

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

رضوان موسوی ندوشن^{*}، 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 پذیرش: مهر ۱۳۹۷

تاریخ دریافت: مرداد ۱۳۹۷

چکیده

در این تحقیق میگوی *Macrobrachium nipponense* صید شده، بصورت تازه همگن و توسط آنزیم پیسین 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 اورتوفناترولین 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 پیسین، میزان آمینو اسیدهای تولید شده، نشان دهنده سطوح بالای گلیسین، پرولین، آرژینین، آلانین 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 می شوند. 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، پیسین، *Macrobrachium nipponense*، هیدرولیز، کمپلکس آهن

^{*}نویسنده مسئول

مقدمه

فرآیندهای افزایش سن و در نهایت افزایش امید به زندگی (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 پیتیدها، می‌توانند به طور مستقیم و به صورت دست‌خورده 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 پروتئین‌پیتیدهای زیست فعال، تولید اجزای غذایی با ارزش افروده و غنی‌سازی شده یا فرآوردهای صنعتی استفاده شده است (یاسمی و همکاران، ۱۳۹۲؛ Kristinsson and Rasco, 2000؛ Liu *et al.*, 2008؛ Battison *et al.*, 2008؛ Li *et al.*, 2008؛ Jung *et al.*, 2006؛ Jung and Kim, 2007)، پیتیدهای ضد میکروبی (Wu *et al.*, 2012) و پیتیدهای حامل مینرال‌ها (Guerard *et al.*, 2007) و پیتیدهای حامل فلزات مشتق شده از صدف (Chen *et al.*, 2013)، ماهی کولی (Miquel and Farre, 2007) و چندین پیتید که خصوصیات عملکردی خاصی نشان می‌دهند، اشاره نمود. *Macrobrachium nipponense* در جنس نر ۸۶ میلی متر و جنس 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؛ Tapiero *et al.*, 2001) و در حال حاضر، یکی از گونه‌های آب شیرین است که به صورت گسترده در جهان پرورش داده می‌شود. همچنین این میگو در استخراج‌های 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 طور تصادفی از طریق مخازن حمل انتقال ماهی قزل آلا به این منابع آبی راه یافته باشد. اخیراً تعداد این گونه میگو در محیط‌های طبیعی به طور قابل توجهی افزایش یافته است، از

آهن یک ماده معدنی ضروری برای تمام موجودات زنده است. بیست درصد از مردم سراسر جهان که اغلب زنان، بچه‌ها و افراد مسن هستند، از کمبود آهن رنج می‌برند (Chiplonkar *et al.*, Girelli *et al.*, 2018؛ 1999؛ همواره به آنها توصیه می‌شود از مکمل‌های خوارکی که حاوی اشکال مختلف آهن مانند نمک‌های معدنی، عنصر آهن و پروتئین‌های حاوی پیتید 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 واکنش پذیری 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 پیتیدها 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 غذا‌دارو، اغلب در فرم فعل خود از سیستم گوارش عبور می‌کنند، از طریق روده جذب می‌گردد و از طریق سیستم گردش خون جهت بروز خواص و عملکردی‌های 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 عملکردی‌های خاص فیزیولوژیک را بر عهده 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 گلوكز خون، تقویت حافظه، تاخیر در

و با قرار دادن در دمای ۹۰ درجه سانتی گراد 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 et al., 1998).

درجه هیدرولیز (DH)^۱ 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، میگویی همگن شده با اسید تری کلرواستیک٪ ۲۰ (TCA) ترکیب و پس از آن ۴۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد و ازت کل به روش کجدال (AOAC, 1995) با ضریب تبدیل ۶/۲۵ اندازه گیری شد. همچنین غلظت پروتئین/پیتید محلول در نمونه های هیدرولیز شده، با اندازه گیری جذب در طول موج ۲۸۰ با استفاده از اسپکترو فوتومتر Nanodrop مشخص گردید (Larson et al., 2018).

مرحله تعیین پتانسیل جذب آهن

برای این منظور، ابتدا مواد معدنی طبیعی موجود در پروتئین هیدرولیز شدن 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 سانتریفیوژ و حذف آهن غیر محلول 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٪ هیدروکیتون و اور توفنان ترولین ٪ ۲۵ به نمونه اندازه گیری شد.

جمله حضور و پراکنش آن از تالاب های آلاگل، آمالاگل 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 می باشد، مورد بهره برداری قرار نگرفته است. در صورتیکه اگر هیدرولیز گردد، می تواند به لحاظ اقتصادی منبع خوبی برای درآمدزا ای می باشد. لذا پژوهش حاضر با هدف بهینه سازی پیتید جاذب آهن به عنوان پیتیدهای فراسودمند از هیدرولیز میگویی *M. nippone* طراحی گردید. این امر می تواند منجر به استفاده بهینه از این میگویی بومی وحشی و تولید یک مکمل جاذب آهن در صنایع غذایی گردد.

مواد و روش کار

در اولین مرحله میگو *M. nippone* از دریاچه های اطراف تهران (دریاچه پارک ارم، تابستان ۱۳۹۶) صید و جمع آوری گردید. پس از شستشو، میگوها به طور کامل (بدون جداسازی ضایعات بدن) برای همگن سازی در مخلوط کن ریخته شدند تا پروتئین های تمامی بخش های بدن میگو در آزمایش مورد استفاده قرار گیرد.

میگو چرخ شده در کیسه های پلاستیکی در دمای منفی ۲۰ درجه سانتی گراد تا زمان استفاده، بسته بندی گردید. برای انجام عملیات هیدرولیز، ابتدا مواد همگن شده، جهت یخ زدایی در دمای اتاق قرار گرفت و سپس به نسبت ۱: ۲M HCl با استفاده از ۲M HCl در حد ۳ تنظیم شد و در مرحله بعدی آنزیم پیپسین 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 سانتی گراد، با ۱۷۵ دور در دقیقه تنظیم گردید. در زمان های ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت بخشی از نمونه برداشته شد

^۱ Degree of Hydrolysis

که بر طیف وسیعی از انواع سوبسترا (ترکیبات پروتئینی) تاثیرگذار است و عمدتاً پیوندهای پپتیدی در انتهای نیتروژنی آمینو اسید های حلقی و هیدروفوبیک (شامل گلیسین، پرولین، لوسین، آلانین، ایزولوسین، متیونین، متیونین و والین) در پیوند با کربوکسیل شاخه های جانبی فنیل آلانین و لوسین را قطع می کند. همین تنوع پیوندها که طی فرآیند پیسینولیز منقطع می شوند، منجر به تولید طیف متنوعی از پپتیدها می شود (Malak, 1998).

هیدرولیز *M. nippone* در طول ۶ ساعت اول با سرعت بالا انجام شد و سپس واکنش آنزیمی به حالت پایدار رسید. با توجه به سینتیک آنزیمی، پیسین در واکنش های تجزیه *M. nippone* در کمتر از ۸ ساعت درجه هیدرولیز را به میزان $\frac{33}{2}$ % رسانید و در طول ۱۲ ساعت، بالاترین درجه هیدرولیز $\frac{36}{5}$ % را بخود اختصاص داد (شکل ۱).

این یافته ها مطابق با برخی از پروتئولیزهای انجام شده بر سوبستراهای های دریابی است که از آن جمله می توان به ضایعات میگویی هیدرولیز شده توسط آنزیم آکالاز با (Synowiecki and Al-Khatee, %DH = 30% 2000)، هیدرولیز سر ماهی ساردين با پروتامکس با (Dumay et al., 2006) %DH = 20%， یا هیدرولیز کل بدن ماهی کرواکر زرد کوچک با پروتئاز با (Ji et al., 2013) اشاره نمود.

تغییرات غلظت پروتئین محلول در هیدرولیز بوجود آمده، از روند 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 $\frac{23}{7}$ mg/ml رسید و پس از ۱۲ ساعت هیدرولیز، به حداقل غلظت $\frac{30}{7}$ mg/ml 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 $\frac{39}{7}$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ پپتید/پروتئین افزایش نشان داد (شکل ۲).

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

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

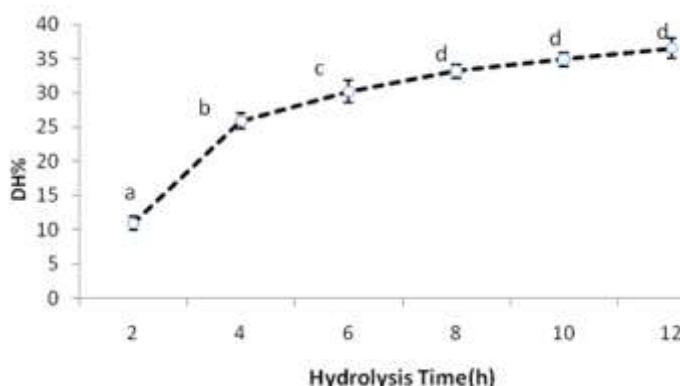
نتایج

در طول هیدرولیز آنزیمی میگویی درصد کل نیتروژن، به عنوان نشانه ای از درجه هیدرولیز پروتئین در نظر گرفته شد. نتیجه آزمایش محلول 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 طولانی تر شدن زمان هیدرولیز یافته های میگویی *M. nippone* غلظت پروتئین/پپتید در فاز محلول افزایش یافت و به بالاترین سطح در ۱۲ ساعت هیدرولیز رسید.

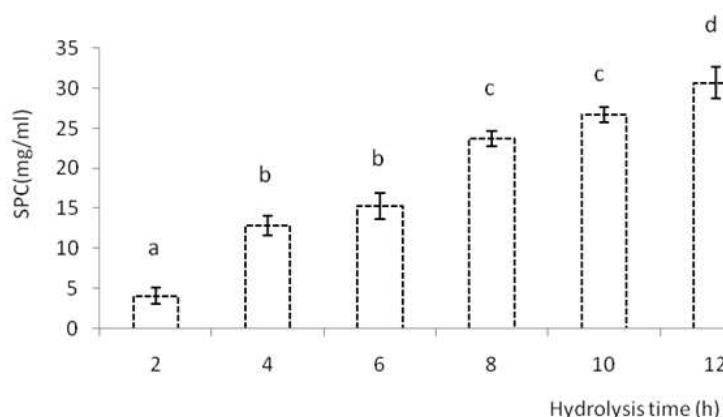
بحث

مهما ترین 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 Kristinsson and Rasco, 2000; (Guerard et al., 2007) انجام می شود.



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. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

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 \pm STDEV ($n = 3$), the minuscules have shown the significant difference ($p < 0.05$).

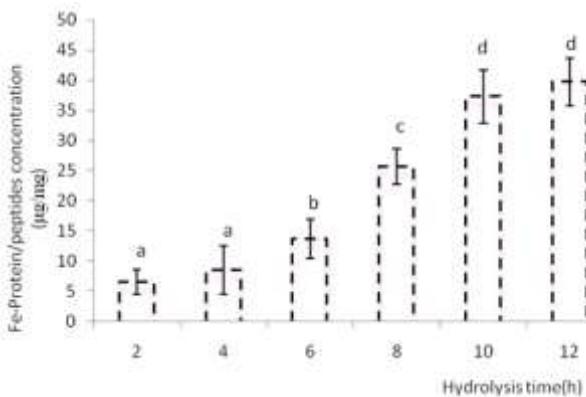


شکل ۲: غلظت پروتئین/پپتید در محلول حاصل از هیدرولیز، به دست آمده از بافت‌های میگوی *M. nipponense*. داده‌ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

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

واکنش شیمیایی بیشتر با آهن، نسبت به پروتئین پلاسمای خون ($27 \mu\text{g}/\text{mg}$) و ضایعات فرآوری شده میگو ($17 \mu\text{mol}/\text{g}$) می‌باشد (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 ($100 \mu\text{g}/\text{mg}$) کمتر ارزیابی گردید (Wu et al., 2017).

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 خوب و ضایعات میگوی هیدرولیز شده متناسب با افزایش زمان هیدرولیز، افزایش می‌یابد (شکل ۳). همچنین در این تحقیق مشخص شد که پروتئین‌ها و پپتیدهای موجود در هیدرولیز *M. nipponense* دارای قدرت جذب آهن و

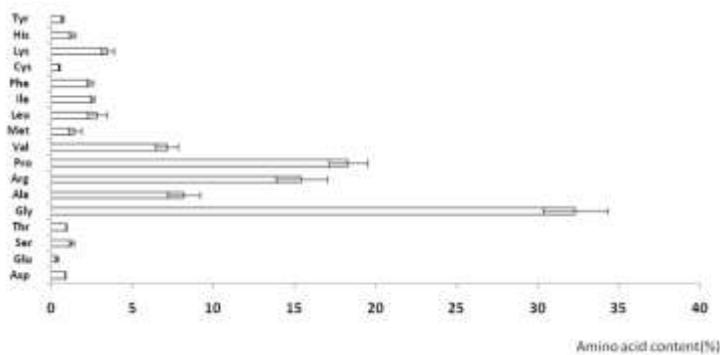


شکل ۳: پتانسیل اتصال آهن و غلظت پروتئین حاوی آهن در محلول های حاصل از هیدرولیز بافت های میگوی *M. nipponense* توسط آنزیم پیپسین . داده ها بر اساس میانگین و انحراف معیار سه تکرار نشان داده شده است و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد ($p<0.05$).

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

پروولین، آرژینین، آلانین، والین و سپس لیزین، لوسین و فنیل آلانین بود (شکل ۴).

از سوی دیگر، آمینو اسیدهای آزاد تولیدی طی فرآیند هیدرولیز *M. nipponense* نشانگر سطوح بالای گلیسین،



شکل ۴: محتوای آمینو اسیدهای آزاد تولید شده در مخلوط حاصل از هیدرولیز بافت های میگوی *M. nipponense* توسط آنزیم پیپسین . 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 \pm STDEV ($n = 3$).

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 بدليل غلظت های بالاتر آلانین، لیزین و فنیل آلانین در توالی

این نشان می دهد که بیشتر پایانه های پپتیدها در هیدرولیز توسط پیپسین ممکن است توسط این اسیدهای آمینه شکل گرفته باشد. نظر به اینکه N-terminal پپتیدهای تولید شده، بر ظرفیت اتصال پروتئین/پپتید تأثیر می گذارد، بنظر می رسد فرآورده حاصل از هیدرولیز

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

Song, 2009).

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

M. nipponense در مطالعه حاضر، از بافت میگوی بوسیله آنزیم پیپسین، فراورده هیدرولیزی با ظرفیت بالای جذب آهن بدست آمد. بدین سبب مخلوط پروتئین/پیتید ناشی از هیدرولیز این میگو می تواند در تولید ترکیبات غذایی فراسودمند، افزودنی های طبیعی یا مکمل های 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، بازنگردی و ترکیب شیمیایی بدن میگوی رودخانه ای *Macrobrachium nipponense* (De شرق Haan, 1849) ۸۳-۹۷.
- یاسمی، م.. قمی مرزدشتی، م.. دارنهال، ط.. محمدزاده، ب.. امینی، م.. مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین های موجود در امعاء و احشای ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys*)
- 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.
- 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.

- 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 *Macrobrachium 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 (*Pseudosciaena 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.

- 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.

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

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