ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید های تخلیص شده از هیدرولیز روتیفر *Brachionus plicatilis*

کوثر خفایی زاده [۱]، نسرین سخایی [۱]، بابک دوست‌شناس [۱*]، کمال غانمی [۲]، حسین ذوالقرنین [۱]

babakdoust@yahoo.com

۱-گروه زیست شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر
۲-گروه شیمی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۴ تاریخ پذیرش: فروردین ۱۳۹۵

چکیده

روتیفرها گروه مهمی از زئوپلانکتون های اکوسیستم های آبی را تشکیل داده و دارای مقادیر نسبتاً زیادی از اسیدهای چرب غیر اشباع، پروتئینها و پپتیدها می باشند. روتیفر ها از جمله *Brachionus plicatilis* به عنوان یکی از منابع مهم غذای زنده لارو ماهیان دریایی در آبزی پروری محسوب می‌شوند. هدف این مطالعه ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای تخلیص شده از روتیفر *B. plicatilis* می باشد. در این پژوهش، پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از این روتیفر به وسیله آنزیم-های Trypsin, Pepsin, Neutrase, Papain , α-Chymotrypsin و Alcalase هیدرولیز شدند و با استفاده از فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH) مورد ارزیابی قرار گرفتند. همچنین، با استفاده از روش کروماتوگرافی متوالی جداسازی و خالص سازی شدند. نتایج نشان داد که پپتید هیدرولیز شده با پپسین در مقایسه با دیگر هیدرولیزها، بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارد. فعالیت مهارکنندگی هیدرولیز پپسین ۵۸٪ در ۰/۰۱۵ میلی مولار DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت، هیدرولیز پپسین به ترتیب با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی متوالی شامل ژل فیلتراسیون کروماتوگرافی (سفادکس G-250) و فاز معکوس مایع کروماتوگرافی با کارایی بالا (HPLC) روی ستون Eurospher C18 (۲۵۰× ۴/۶mm) جداسازی و خالص سازی شدند. نتایج این تحقیق نشان داد که هیدرولیزهای گونه ی *B. plicatilis* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی چشمگیری بوده و امکان استفاده از آن به عنوان مکمل در مواد غذایی قابل بررسی می باشد.

کلمات کلیدی: روتیفر، DPPH، پپتیدهای آنتی اکسیدانی، آنزیم‌های هیدرولیزی، پپسین

[*] نویسنده مسئول

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

مقدمه

روتیفرها در آبزی پروری خصوصاً تغذیه در مراحل لاروی انواع ماهیان و میگوها دارای اهمیت به سزایی می باشند که این اهمیت ناشی از اندازه کوچک آنها(۱۰۰ تا ۳۴۰ میکرون)، سرعت شنای کم، معلق ماندن در ستون آب، سرعت بالای تولید مثل، قابلیت هضم زیاد و داشتن انواع آمینو اسیدها، انتقال اسید های چرب ضروری خصوصاً امگا ۳ می باشد(Shei *et al*., 2012) . گونه ی*Brachionus plicatilis* به عنوان گونه ی غالب روتیفر در رودخانه بهمنشیر(خفایی، ۱۳۹۴) معرفی شده و همچنین در بسیاری از مراکز تکثیر و پرورش همانند ایستگاه تحقیقاتی بندر امام خمینی و ایستگاه موسسه تحقیقات بین المللی تاس ماهیان دریای خزر مورد استفاده قرار می گیرد (روفچایی، ۱۳۹۴). اما در میان منابع مختلف زیستی، فعالیت آنتی اکسیدانی در پپتیدهای روتیفر به اندازه کافی مطالعه نشده است (Byun *et al*., 2009). مطالعات مربوط به روتیفرها بیشتر بر روی اسیدهای چرب غیراشباع به خصوص سری n-3 (Ando *et al*., 2004)، همچنین پروتئین ومیزان اسید آمینه و ترکیبات سازنده روتیفرها متمرکز شده است(Aragão *et al*., 2004; Srivastava *et al*., 2006).

به طور کلی پپتیدهای استرس اکسیداتیو به علت عدم توازن بین تشکیل رادیکال های آزاد و حذف آنها توسط سیستم های دفاعی آنتی اکسیدانی مانند سوپراکسید دیسموتاز(SOD)، کاتالاز(CAT)، گلوتایتون پراکسیداز(GSH-Px)، گلوتایتون ردوکتاز(GR)، تری پپتید گلوتایتون(GSH) و ویتامین های A و C، ایجاد می شود(Nazeer *et al*., 2012). به جهت مقابله با چنین شرایطی استفاده از آنتی اکسیدان‌ها برای محافظت بدن در برابر استرس‌های اکسیداتیو ضرورت می یابد. به طور کلی بسیاری از آنتی اکسیدان‌های مصنوعی مانند هیدروکسی آنیزول بوتیلیتد[1]، (BHA)، هیدروکسی تولوئن بوتیلیتد[2](BHT) ، تری- بوتیل هیدروکینون[3](TBHQ) وگالات پروپیل[4](PG) برای به تأخیر انداختن اکسیداسیون لیپد، به محصولات غذایی اضافه می‌شوند با این وجود، استفاده از این آنتی اکسیدان-ها باید تحت نظارت دقیق انجام شود چرا که علی رغم کارایی بالا و نیز ارزانی نسبی، مصرف آنها به دلیل خاصیت سرطان زایی و تمایل روز افزون مردم جهت پرهیز از مصرف یا به حداقل رساندن کاربرد افزودنی های سنتزی در مواد غذایی رو به کاهش گذارده است (Byun *et al*., 2009). از این رو، پیدا کردن آنتی اکسیدان‌های طبیعی (از جمله منبع آنتی اکسیدانی روتیفر) به عنوان یک جایگزین مطمئن در صنایع غذایی بسیار حائز اهمیت شده است. درسال‌های اخیر، پپتیدهای بسیاری از موجودات دریایی مانند ماهی Alaska Pollack (*Theragra chalcogramma*) (Jia *et al*., 2010)، پوست اسکوئید (Mendis *et al*., 2005)، مارماهی Conger (Ranathunga *et al*., 2006)، اویستر(Qian *et al*., 2008)، ده پا (Balti *et al*., 2011)، سفره ماهی(Ko *et al*., 2013) و غیره گزارش شده است که دارای خواص فعال زیستی از جمله آنتی اکسیدانی، خواص ضد میکروبی، اثرات کاهش فشار خون، توانایی کاهش کلسترول، ضد انعقادی، ضد سرطان و ... می-باشند(Hartmann & Meisel, 2007). اما در این میان فعالیت آنتی اکسیدانی روتیفرها به علت ارزانی و سهولت تکثیر و پرورش قابل تفکر بوده و دارای اهمیت ویژه ای می باشد لذا با توجه به ضعف نسبی اطلاعات در این مورد بررسی حاضر به مطالعه خاصیت آنتی اکسیدانی روتیفرها پرداخته و هدف از آن ارزیابی پتانسیل پپتیدهای آنتی اکسیدانی بدست آمده از پروتئین روتیفر است. قابل ذکر است که یکی از جنبه های نوع آوری تحقیق حاضر استخراج آنتی اکسیدانها از زئوپلانکتون ها به ویژه روتیفرها در کشور است.

مواد وروشها

نمونه‌برداری روتیفر

نمونه بردار در دو فصل تابستان و زمستان ۱۳۹۳ در ۶ ایستگاه از مصب رودخانه ی بهمنشیر انجام گردید. نمونه های روتیفر با استفاده از تور پلانکتون با چشمه‌ی تور ۱۰۰میکرون به روش سطحی جمع آوری گردید. گونه روتیفر *B. plicatilis* به عنوان گونه‌ی غالب مصب

[1] Butylated Hydroxyanisole
[2] Butylated Hydroxytoluene
[3] Tert-Butylhydroquinone
[4] Propyl Gallate

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

رودخانه بهمن شیر معرفی گردید(خفایی، ۱۳۹۴). خالص سازی این گونه با همکاری ایستگاه تحقیقات شیلاتی بندر امام خمینی و بوسیله ی میکروسکوپ معکوس تباین فاز انجام گردید.

خشکاندن و فریز کردن نمونه روتیفرو تهیه مواد مورد نیاز

در آزمایشگاه از نمونه های گونه‌ی مذکور آبگیری انجام شده و جهت خشکاندن به مدت ۲۴ ساعت در Freeze dryer قرار گرفتند. سپس نمونه ها به فریزر ۲۰-°C جهت نگهداری منتقل شدند. آنزیمهای مورد استفاده در این آزمایش α- Chymotrypsin, Papain, Neutrase, Pepsin, Trypsin و Alcalase از شرکت سیگما تهیه شد. همچنین 1,1-Diphenyle-2-Pycryl-Hydrazyl(DPPH) نیز از همین شرکت سیگما تهیه گردید.

آماده‌سازی هیدرولیز آنزیمی روتیفر

جهت تهیه هیدرولیز آنزیمی، ۰/۰۱گرم از روتیفر فریز و خشک شده را به همراه ۰/۱ گرم از آنزیم‌های بالا، بطور جداگانه در ۶ لوله آزمایش حاوی ۱ میلی لیتر بافر مخصوص همان آنزیم ریخته تا به مدت ۱۲ ساعت درون حمام آب و روی همزن مغناطیسی (RH B2) در شرایط مطلوب (دما و pH) مطابق جدول ۱ هیدرولیز شدند. بعد از انجام واکنش، فعالیت آنزیم‌ها با جوشاندن در دمای۱۰۰°C به مدت ۱۰ دقیقه متوقف گردید. در نهایت، لوله‌های آزمایش حاوی محلول هیدرولیز آنزیمی روتیفر در دور۳۵۰۰ به مدت ۴۵ دقیقه سانتریفیوژ (RR-12) شدند(Byun *et al*., 2009).

جدول۱: شرایط مطلوب هیدرولیز آنزیمی برای آنزیم های مختلف(Byun *et al*., 2009).

آنزیم	بافر	pH	دما(°C)
Alcalase	سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار	۷	۵۰
α- Chymotrypsin	سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار	۸	۳۷
Neutrase	سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار	۸	۵۰
Papain	سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار	۶	۳۷
Pepsin	گلایسین-اسیدکلریک ۲۰ میلی مولار	۲	۳۷
Trypepsin	سدیم فسفات ۵۰ میلی مولار	۸	۳۷

تعیین فعالیت آنتی اکسیدان به وسیله ی رادیکال آزاد دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)

DPPH از معدود رادیکال‌هایی است که در دمای اتاق پایدار است (Zhong *et al*., 2011). DPPH ترکیبی است بنفش رنگ که به دلیل حضور گروه های فنیل در ساختارش به صورت رادیکال در آمده و در واقع منبع رادیکال آزاد می‌باشند. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. رادیکال‌های آزاد موجود در DPPH در ۵۱۷ نانومتر جذب دارند که از قانون بیر لامبرت پیروی می‌کنند و کاهش جذب آن با میزان ماده آنتی اکسیدان رابطه خطی دارد. هر چه بر مقدار ماده آنتی اکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد متمایل شود (Mishra *et al*., 2012). آزمایش با DPPH ساده تر، کارآمدتر و سریعتراز روشهای دیگر است، به همین علت رایج‌ترین روش مورد استفاده در ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی است (Krishnanand *et al*., 2012;

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

تعیین فعالیت مهارکنندگی طبق روش Yenو Hsieh (۱۹۹۵) انجام گردید. دراین مرحله برای تعیین خاصیت آنتی اکسیدانی، به ۱ میلی لیتر از هریک از نمونه های هیدرولیز، ۳ میلی لیتر متانول و ۱ میلی لیتر DPPH ۰/۰۱۵ میلی مولار اضافه شد. مخلوط بدست آمده به شدت تکان داده شد و اجازه داده شد تا در دمای اتاق در تاریکی به مدت ۳۰ دقیقه قرار بگیرد. جذب نوری مخلوط حاصل در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis مدل(UV331) ا ندازه گیری گردید. برای تهیه محلول کنترل از ۴ میلی لیتر متانول و ۱میلی لیتر DPPH استفاده شد. درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPHH مطابق فرمول زیر محاسبه گردید(Akinmoladun *et al.*, 2007):

$$SA^{5}\ \% = Abs_{control} - Abs_{sample} \ / \ Abs_{control} \times 100$$

خالص‌سازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی با استفاده از HPLC

به منظور ارزیابی پتانسیل آنتی اکسیدانی پپتیدهای بدست آمده از پروتئین روتیفر ، هیدرولیز روتیفری که دارای بیشترین مقدار خاصیت آنتی‌اکسیدانی است را در جهت بدست آوردن پپتیدهای آنتی اکسیدانی روی ستون ژل فیلتراسیون سفادکس (G-250) دستگاه HPLC (۲۵۰×۹/۴mm) قرار داده و با توجه به اندازه‌های مولکولی جداسازی انجام گردید. پس از جداسازی فرکشن‌ها، خاصیت آنتی اکسیدانی آنها با استفاده از DPPH تعیین و فرکشن دارای بالاترین فعالیت مهارکنندگی دوباره به دستگاه HPLC تزریق شد تا توسط فاز معکوس دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) روی ستون Eurospher 100-5 C18(۶/۴mm ×۲۵۰) با استفاده از گرادیان شیب خطی استونیتریل(۵۰ دقیقه ۵۰ ,v.v, ٪۵۰-۰) شامل ۰/۱٪ تری فلورو استیک اسید(TFA) در یک میزان جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه جداسازی انجام گردید. این بخش‌ها دوباره روی همان ستون با استفاده از گرادیان خطی همان استونیتریل که شامل ۰/۱٪ TFA در میزان جریان ۱ میلی لیتر بر دقیقه کروماتوگرافی شدند. فعالیت مهارکنندگی فرکشن‌های بدست آمده دوباره توسط DPPH تعیین گردید و در نهایت فرکشنی که دارای بالاترین خواص آنتی اکسیدانی است مشخص گردد(Byun *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2010).

نتایج

نتایج آماده‌سازی هیدرولیز پروتئین روتیفر و بررسی خواص آنتی اکسیدانی آنها

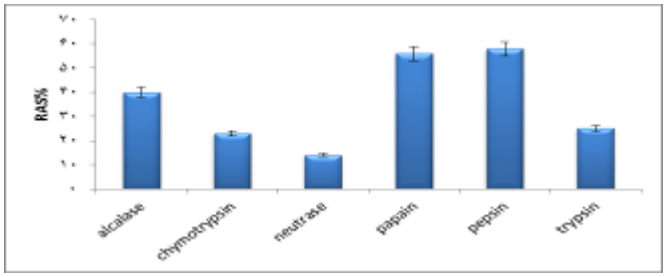
به منظور تهیه پپتیدهای آنتی اکسیدانی از *B. plicatilis* ، ۶ هیدرولیز با استفاده از فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH، مورد ارزیابی قرار گرفتند. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیز آنزیم های پپسین، پاپین، آلکالاز ، تریپسین، α-کیموترپسین، و نئوتراز به ترتیب ۵۸، ۵۶، ۴۴، ۲۵، ۲۳، و ۱۴٪ بود که هیدرولیزهای پپتیکی(گوارشی) یعنی پپسین، پاپین و آلکالاز به ترتیب با مقادیر ۵۸، ۵۶ و ۴۴٪ در ۰/۰۱۵ میلی گرم در میلی لیتر DPPH در مقایسه با دیگر هیدرولیزها بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را از خود نشان دادند.

نتایج خالص‌سازی پپتید های آنتی اکسیدانی با استفاده از HPLC

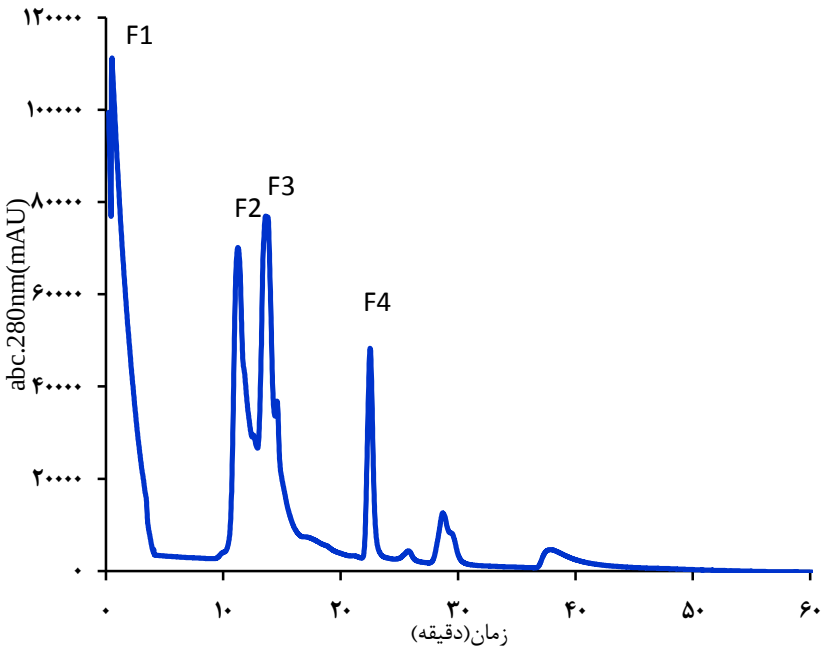
خالص‌سازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی از هیدرولیز پپسین ، با استفاده از تکنیک‌های مختلف کروماتوگرافی انجام شد. در گام نخست، هیدرولیز پپسین روی ستون کروماتوگرافی سفادکس G-25، ۴ فرکشن جداسازی شد(F_1-F_4) (شکل۱). تمامی فرکشن‌های جمع آوری شده مجدداً در معرض فعالیت آنتی اکسیدانی DPPH قرار گرفتند. همان طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود فرکشن F_4 با ۵۸٪ دارای بالاترین فعالیت مهارکنندگی روی رادیکال DPPH است. در گام بعدی، جداسازی F_4 با استفاده از فاز معکوس HPLC روی ستون Eurospher 100-5 C18 (۶,۴mm ×۲۵۰) انجام شد که هشت فرکشن(F_4-1 – F_4-8) مختلف بدست آمد (شکل۴). از بین فرکشن‌های بدست آمده مشاهده شد که فرکشن F_4-3 و F_4-1 بیشترین قدرت آنتی اکسیدانی را دارا می‌باشند(شکل۵).

[5] Radical Scavenging Activity

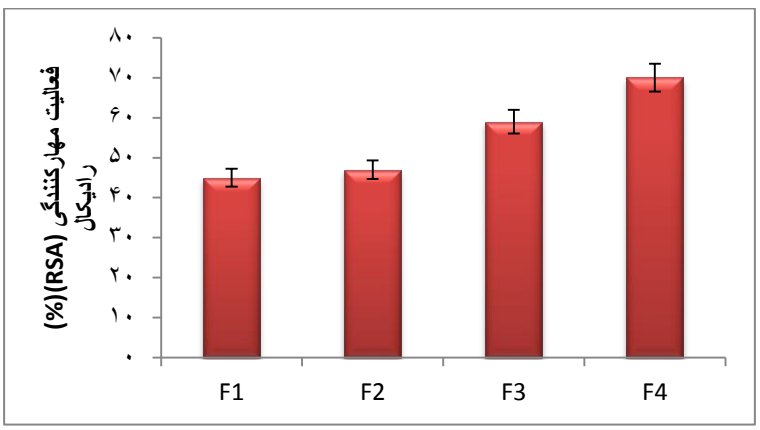
[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]



شکل۱: فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH هیدرولیز روتیفر آماده شده توسط آنزیم‌های مختلف مهارکنندگی

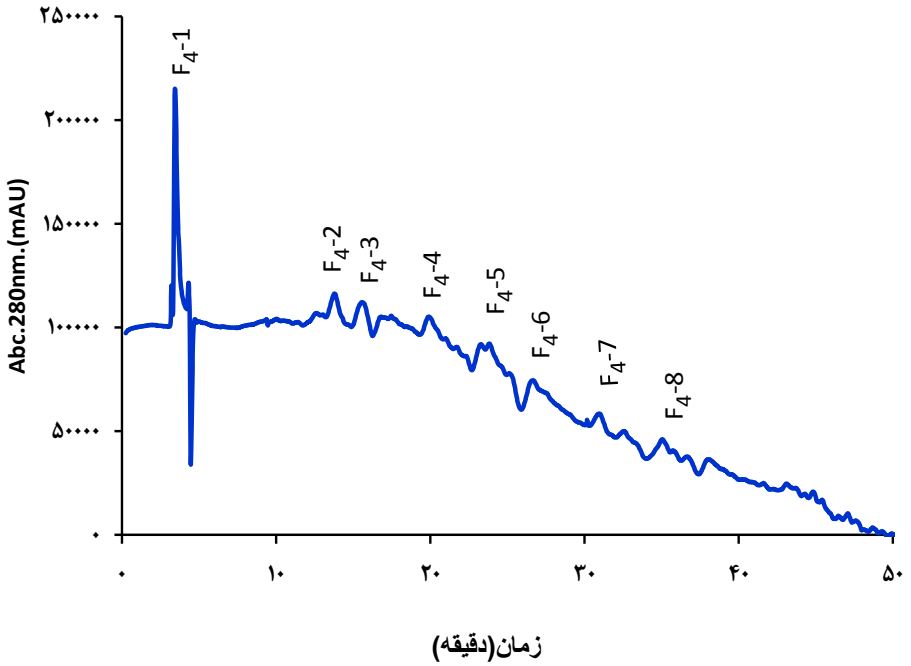


شکل۲: جداسازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی از هیدرولیز پپسین روتیفرهای *B. plicatilis* توسط ژل سفادکس G-25 کروماتوگرافی

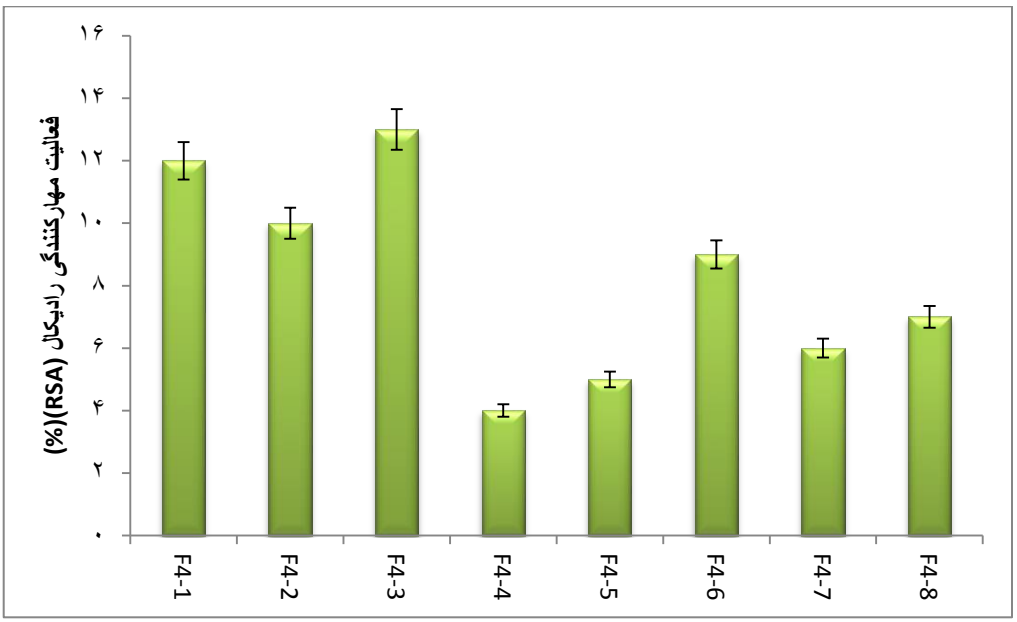


شکل ۳: اندازه گیری میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی هریک از فرکشن‌ها توسط فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]



شکل ۴: جداسازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی فرکشن فعال F_4 با استفاده از فاز معکوس HPLC روی ستون Grom-sil 120 OSD-5 ST



شکل۵: اندازه گیری میانگین فعالیت آنتی اکسیدانی فرکشن های حاصل از فرکشن F_4 توسط فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

روش‌های انجام HPLC با ۴۰-۰٪ استونیتریل به عنوان فاز همراه در جریان ۲/۰ میلی گرم بر دقیقه با استفاده از دتکتور در طول موج ۲۸۰ نانومتر انجام شدند.

بحث و نتیجه گیری

اخیراً توجه زیادی نسبت به ترکیبات دریایی به عنوان عوامل امن و مؤثر در پیشگیری و درمان بیماری های مزمن شده است. مطالعات گسترده در مورد پپتید های حاصل از موجودات دریایی در تولید محصولات غذایی و نیز دارویی انجام شده است. روتیفرها به ویژه گونه ی *B. Plicatilis* نوعی زئو پلانکتون آب شیرین و لب شور بوده که در شرایط مساعد تولید مثل بکرزایی[6] داشته و به همین علت در تکثیر و پرورش غذای زنده آبزیان و لارو آنها همواره مورد استفاده قرار می گیرند. به عنوان مثال جهت پرورش لارو تاس ماهی ایرانی از روتیفر غنی شده در دوران ابتدای لارو ماهی که دارای تغذیه فعال می باشند، استفاده می نمایند(روفچایی و همکاران، ۱۳۹۴). از طرف دیگر فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در پپتیدهای روتیفرها به اثبات رسیده است (Byun *et al*., 2009). پپتید های دریایی به عنوان یک منبع ارزشمند از ترکیبات فعال زیستی معرفی شده اند که می توانند در گسترش صنایع غذایی و دارویی حائز اهمیت باشند. هیدرولیز آنزیمی یکی از روش‌های موثر برای تهیه پپتیدهای فعال زیستی از منابع زیستی می‌باشد که به طور گسترده‌ای در جهت ارتقاء و بهبود خواص عملکردی و تغذیه‌ای پروتئین استفاده می‌شود (Phanat *et al*., 2012). اگر چه پپتید-های آنتی اکسیدانی را می‌توان از روش‌های فیزیکی و شیمایی مانند گرما دادن یا تجزیه در محلول اسید-قلیایی از پروتئین‌های والد آزاد کرد اما روش هیدرولیز آنزیمی به دلیل شرایط قابل کنترل و معتدل تر در جهت ایجاد ثبات در پپتیدها و اطمینان از تکرار پذیری نتیجه در آن ، به طور گسترده‌ای در آماده‌سازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی از منابع دریایی استفاده می‌شود(Wu *et al*., 2015).

در این پژوهش، فعالیت‌های آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای استخراج شده از روتیفر *B. Plicatilis* به وسیله‌ی آنزیم-های α-Chymotrypsin , Papain, Neutrase, Pepsin, Trypsin و Alcalase و با استفاده از فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH مورد شناسایی و ارزیابی قرار گرفتند. در نهایت، هیدرولیز پپسین(۵۸ و ۵۶٪ در غلظت ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر در مدت زمان هیدرولیز ۱۲ ساعت) بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد (شکل۱) با استفاده از روش های کروماتوگرافی جداسازی شد(شکل۲). قابل ذکر است که پپسین آنزیم گوارشی هست که از پانکراس گاو استخراج می‌شود(Byun *et al*., 2009). در حالی که هیدرولیز Neutrase پایین ترین فعالیت آنتی اکسیدانی را نشان داد (شکل۱). در مطالعه مشابه دیگر Byun و همکاران(۲۰۰۹)، پروتئین روتیفر *B. Plicatilis* را با استفاده از پروتئازهای Chymotrypsin, Papain, Neutrase, Pepsin, Trypsin و Alcalase) به منظور تهیه پپتیدهای آنتی اکسیدانی هیدرولیز نمودند. نتایج این تحقیق نشان داد که در فعالیت‌های پپتید های آنتی اکسیدانی هیدرولیز های مستخرج از روتیفر *B. Plicatilis* که توسط فعالیت مهارکنندگی DPPH ارزیابی شده اند، بیشترین هیدرولیز مربوط به پپسین (۵۷ ٪ غلظت۱ میلی مولار در مدت زمان هیدرولیز ۱۲ ساعت) و پایین ترین هیدرولیز مربوط به آنزیم Neutrase فعالیت آنتی اکسیدانی را در مقایسه با دیگر هیدرولیز ها می باشند.

Kim و همکاران (۲۰۰۷)، برای استخراج پپتید های آنتی اکسیدانی از پروتئین اسکلت ماهی Hoki از شش پروتئاز (-a, Alcalase, Papain, Trypsin, Pepsin, Chymotrypsin, Neutrase) استفاده نمودند و فعالیت-های آنتی اکسیدانی آنها را هم با استفاده از روش پراکسیداسیون لیپید و روش مهارکنندگی رادیکال DPPH تعیین کردند. در میان هیدرولیزها، هیدرولیز گوارشی پپسین دارای بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی بودندکه با نتایج حاضر مطابقت دارد. در حالیکه Wang و همکاران (۲۰۱۳) بر روی خالص‌سازی پپتیدهای آنتی اکسیدانی از صدف‌های دو کفه‌ای آبی (*Mytilus edulis*) توسط ۴ آنزیم Neutrase, Papain, Pepsin و Alcalase داشتند، مشاهده نمودند که در مدت زمان هیدرولیز ۳ ساعت، هیدرولیز Neutrase دارای بالاترین فعالیت مهارکنندگی DPPH به میزان(۲۸/۸٪) بود و در مدت

[6] parthenogenesis

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

زمان ۴ ساعت هیدرولیز Pepsin دارای بالاترین فعالیت مهارکنندگی بود که تا حدی با نتایج ارزیابی تحقیق حاضر هم خوانی دارد. پس مدت زمان هیدرولیز نیز عامل مهمی در فعالیت مهار کنندگی می باشد. در تایید نتایج حاضر نیز Wang و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که زمان هیدرولیز و نوع آنزیم بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی اثر می گذارد. آقای Chen و همکاران (۱۹۹۵) ثابت کرده اند که فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین ها می تواند از طریق هیدرولیز با آنزیم های خاصی افزایش یابد و بدین ترتیب برخی پپتید ها فعالیت آنتی اکسیدانی قوی تری نسبت به سایر پپتید ها نشان دهند. علاوه بر این، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیز پروتئین به سوبسترای پروتئین، ویژگی آنزیم، شرایط مورد استفاده در طول هیدرولیز و درجه هیدرولیز بستگی دارد. Phanat و همکاران (۲۰۱۲) فعالیت های آنتی اکسیدانی هیدرولیز پروتئین پوست کوسه ماهی Blacktip را در مدت زمان‌های مختلف هیدرولیز مقایسه کردند. آنها نشان دادند که هیدرولیز بیشتر با فعالیت آنتی اکسیدانی قوی در ارتباط است. اگرچه، با هیدرولیز طولانی مدت، پروتئین‌ها و یا زنجیر-های بلند پپتیدی به قطعات کوچکتر تبدیل می‌شوند. با این حال، هیدرولیز بیش از حد ممکن است پپتیدهای آنتی اکسیدانی را از بین ببرد.

نتیجه‌گیری کلی

منابع دریایی به عنوان منابع عالی از عصاره زیستی کاربردی قوی شناخته شده است. مطالعات اخیر، مدارکی را ارائه داده‌اندکه این مواد طبیعی دریا نقش حیاتی در سلامت انسان و تغذیه بازی می‌کند. روتیفرها به عنوان غذای زنده برای پرورش لارو ماهی‌های دریایی مهم هستند. در این مطالعه، به منظور بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی، پروتئین روتیفر *B. plicatilis* با استفاده از هیدرولیز آنزیمی و به وسیله ی آنزیم‌های مختلف مورد ارزیابی قرار گرفت، سپس با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی متوالی، پپتیدهای آنتی اکسیدانی با مهارکنندگی قوی رادیکال DPPH خالص سازی شدند. نتیجه ی کلی این تحقیق نشان داد که آنتی اکسیدان-های طبیعی را می توان از روتیفر *B. plicatilis* جدا سازی نموده و با توجه به ارزانی و سهولت تکثیر و پرورش روتیفر یاد شده آن را پس از تحقیقات تکمیلی به بخش صنعت نیز برای انبوه سازی معرفی نمود .

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم که مراتب تشکر و قدردانی خود را از همکاری مهندس پقه کارشناس ایستگاه تحقیقاتی شیلات بندر امام خمینی ابراز می نمائیم.

منابع

خفایی، ک.، ۱۳۹۴. بررسی تنوع زیستی گونه های روتیفر بهمنشیر و تعیین پتانسیل تولید پپتیدهای آنتی اکسیدان از گونه های غالب آن از رودخانه ی بهمنشیر. پایان نامه کار شناسی ارشد . دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر . ص۹۶.

روفچایی، ر.، فلاحی کپورچالی، م.، پروانه مقدم، د. و چوبیان، ف.، ۱۳۹۴. تاثیر روتیفر آب شیرین غنی شده با ویتامین C بر شاخصهای رشد لارو تاسماهی ایرانی *(Acipenser persicus)*. مجله علمی شیلات ایران (۳) ۲۴. ۱۳۹-۱۴۴.

Akinmoladun, A.C., Ibukun, E.O., Afor, E., Akinrinlola, B.L., Onibon, T.R., Akinboboye, A.O., Obuotor, E.M. and Farombi, E.O., 2007. Phytochemical constituents and antioxidant properties of extracts from the leaves of Chromolaena odorata**.** Scientific research and essay Journal, 2(5):163-165.

Ando, Y., Kobayashi, S., Sugimoto, T. and Takamaru, N., 2004. Positional distribution of n- 3 highly unsaturated fatty acids in triacyl-sn-glycerols (TAG) of rotifers (*Brachionus plicatilis*) enriched with fish and seal oils TAG. Aquaculture, 229(1): 275-288.

Aragão, C., Conceição, L. E., Dinis, M. T. and Fyhn, H.J., 2004. Amino acid pools of rotifers and Artemia under different

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

conditions: nutritional implications for fish larvae. Aquaculture, 234(1): 429-445.

Balti, R., Bougatef, A., El Hadj Ali, N., Ktari, N., Jellouli, K., Nedjar-Arroume, N. and Nasri, M., 2011. Comparative study on biochemical properties and antioxidative activity of cuttlefish (*Sepia officinalis*) protein hydrolysates produced by Alcalase and Bacillus licheniformis NH1 proteases. Journal of amino acids.1-11. doi:10.4061/2011/107179.

Byun, H.G., Lee, J.K., Park, H.G., Jeon, J. K. and Kim, S.K., 2009. Antioxidant peptides isolated from the marine rotifer, *Brachionus rotundiformis*. Process Biochemistry, 44(8): 842-846.

Chen, H.M., Muramoto, K. and Yamauchi, F., 1995. Structural analysis of antioxidative peptides from soybeanb-conglycinin.Journal of Agricultural and Food Chemistry, 43, 574–578.

Hartmann, R. and Meisel, H., 2007. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. Current opinion in biotechnology, 18(2): 163-169.

Jia, J., Zhou, Y., Lu, J., Chen, A., Li, Y. and Zheng, G., 2010. Enzymatic hydrolysis of Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) skin and antioxidant activity of the resulting hydrolysate. Journal of the Science of Food and Agriculture, 90(4): 635-640.

Kim, S.Y., Je, J.Y. and Kim, S.K., 2007. Purification and characterization of antioxidant peptide from hoki (*Johnius belengerii*) frame protein by gastrointestinal digestion. The Journal of Nutritional Biochemistry, 18(1): 31-38.

Ko, J.Y., Lee, J.H., Samarakoon, K., Kim, J.S. and Jeon, Y.J., 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. Food and Chemical Toxicology, 52, 113-120.

Krishnanand, M., Himanshu, O. and Nabo, K.C., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: a critical review and results.Food Chemistry, 130: 1036–1043.

Lee, J. K., Yun, J. H., Jeon, J. K., Kim, S. K. and Byun, H.G., 2010. Effect of antioxidant peptide isolated from *Brachionus calyciflorus*. Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry. 53(2): 192-197.

Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H.G. and Kim, S.K., 2005. Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sciences, 77(17): 2166-2178.

Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N.K., 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. Food Chemistry, 130(4), 1036-1043.

Nazeer, R.A., Kumar, N.S. and Ganesh, R.J., 2012. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the croaker(*Otolithes ruber*)muscle protein hydrolysate. Peptides, 35(2): 261-268.

Phanat, K., Soottawat, B., Wonnop, V. and Fereidoon, S., 2012. Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme: antioxidant activity

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

and its potential in model systems. Food Chemistry, 135: 1118–1126.

Qian, Z.J., Jung, W.K., Byun, H.G. and Kim, S.K., 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. Bioresource Technology, 99(9): 3365-3371.

Ranathunga, S., Rajapakse, N. and Kim, S.K., 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). European Food Research and Technology, 222(3-4): 310-315.

Shei, M.R.P., Rodrigues, R.V. and Sampaio, L.A., 2012. Use of commercial live feeds enrichment during first feeding period of the barber goby *Elacatinus figaro*. Aquaculture,. Aquarium, Conservation & Legislation, 5(1):9-12.

Srivastava, A., Hamre, K., Stoss, J., Chakrabarti, R. and Tonheim, S.K., 2006. Protein content and amino acid composition of the live feed rotifer (*Brachionus plicatilis*): with emphasis on the water soluble fraction. Aquaculture, 254(1): 534-543.

Wang, B., Li, L., Chi, C.F., Ma, J.H., Luo, H.Y. and Xu, Y.F., 2013. Purification and characterisation of a novel antioxidant peptide derived from blue mussel (*Mytilus edulis*) protein hydrolysate. Food chemistry, 138(2): 1713-1719.

Wu, R., Wu, C., Liu, D., Yang, X., Huang, J., Zhang, J. and Li, H., 2015. Overview of Antioxidant Peptides Derived from Marine Resources: The Sources, Characteristic, Purification, and Evaluation Methods. Applied biochemistry and biotechnology, 176(7): 1815-1833.

Yen, G.C. and Hsieh, P.P., 1995. Antioxidative activity and scavenging effects on active oxygen of xylose-lysine maillard reaction products. Journal of the Science of Food and Agriculture, 67(3): 415-420.

Zhong, S., Ma, C., Lin, Y.C. and 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(4): 1636-1642.

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]
[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]

Evaluation of antioxidant activity of the purified peptides from hydrolysis of rotifer (*Brachionus plicatilis*)

Khafaeizadeh K.[1], Sakhaei N.[1], Doustshenas B.[1]*, Ghanemi K.[2], Zolgharnein H.[1]

*babakdoust@yahoo.com

1- Department of Marine Biology, Faculty of marine science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran.P.O.Box: 669
2-Department of Marine Chemistry, Faculty of marine science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran. P.O.Box: 669

Abstract

Rotifers are an important group of zooplankton in aquatic ecosystems that contain relatively high amounts of unsaturated fatty acids, proteins and peptides. Rotifers, especially *Brachionus plicatilis* species, are one of the important live food sources for maine fish larvae in aquaculture. The aim of this study was to evaluate the antioxidant activities of purified peptides from *B. plicatilis*. Antioxidant peptids of the *B. plicatilis* have been hydroylzed by Alcalase, α-Chymotrypsin, Papain, Neutrase, Pepsin, and Trypsin. Their antioxidant activity were evaluated by the free radical inhibitpory effect of diphenylpicrylhydrazyl (DPPH). Also the sequential chromatography method was used for extraction and purification of the peptides. The results showed that peptides obtained from the pepsin hydrolysate have a higher inhibitory effect than other peptides. Pepsin showed 58% inhibitory effect in 0.015 mM DPPH. Finally, the pepsin hydrolyzate constitutes were purified and isolated by gel-filtration chromatography (Sephadex G-250) and reverse-phase liquid chromatography on Eurospher C18 column (250×4.6 mm), respectively. The results of this study have been recognized the high antioxidant activities of extracted hydrolysates from *B. plicatilis* and their feasibility of using them in food industries as a food complement.

Keywords: Rotifers, DPPH, antioxidant peptides, enzyme hydrolysis, pepsin.

Corresponding author

[Downloaded from isfj.ir on 2025-07-07]

[DOR: 20.1001.1.10261354.1395.25.2.15.7]
[DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240]