکیب و پس از آن ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفوژ شد و ازت کل به روش کجلدال (AOAC, 1995) با ضریب تبدیل ۶/۲۵ اندازه‌گیری شد. همچنین غلظت پروتئین/پپتید محلول در نمونه‌های هیدرولیز شده، با اندازه‌گیری جذب در طول موج ۲۸۰ با استفاده از اسپکتروفتومتر *Nanodrop* مشخص گردید (Larson *et al*., 2018).

مرحله تعیین پتانسیل جذب آهن

برای این منظور، ابتدا مواد معدنی طبیعی موجود در پروتئین هیدرولیز شدند و توسط رزین EGTA جذب و جداسازی گردیدند. سپس محتوای پروتئین هیدرولیز شده به میزان ۱ میلی گرم در میلی لیتر رقیق شد و بعد از آن محلول با ۱۰ میلی لیتر متیل سولفات آهن، ۰/۱ میلی لیتر اسید اسکوربیک و ۲۰ میلی لیتر بافر فسفات سدیم جهت تنظیم pH در حدود ۸، مخلوط گردید. مخلوط در دمای اتاق به مدت ۶۰ دقیقه هم زده شد و پس از سانتریفوژ و حذف آهن غیرمحلول اضافی، غلظت آهن در سوپرناتانت با استفاده از روش رنگ سنجی تعیین شد (Harris, 1996). بدین صورت که جذب در ۵۱۰ نانومتر پس از افزودن ۱٪ هیدروکینون و اورتوفنان ترولین ۲۵٪ به نمونه اندازه‌گیری شد.

[1] Degree of Hydrolysis

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

آنالیز آمینو اسید

برای تجزیه و تحلیل ترکیبات آزاد آمینو اسید، پس از ۱۲ ساعت نمونه حاصل از هیدرولیز با پپسین را با بافر سدیم سیترات (pH =۲/۲)، رقیق و از طریق یک فیلتر غشاء واتمن با اندازه منافذ ۰/۴۵ میکرومتر فیلتر گردید (Spencer and Wold, 1969) و نهایتاً آمینو اسیدهای آزاد با استفاده از دستگاه آمینو اسید آنالایزر SYKAM (S 433)شناسایی و تعیین غلظت گردیدند.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزار Excel محاسبه شد. به منظور مقایسه میانگین داده‌های بدست آمده، از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه و آزمون تعقیبی (LSD)در سطح اطمینان ۹۵٪، استفاده شد و آزمون‌های آماری مذکور در نرم افزار SPSS 19 انجام شد.

نتایج

در طول هیدرولیز آنزیمی میگوی *M. nipponense*، درصد کل نیتروژن، به عنوان نشانه ای از درجه هیدرولیز پروتئین در نظر گرفته شد. نتیجه آزمایش محلول TCA نشان داد که بخش اعظم هیدرولیز طی شش ساعت اول انجام گردیده است و سپس واکنش آنزیمی پس از ۸ ساعت به حالت پایدار رسید.

با طولانی‌تر شدن زمان هیدرولیز بافتهای میگوی *M. nipponense*، غلظت پروتئین/پپتید در فاز محلول افزایش یافت و به بالاترین سطح در ۱۲ ساعت هیدرولیز رسید.

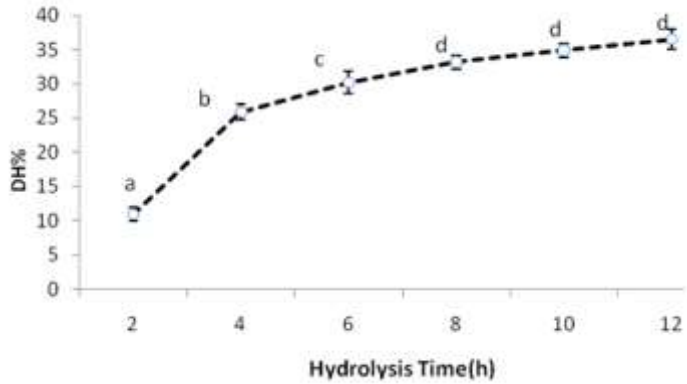
بحث

مهمترین عوامل تعیین کننده و اثرگذار بر فعالیت زیستی و خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده، منبع و نوع پروتئین، نوع آنزیم مورد استفاده برای پروتئولیز، درجه هیدرولیز و شرایطی است که طی آن فرآیند هیدرولیز انجام می شود. (Kristinsson and Rasco, 2000; Guerard *et al.*, 2007). پپسین یک آنزیم اسیدی است که بر طیف وسیعی از انواع سوبسترا (ترکیبات پروتئینی) تاثیرگذار است و عمدتاً پیوندهای پپتیدی در انتهای نیتروژنی آمینو اسید های حلقوی و هیدروفوبیک (شامل گلیسین، پرولین، لوسین، آلانین، ایزولوسین، متیونین، متیونین و والین) در پیوند با کربوکسیل شاخه‌های جانبی فنیل آلانین و لوسین را قطع می‌کند. همین تنوع پیوندها که طی فرآیند پپسینولیز منقطع می‌شوند، منجر به تولید طیف متنوعی از پپتیدها می‌شود (Malak, 1998). هیدرولیز *M. nipponense* در طول ۶ ساعت اول با سرعت بالا انجام شد و سپس واکنش آنزیمی به حالت پایدار رسید. با توجه به سینتیک آنزیمی، پپسین در واکنش‌های تجزیه *M. nipponense*، در کمتر از ۸ ساعت درجه هیدرولیز را به میزان ۳۳/۲٪ رسانید و در طول ۱۲ ساعت، بالاترین درجه هیدرولیز (۳۶/۵٪) را بخود اختصاص داد (شکل ۱).

این یافته‌ها مطابق با برخی از پروتئولیزهای انجام شده بر سوبستراهای‌های دریایی است که از آن جمله می‌توان به ضایعات میگوی هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز با (Synowiecki and Al-Khatee, %DH = 30% 2000)، هیدرولیز سر ماهی ساردین با پروتامکس با (Dumay *et al.*, 2006)%DH =20%)، یا هیدرولیز کل بدن ماهی کرواکر زرد کوچک با پروتئاز با = Ji %DH) (*et al.*, 2013)، اشاره نمود.

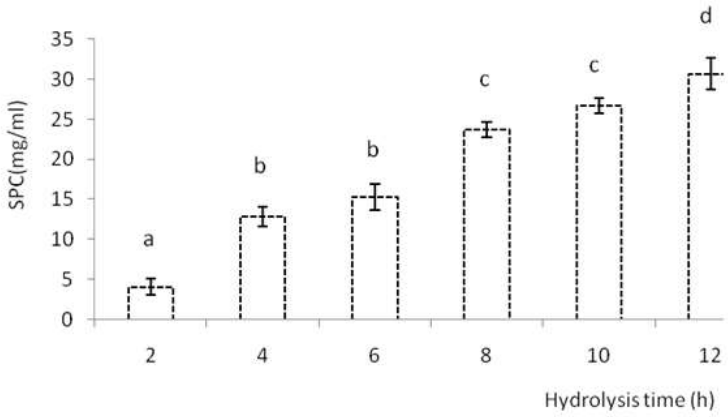
تغییرات غلظت پروتئین محلول در هیدرولیز بوجود آمده، از روندی مشابه با روند تغییر درجه هیدرولیز نسبت به زمان، پیروی نمود بطوریکه پس از ۸ ساعت هیدرولیز، غلظت پروتئین محلول در نمونه هیدرولیز شده به ۲۳/۷mg/ml رسید و پس از ۱۲ ساعت هیدرولیز، به حداکثر غلظت mg/ml ۳۰/۷ رسید .علاوه بر این، محتوای آهن همراه با افزایش غلظت پپتید/پروتئین افزایش نشان داد، بطوریکه پس از ۱۲ ساعت، بیشترین غلظت آهن محلول، به µg/mg ۳۹/۷ پپتید/پروتئین افزایش نشان داد (شکل ۲).

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]



شکل ۱: درجه هیدرولیز (DH) به دست آمده پس از هیدرولیز بافتهای میگوی *M. nipponense* با آنزیم پپسین و اثر زمان بر پیشرفت درجه هیدرولیز. داده ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهنده ی وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

Figure 1: DH obtained by pepsin hydrolysis using whole body of *M. nipponense* and effect of hydrolysis time on the degree of hydrolysis. Data have shown as mean ± STDEV (n = 3), the minuscules have shown the significant difference (p<0.05).

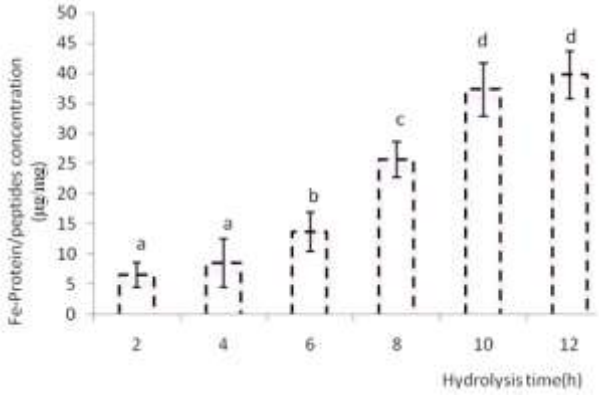


شکل ۲: غلظت پروتئین/پپتید در محلول حاصل از هیدرولیز، به دست آمده از بافتهای میگوی *M. nipponense* . داده ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

Figure 2: Soluble Protein/peptide concentration in hydrolysates, obtained from *M. nipponense*. Data have shown as mean ± STDEV (n = 3), the minuscule have shown the significant difference (p<0.05).

این نتیجه با نظریات Lee و Song (۲۰۰۹) و Huang و همکاران (۲۰۱۱)، همخوانی دارد. آنها نیز نشان دادند که جذب و اتصال به آهن در پروتئین پلاسمای خون خوک و ضایعات میگوی هیدرولیز شده متناسب با افزایش زمان هیدرولیز، افزایش می یابد (شکل ۳). همچنین در این تحقیق مشخص شد که پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در هیدرولیز *M. nipponense*، دارای قدرت جذب آهن و واکنش شیمیایی بیشتر با آهن، نسبت به پروتئین پلاسمای خوک (۲۷ µg/mg) و ضایعات فرآوری شده میگو (۱۷ µmol/g) می باشد (Lee and Song, 2009; Huang *et al*., 2011)، اما قدرت جذب آهن در بافت هیدرولیز شده *M. nipponense* در مقایسه با ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی (100 µg/mg) کمتر ارزیابی گردید (Wu *et al*., 2017).

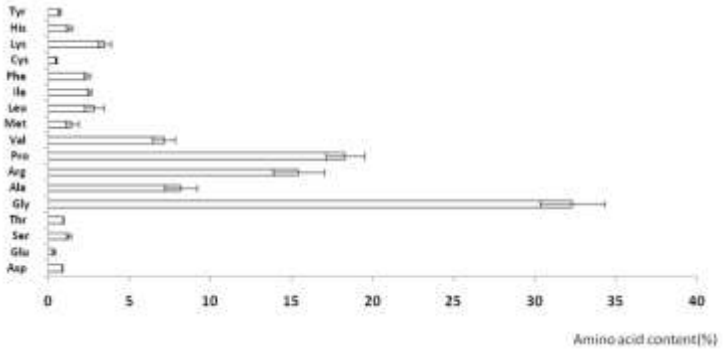
[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]



شکل ۳: پتانسیل اتصال آهن و غلظت پروتئین حاوی آهن در محلول های حاصل از هیدرولیز بافتهای میگوی *M. nipponense* توسط آنزیم پپسین . داده ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد (p<۰/۰۵).

Figure 3: Iron-chelating activity of *M. nipponense* crude hydrolysate solutions from *Macrobrachium nipponense* by pepsin. Data have shown as mean ± STDEV (n = 3), the minuscule have shown the significant difference (p<0.05).

از سوی دیگر، آمینو اسیدهای آزاد تولیدی طی فرآیند هیدرولیز *M. nipponense* نشانگر سطوح بالای گلیسین، پرولین، آرژینین، آلانین، والین و سپس لیزین، لوسین و فنیل آلانین بود (شکل ۴).



شکل ۴: محتوای آمینو اسیدهای آزاد تولید شده در مخلوط حاصل از هیدرولیز بافت های میگوی *M. nipponense*، توسط آنزیم پپسین. داده ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است.

Figure 4: Free amino acid content of pepsin-treated hydrolysate prepared from M. *nipponense* by pepsin. Data have shown as mean ± STDEV (n = 3).

این نشان می‌دهد که بیشتر پایانه‌های پپتیدها در هیدرولیز توسط پپسین ممکن است توسط این اسیدهای آمینه شکل گرفته باشد. نظر به اینکه N-terminal پپتیدهای تولید شده، بر ظرفیت اتصال پروتئین/پپتید تأثیر می‌گذارد، بنظر می‌رسد فرآورده حاصل از هیدرولیز *M. nipponense*قدرت جذب آهن بالاتری نسبت به هیدرولیز سایر محصولات فراهم آورده است. بر طبق تحقیقات Choi و همکاران (۱۹۹۸) و Chaud و همکاران (۲۰۰۲) ، جذب آهن پروتئین آب پنیر بدلیل غلظت های بالاتر آلانین، لیزین و فنیل آلانین در توالی

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

پپتیدهای تولید شده در هیدرولیز می باشد. از سوی دیگر، ثابت شده است که پپتیدهای حاوی گلیسین، لوسین، فنیل آلانین، لیزین، تیروزین، گلوتامین، اسید گلوتامیک، اسید آسپارتیک مسئول پتانسیل بالاتر جذب در پلاسمای خون خوک هیدرولیز شده هستند (Lee and Song, 2009).

Storcksdieck و همکاران (۲۰۰۷) تشخیص دادند که هیدرولیز پروتئین گوشت با پپسین/پانکراتین پپتیدهایی متشکل از پنج اسید آمینه اصلی (گلیسین، اسید آسپارتیک، اسید گلوتامیک، ترئونین، پرولین) تولید می کند و قدرت جذب بالای آهن را به پیوندهای پپتیدی میان اسید آمینه های مدکور نسبت دادند. در نهایت یافته‌های پژوهش نشان می‌دهد که پیوندهای پپتیدی (گلیسین، پرولین، آرژنین، آلانین و والین) به همراه گروه آمینو یا ایمینو زنجیره جانبی آرژنین ممکن است مسئول جذب آهن بیشتر در پروتئین/پپتیدهای حاصل از هیدرولیز *M. nipponense* توسط پپسین باشد.

در مطالعه حاضر، از بافت میگوی *M. nipponense* بوسیله آنزیم پپسین، فرآورده هیدرولیزی با ظرفیت بالای جذب آهن بدست آمد. بدین سبب مخلوط پروتئین/پپتید ناشی از هیدرولیز این میگو می‌تواند در تولید ترکیبات غذایی فراسودمند، افزودنی‌های طبیعی یا مکمل‌های غذایی جهت بهبود و رفع مشکلات فقر آهن مورد استفاده قرار گیرد.

منابع

اتفاق دوست، م.، حقیقی، ح. و علاف نوبریان، ح.، ۱۳۹۴. اثر دفعات غذادهی بر شاخص های رشد، بازماندگی و ترکیب شیمیایی بدن میگوی رودخانه ای شرق (*Macrobrachium nipponense* (De Haan,1849). مجله علمی شیلات ایران، ص ۸۳-۹۷.

یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب.، امینی، ه.، ۱۳۹۲. مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین های موجود در امعاء و احشا ی ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با استفاده از آنزیم. مجله علمی شیلات ایران، ص ۱۴۹-۱۵۶.

AOAC, 1990. Official Methods of Analysis. Association of Analytical Chemists.

Battison, A.L., Summerfield, R. and Patrzykat, A., 2008. Isolation and characterization of two antimicrobial peptides from haemocytes of the American lobster Homarus americanus. *Fish and Shellfish Immunology*, 25(1–2): 181–187.

Chaud M.V., Izumi C, Nahaal Z., Shuhama T., Lourdes Pires Bianchi M. and Freitas O., 2002. Iron derivatives from casein hydrolysates as a potential source in the treatment of iron deficiency. *J Agric Food Chem*, 50: 871–7, DOI: 10.1021/acs.jafc.8b01995.

Chen, D., Liu, Z., Huang, W., Zhao, Y., Dong, S. and Zeng, M., 2013. Purification and characterization of a zinc-binding peptide from oyster protein hydrolysate. *Journal of Functional Foods*, 5, 689–697.

Chiplonkar, S.A., Tarwadi, K.V., Kavedia, R.B., Mengale, S.S., Paknikar, K.M., Agte, V.V., 1999. Fortification of vegetarian diets for increasing bioavailable iron density using green leafy vegetables. *Food Res Int.*, 32:169–74. DOI: 10.1016 /S0963-9969(99)00070-8.

Choi, I.W., Kim, K.S., Lim, S.D. and Lim, S.W. 1998. Iron binding peptides from casein hydrolysates produced by alcalase. *Korean J Food Sci Technol.*, 30: 218–23.

Craig, W.J., 1999. Health-promoting properties of common herbs. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70:491- 499.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

Dumay, J., Donnay-Moreno, C., Barnathan, G., Jaouen, P. and Bergé, J.P., 2006. Improvement of lipid and phospholipid recoveries from sardine (*Sardina pilchardus*) viscera using industrial proteases. *Process Biochemistry*, 41, 2327-2332.

Gaucheron, F., 2000. Iron fortification in dairy industry. *Trends Food Sci Technol.*, 11:403–9.

Gholamali, B., Rostami, H., keymaram, F., sadighi, O. and mirshekar, D., 2013. The first report of shrimp *Mcrobrachium nipponense* Alagol, Almagol and Ajigol Lagoons Golestan Province. *Iranian Journal of Fisheries Science*, 164-170.

Girelli, D., Ugolini, S., Busti, F., Marchi, G. and Castagna, A., 2018. Modern iron replacement therapy: clinical and pathophysiological insights. *International Journal of Hematology*, 107, 1, pp. 16–30.

Guerard, F., Sumaya-Martinez, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A. and Dufosse, L., 2007. Optimization of free radical scavenging activity by response surface methodology in the hydrolysis of shrimp processing discards. *Process Biochemistry*, 42(11), 1486–1491

Harris, D.C., Ed. 1996. Quantitative chemical analysis. New York: WH Freeman and Company.

Holthuis, L.B., 1980. Shrimps and prawns of the world. An annotated catalogue of species of interest to fisheries. FAO Fish Synopses (125/ 1), FAO, Rome.

Huang, G., Ren, Z., Jiang, J., 2011. Separation of iron-binding peptides from shrimp processing by-products hydrolysates. *Food Bioprocess Technol*, 4:1527–1532.

Hurrell, R., 2002. How to ensure adequate iron absorption from iron-fortified food. Nutr Rev; 60:S7–15.

Ji, Y., Zhang, G., Li, X., Zhao, B. and. Zhou, S., 2013. Enzymatic hydrolysis of protein from small yellow croaker (*Psendosciaena polyactis*) and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Biochemistry*, 37, 3, pp. 278–285.

Jung, W.K., Lee, B.J. and Kim, S.K., 2006. Fish-bone peptide increases calcium solubility and bio availability in ovariectomised rats, 2006. *Br J Nutr*; 95:124–8.

Jung, W.K. and Kim, S.K., 2007. Calcium-binding peptide derived from pepsinolytic hydrolysates of hoki (Johnius belengerii) frame. *European Food Research and Technology*, 224(6), 763–767.

Khanipour, A., Amini, M., Noori, A. and Kamrani, E., 2017. Comparison of three different traps for catching oriental river prawn (Macrobrachium nipponense), Iran. *Journal of Fisheries Science*, 26, 3: 193-196.

Khasmakhi, E., Jalili1, S., Imanpour, J. and Heidari, S., 2015. Evaluation of the variability in proximate composition of Macrobrachium nipponense during spawning season. *Journal of Food Research*, 27, 3: 115-124.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical and functional properties. *Critical Review of Food Science and Nutrition*, 40(1), 43–81, DOI: 10.1080/10408398.2018.1501657.

Larson N.R., Wei Y.,, and C. Middaugh R., 2018. Label-Free, Direct Measurement of Protein Concentrations in Turbid Solutions with a UV–Visible Integrating Cavity Absorbance Spectrometer. *Journal of Analytical chemistry*, 90 (8), pp 4982–4986, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00477.

Lee, S.H. and Song K.B., 2009. Purification of an iron-binding nona-peptide from hydrolysates of porcine blood plasma protein. *Process Biochemistry*, 44: 378-381.

Li, C., Haug, T., Styrvold, O.B., Jorgensen, T.O., and Stensvag, K., 2008. Strongylocins, novel antimicrobial peptides from the green sea urchin. *Development and Comparative Immunology*, 32(12), 1430–1440.

Liu, Z., Dong, S., Xu, J., Zeng, M., Song, H. and Zhao, Y., 2008. Production of cysteine-rich antimicrobial peptide by digestion of oyster (*Crassostrea gigas*) with alcalase and bromelin. *Food Control*, 19(3), 231–235.

Malak, C.A.A., 1998. Pepsin as a catalyst for peptide synthesis: formation of peptide bonds not typical for pepsin substrate specificity. *J Pept Res*, 53(6); 606- 610.

Miquel, E. and Farre´, R., 2007. Effects and future trends of casein phosphopeptides on zinc bioavailability. *Trends Food Sci Technol*; 18:139–43.

Monsen, E.R., 1988. Iron nutrition and absorption: dietary factors which impact iron bioavailability. *J Am Diet Assoc*; 88:786–90, DOI: 10.1016/**j**.jand.2015.09 .003.

Orona-Tamoyo, D., Valverde M.E. and Octavio P.L., 2018. Bioactive peptides from selected latin American food crops-A nutraceutical and molecular approach. *Journal of Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 1: 1-27, DOI; 10.1080/10408398.2018.1434480.

Spencer, R.L. and Wold, F., 1969. A new convenient method for estimation of total cysteine–cysteine in proteins. *Analytical Biochemistry*, 32, 185–190.

Storcksdieck, S., Bonsmann, G., Hurrell, R.F., 2007, Iron-binding properties, amino acid composition, and structure of muscle tissue peptides from in vitro digestion of different meat sources. *J Food Sci*, 72:S19–29.

Synowiecki, J. and Al-Khatee, N., 2000. The recovery of protein hysrolysate during enzymatic isolation of chitin from shrimp *Crangon crangon* processing discards. *Food Chemistry*, 68(2), 147–152.

Tapiero, H., Gate´ L. and Tew K.D., 2001. Iron: deficiencies and requirements. *Biomed Pharmcother*, 55:324–32.

Wargovichi, M.J,, Woods, C,, Hollis D.M, and Zander, M.E., 2001. Herbals, Cancer prevention and health. *Journal of Nutrition*, 131: 3034- 3036.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

protein. *Food Research International*, 48, 435–441.

Wong, J.T.Y. and McAndrew, B.J., 1990. Selection for larval freshwater tolerance in *Macrobrachium nipponense* (De Haan). *Aquaculture*, 88:151–56.

Wu, H., Liu, Z., Zhao, Y. and Zeng, M., 2012. Enzymatic preparation and characterization of iron-chelating peptides from anchovy (*Engraulis japonicus*) muscle

Wu, W., Li, B., Hou, H., Zhang, H. and Zhao, X., 2017. Identification of iron-chelating peptides from Pacific cod skin gelatin and the possible binding mode. *Journal of Functional Foods*, 35: 8- 427.

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]

Production of iron-chelating proteinous hydrolysate from freshwater prawn, *Macrobrachium nipponense*

Mousavi Nadushan R.[1*]; Hellat R.[1]

*mousavi.nadushan@gmail.com

1-Department of fisheries and food science, Marine Science and Technology Campus, Tehran North Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

Abstract

In this study**,** freshly harvested prawn**,** *Macrobrachium nipponense* were hydrolyzed with pepsin to develop a food ingredient and iron supplement. The degree of hydrolysis, protein/peptide concentration and iron-chelating capacity were verified by TCA soluble assay, direct UV spectrophotometric method and orthophenanthroline-based colorimetric assay, respectively. The result of TCA soluble assay revealed a high rate of hydrolysis for the first 6 h, reached the steady-state phase after 8 hours. The highest iron-binding capacity of the hydrolysate (49.7 μg/mg of peptide/protein) was obtained at a degree of hydrolysis of 36.5%. The partial lysate generated by pepsin had high levels of glycine, proline, arginine, alanine, and valine. It seems that in peptic *M. nipponense* hydrolysate, peptide bonds of Gly, Pro, and Ala residues as well as amino or imino group from Arg side chain support additional affinity for iron. Consequently, hydrolysis and enrichment would be a proper strategy for appropriate gain from this abundant prawn, into a high functional product.

Keywords: Protein, Pepsin, *Macrobrachium nipponense*, Hydrolysis, Iron-chelating

*Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2026-11-02]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1398.28.1.7.8]

[DOI: 10.22092/ISFJ.2019.118537]