مجله علمی شیلات ایران ۳۰(٤) ٦٥-٧٧
(DOI): 10.22092/ISFJ.2021.125169
(DOR): 20.1001.1.10261354.1400.30.4.6.7

مقاله علمی – پژوهشی:

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای هیدورلیز شده از پوسته خرچنگ *Portunus segnis*

زینب عبادی[۱]، بابک دوست شناس*[۱]، نسرین سخایی[۱]، کمال غانمی[۲]

*doustshenas@kmsu.ac.ir

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

تاریخ دریافت: شهریور ۱۳۹۹ تاریخ پذیرش: شهریور ۱٤۰۰

چکیده

خرچنگ‌های حقیقی همواره بخشی از صید جنبی را تشکیل می‌دهند. با در نظر گرفتن عدم مصرف مستقیم خرچنگ‌ها در منطقه، ضایعات پوسته آنها می‌تواند به منبع ارزشمند پروتئینی برای استخراج ترکیبات آنتی‌اکسیدان مورد بهره‌برداری قرار گیرد. در این مطالعه، نمونه‌های خرچنگ *Portunus segnis* به‌وسیله تور ترال با چشمه‌های ۴۰ میلی‌متری از اعماق ۳۰-۲۰ متر از سواحل غربی استان خوزستان جمع‌آوری شدند. برای هیدرولیز پروتئین‌های پوسته خرچنگ از آنزیم‌های a-chymotrypsin، trypsin، Pepsin، Papain، Neutrase و Alcalase استفاده شد. فعالیت آنتی‌اکسیدان پوسته خرچنگ به روش‌های حذف‌کردن رادیکال آزاد DPPH، سنجش قدرت کاهندگی آنتی‌اکسیدان و سنجش میزان فعالیت مهار ACE پروتئین‌های هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفت. بیشترین فعالیت حذف رادیکال دی فنیل‌پیکریل هیدرازیل (DPPH) برای پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های کموتریپسین و پاپایین به‌ترتیب به میزان ۱۳/۶۵±۲۳/۶۷ و ۰۲/۸۵±۲۳/۱۳ مشاهده گردید. کمترین میزان قدرت‌کاهندگی آنزیم‌های هیدرولیزکننده برای با آنزیم کموتریپسین ۰/۰۷۲ و بیشترین مقدار برای آنزیم پاپایین به میزان ۰/۱۲۲ محاسبه‌گردید. سطح فعالیت مهاری هیدرولیز حاصل از آنزیم‌های مختلف ناشی از خرچنگ نشان‌داد که بیشترین فعالیت مربوط به آنزیم پاپائین (۱۶/۲۰٪) و کمترین آن مربوط به آنزیم آلکالاز (۱۲/۵۱٪) بود. با توجه به مشاهدات به‌نظر می‌رسد که پروتئین‌های پوسته خرچنگ پس از هیدرولیز آنزیمی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، قدرت‌کاهندگی و مهار ACE در حد متوسط دارند و احتمالا پس از تحقیقات تکمیلی از پروتئین‌های هیدرولیز شده اسکلت خارجی خرچنگ می‌توان به عنوان منبع مناسبی از ترکیبات آنتی اکسیدان استفاده نمود.

لغات کلیدی: *Portunus segnis* ، آنتی اکسیدان، هیدرولیز آنزیمی، DPPH، قدرت کاهندگی

*نویسنده مسئول

مقدمه

ضایعات و مواد جانبی خرچنگ از جمله پوسته و پاها، تقریباً شامل ۸۰٪ وزن کل خرچنگ‌ها می‌شوند. این اجزاء از ترکیبات مفید و با ارزشی مانند پروتئین، لیپید تشکیل شده‌اند (Yoon *et al.*, 2013). پوسته خرچنگ سرشار از پروتئین، کیتین و بسیاری از مواد مغذی (آهن، مس و روی) است و کاربردهای بسیار زیادی برای انسان دارد. استفاده از روش هیدرولیز آنزیمی برای استفاده از پوسته خرچنگ و تولید آنتی‌اکسیدان و پپتیدهای ضد باکتری به طور موثری باعث افزایش کاربردهای اقتصادی خرچنگ می‌شود (Jianga *et al.*, 2018).

یکی از بهترین روش‌ها برای تبدیل منابع پروتئینی زاید به مواد با ارزش پروتئینی بالا و کاربردی، استفاده از آنزیم‌های پروتئاز برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد که با عنوان "پپتیدهای زیست فعال" شناخته می‌شوند. این پپتیدها معمولاً از ۲۰-۳ اسیدآمینه تشکیل شده‌اند و با توجه به ترکیب و توالی اسیدآمینه خود، فعالیت‌های زیستی گوناگونی مانند خواص آنتی اکسیدان[1]، ضد فشار خون، اثرات تعدیلی ایمنی[2]، ضد میکروبی، ضد سرطان و اثرات پایین آورنده کلسترول را از خود نشان داد (Korhonen and Pihlanto, 2006; Aluko, 2012). در سال‌های اخیر، مطالعه پپتیدهای بسیاری از موجودات‌دریایی مانند پوست اسکوئید (Mendis *et al.*, 2005)، اویستر (Qian *et al.*, 2008)، ماهی مرکب (Balti *et al.*, 2012) و ... گزارش‌شده است که دارای خواص فعال زیستی از جمله آنتی اکسیدانی، خواص ضد میکروبی، اثرات کاهش فشار خون ... می باشند.

به طور کلی، می‌توان پپتیدهای زیست‌فعال را با استفاده از روش‌های تخمیر میکروبی و هیدرولیز آنزیمی از پروتئین پیش‌ساز جدا نمود. هیدرولیز آنزیمی رایج‌ترین روش مورد استفاده برای تولید پپتیدهای زیست فعال می‌باشد. هیدرولیز آنزیمی با استفاده از پروتئازهای تجاری و نیز فرایند اتولیز صورت می‌گیرد. در حال حاضر، پروتئازهای تجاری مختلفی از منابع گیاهی، جانوری و میکروبی شامل تریپسین، کموتریپسین، پپسین، آلکالاز، پاپائین، پروناز، کلاژناز و بروملئین برای تولید پپتیدهای زیست فعال استفاده می‌گردند. نوع آنزیم مورد استفاده در فرایند هیدرولیز بسیار مهم است. عملکرد اختصاصی پروتئاز اندازه، نوع و ترکیب اسید آمینه‌ای پپتیدها و در نتیجه فعالیت زیستی آنها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. شرایط هیدرولیز همانند زمان واکنش، دما، pH و نسبت آنزیم به سوبسترا نیز تعیین‌کننده بازده و خواص زیست‌فعال پپتیدهاست (Harnedy and FitzGerald, 2012).

در مورد تنوع زیستی خرچنگ‌های گرد تحقیقات بسیاری در خلیج فارس صورت گرفته است که برخی از آنها شامل تحقیقات Naderloo و همکاران (۲۰۱۶)، عبادی و همکاران (۱۳۹۶)، اعتمادی‌دیلمی و همکاران (۱۳۹۰) می‌باشد. همچنین در مورد خواص آنتی‌اکسیدانی مطالعات متعددی در مورد جانوران آبزی در کشور ایران صورت گرفته است که می‌توان به مطالعه خفایی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) بر ارزیابی فعالیت خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتید تخلیص‌شده از روتیفرهای مصب رودخانه بهمن‌شیر، بخشان و همکاران (۱۳۹۳) بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ضایعات فیله‌ماهی آزاد تولیدی‌شده با آنزیم تریپسین، اسدالهی و همکاران (۱۳۹۸) به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی صدف دوکفه‌ای دسته‌چاقویی *Solen dactylus* و یعقوب‌زاده و همکاران (۱۳۹۸) در خصوص خواص ضد باکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان اشاره نمود. طاهری و همکاران (۱۳۹۱) به بررسی بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت ساردین پهلو طلایی با استفاده از آنزیم پاپایین و شرایط متفاوت هیدرولیز (زمان، دما و فعالیت آنزیم) پرداختند. آنها شرایط بهینه این آزمایش را در غلظت آنزیم ۲٪، زمان ۳۰ دقیقه و دمای ۴۵ درجه‌سانتی‌گراد به‌دست‌آوردند که در چنین شرایطی میزان حذف رادیکال آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل(DPPH) برابر با ۶۴/۵٪ بود. در مورد خرچنگ‌های گرد و مطالعه بر خواص آنتی‌اکسیدانی تا کنون تحقیقی در خلیج فارس مشاهده نشده است.

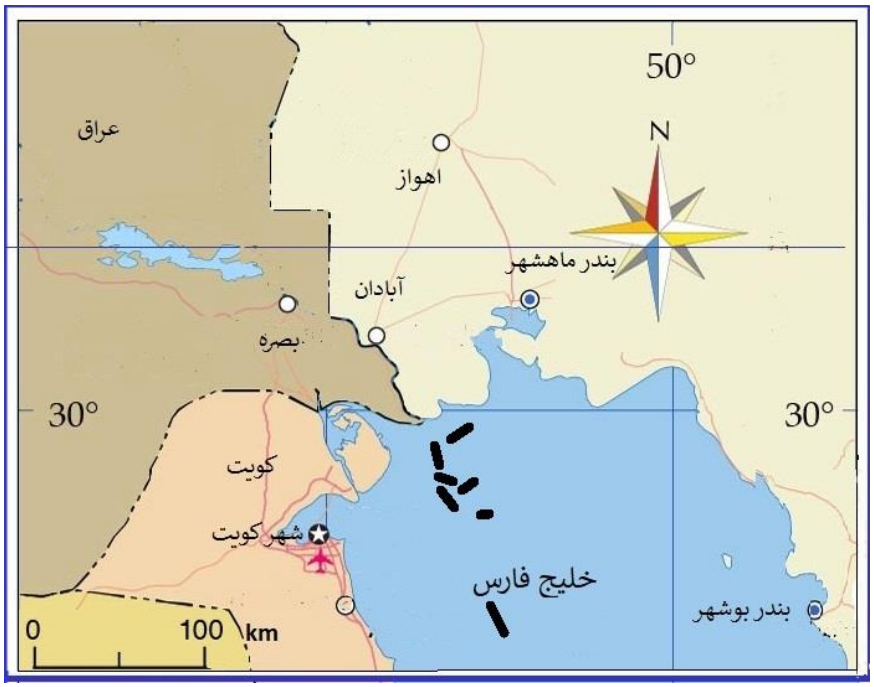
[1] Antioxidant
[2] Immunomodulating

احتمالاً بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پوسته خرچنگ برای اولین بار در این خلیج می‌باشد. لذا، هدف از این تحقیق بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از پوسته خرچنگ *P. segnis* در آبهای زیر جزر و مدی سواحل خلیج‌فارس در استان‌خوزستان می‌باشد. با توجه به مصرف ناچیز خرچنگ‌های صیدشده و هدر رفتن پوسته آنها در کشور، تحقیق حاضر می‌تواند جنبه کاربردی جدیدی را برای این بخش از صید و استفاده از ضایعات پوسته خرچنگ‌ها با استخراج آنتی‌اکسیدانی نشان دهد.

مواد و روش کار

موقعیت و روش نمونه‌برداری

این بررسی در حاشیه شمال غربی خلیج فارس در آبهای زیر جزرومدی استان خوزستان انجام‌گردید. نمونه‌های خرچنگ *P. segnis* در تابستان و زمستان ۱۳۹۵ با استفاده از یک فروند لنج صیادی و به‌وسیله تور ترال با چشمه تور ۴۰ میلی‌متر از اعماق ۳۰-۲۰ متر جمع‌آوری شدند. موقعیت محل‌های نمونه‌برداری با دستگاه GPS دریایی Garmin ثبت گردید که در شکل ۱ و جدول ۱ ارائه شده است.



شکل ۱: موقعیت مکان های نمونه‌برداری در آب‌های زیر جزر و مدی استان خوزستان، خلیج فارس

Figure 1: Location of sampling sites in sub-tidal waters of Khuzestan Province, Persian Gulf

آماده‌سازی نمونه‌ها

پوسته‌های خرچنگ *P. segnis* پس از جداسازی، خردشدن و آبگیری اولیه، به مدت ۲۴ ساعت در دستگاه فریز درایر (freeze-dried) خشک شدند. سپس پوسته‌ها به‌وسیله آسیاب به پودر تبدیل شدند (Koracevic *et al.*, 2001). در مراحل بعدی کلیه آزمایش‌ها با سه تکرار بر پودر استخراج شده از پوست دور ریز خرچنگ انجام‌گردید.

آنزیم‌های مورد استفاده در آزمایش‌ها شامل α- Chymotrypsin, Papain, Neutrase, Pepsin, Trypsin و Alcalase بودند که همگی از محصولات شرکت سیگما تهیه شد. همچنین[1] DPPH نیز از شرکت مذکور تهیه گردید.

[1] 1,1-Diphenyle-2-Pycryl-Hydrazyl

جدول ۱: موقعیت جغرافیایی ایستگاه‌های صید و نمونه‌برداری در شمال‌غربی خلیج‌فارس
Table 1: Geographical coordinates of fishing and sampling sites in the northwest of Persian Gulf

فصل	توراندازی	تورکشی	عمق (متر)
	۲۹ ۳۶ ۵/۲۸N ۴۸ ۵۸ ۹/۸۲E	۲۹ ۳۵ ۰/۶۴N ۴۹ ۰۰ ۵/۹۳E	۲۵
زمستان	۲۹ ۴۲ ۵/۵۷N ۴۸ ۵۲ ۳/۲۸E	۲۹ ۳۷ ۰/۷۵N ۴۸ ۵۶ ۲/۳۲E	۲۷
	۲۹ ۴۸ ۷/۵۸N ۴۹ ۳۱ ۱/۹۸E	۲۹ ۴۴ ۱/۸۶N ۴۹ ۳۹ ۰/۵۶E	۲۰
	۲۹ ۴۴ ۸/۷۶N ۴۸ ۵۲ ۷/۸۰E	۲۹ ۴۲ ۲/۱۰N ۴۸ ۵۴ ۴/۱۹E	۲۳
تابستان	۲۹ ۴۵ ۳/۴۸N ۴۹ ۳۳ ۱/۸۲E	۲۹ ۳۶ ۱/۰۹N ۴۹ ۴۰ ۶/۳۹E	۲۰
	۲۹ ۴۳ ۴/۷۷N ۴۹ ۴۶ ۹/۲۱E	۲۹ ۳۹ ۶/۱۵N ۴۹ ۵۰ ۳/۴۷E	۲۵
	۲۹ ۴۷ ۹/۸۴N ۴۸ ۵۰ ۳/۸۴E	۲۹ ۴۴ ۴/۱۹N ۴۸ ۵۲ ۹/۵۰E	۳۰

آماده‌سازی هیدرولیز آنزیمی خرچنگ

هیدرولیز پروتئین‌های پوسته خرچنگ با استفاده از آنزیم‌های a-chymotrypsin، trypsin، Pepsin، Papain، Neutrase و Alcalase انجام شد. ۶ گرم از پودر پوسته خشک شده خرچنگ در ۲۰ میلی‌لیتر از بافر مخلوط شد و قبل از اضافه‌نمودن آنزیم، مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه در دمای مناسب برای هر آنزیم انکوبه شد. سپس ۰/۱ گرم از آنزیم به سوبسترا اضافه شد. این مخلوط با استفاده از دستگاه Heater stirrer (RH B_2) به مدت ۸ ساعت با حرکت مداوم و در دمای مناسب انکوبه شد. پس از اتمام مدت تعیین‌شده، مخلوط در حمام آب ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد تا آنزیم‌ها غیرفعال شوند Byun *et al*., (2009). سپس محلول به مدت ۲۰ دقیقه در ۱۰۵۰۰ g و در دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد سانتریفوژ (RR-12) شد و مایع رویی آن با دستگاه Freeze-dryer خشک‌گردید و تا زمان استفاده در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Koracevic *et al*., 2001) (جدول ۲).

جدول ۲: شرایط مناسب فعالیت برای آنزیم های استفاده شده دراین تحقیق (Byun *et al*., 2009)
Table 2: Suitable activity conditions for enzymes used in this study (Byun *et al*., 2009)

آنزیم	بافر	pH	دما
Alcalase	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4	۷/۰	۵۰
a-Chymotrypsin	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4	۸/۰	۳۷
Papain	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4	۶/۰	۳۷
Pepsin	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4–HCl	۲/۰	۳۷
Neutrase	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4	۸/۰	۵۰
Trypsin	0.1 M Na_2HPO_4–NaH_2PO_4	۸/۰	۳۷

سنجش میزان فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از پوسته خرچنگ *P. segnis*

الف- فعالیت آنتی اکسیدان

غیرفعال کردن رادیکال آزاد (DPPH): جهت اندازه‌گیری فعالیت آنتی اکسیدانی، ۱۰۰۰ میکرولیتر از هر نمونه (غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در اتانول ۵۰ درصد) با ۲۵۰ میکرولیتر ازDPPH (۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵ درصد) و ۷۵۰ میکرولیتر اتانول ۹۶ درصد مخلوط‌گردید. مخلوط تکان داده و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی نگه داشته شد. سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر UV-Vis (UV 331) و در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای تهیه نمونه کنترل از اتانول ۵۰ درصد استفاده‌گردید. جذب کمتر نمونه نسبت به کنترل نشان‌دهنده فعالیت بیشتر پپتیدها برای حذف DPPH بوده است. در این آزمایش از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT[1] (با غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Bougatef *et al.*, 2009).

درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH مطابق معادله ذیل محاسبه‌گردید (Akinmoladun *et al.*, 2007):

$$\text{درصد فعالیت حذف رادیکال DPPH} = \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

ب- آزمون قدرت کاهندگی یا FRAP

۱ میلی‌لیتر از نمونه (غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در آب) با ۲/۵ میلی‌لیتر از ۲۰۰ میلی مول بافر سدیم فسفات (pH: 6.6) و ۲/۵ میلی لیتر از ۱٪ پتاسیم‌فری‌سیانید مخلوط‌گردید. محلول در ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه انکوبه شد. سپس ۲/۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (۱۰در صد) به محلول اضافه و در ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس ۲/۵ میلی لیتر از مایع رویی با ۲/۵ میلی لیتر از آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر از محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد وزنی- حجمی مخلوط گردید. بعد از ۱۰ دقیقه جذب نمونه در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. افزایش جذب محلول نشان دهنده افزایش قدرت کاهندگی می‌باشد. در این آزمایش از BHT (غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده‌گردید (Oyaizu, 1986).

ج- سنجش میزان فعالیت مهار ACE پروتئین‌های هیدرولیز شده

۲۰ میکرولیتر از ACE (۲۵ mU/ml حل شده در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl) با ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه (غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر در ۵۰ میلی مولار بافر Tris-HCl) مخلوط گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه انکوبه شد، سپس ۱ میلی لیتر از ۰/۵ میلی مولار FAPGG[2] به مخلوط اضافه شد و پس از ۳۰ دقیقه انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، جذب نمونه در طول موج ۳۴۵ نانومتر اندازه‌گیری‌شد. برای تهیه کنترل، از بافر Tris-HCl به جای نمونه استفاده‌گردید. در این آزمایش از Captopril (غلظت ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) به عنوان کنترل مثبت استفاده شد (Hou *et al.*, 2003). درصد فعالیت مهار ACE با استفاده از معادله ذیل محاسبه‌گردید.

$$\text{درصد فعالیت مهار ACE} = \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}} \times 100$$

نتایج

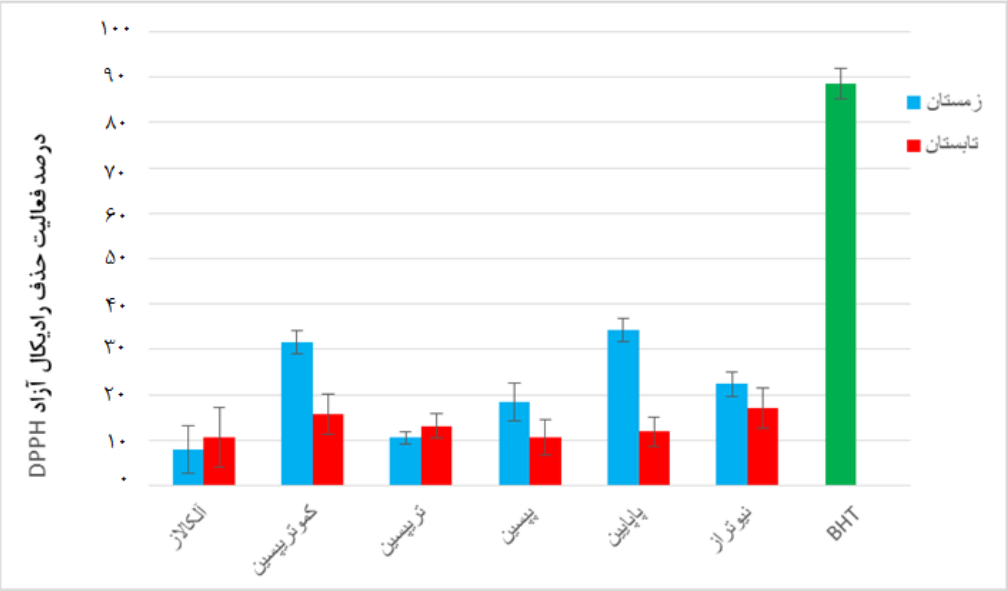
در مجموع، از گونه خرچنگ *P. segnis* در دو فصل تابستان و زمستان به تعداد ۳۲۱ و ۱۵ نمونه صید گردید که خاصیت آنتی اکسیدانی پوسته خرچنگ بر اساس هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های آن مورد سنجش قرارگرفت.

فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH

تمامی پپتیدهای به‌دست‌آمده از هیدرولیز آنزیم‌های مختلف پوسته خرچنگ، خاصیت حذف رادیکال DPPH را در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در مقادیر مختلف نشان‌دادند (شکل۲).

1. Butylated Hydroxytoluene

2. N-[3-(2-furyl) acryloyl]-Phe-Gly-Gly



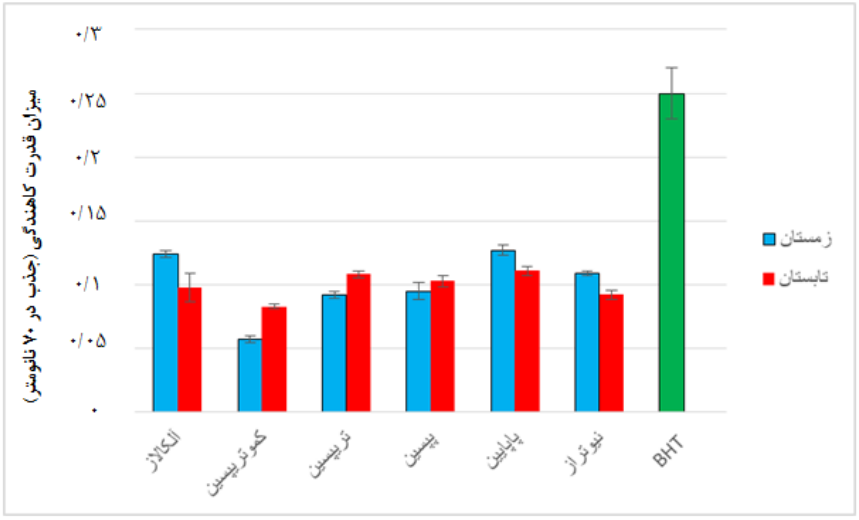
شکل ۲: فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط هیدرولیزهای پوسته خرچنگ در فصول تابستان و زمستان(درصد فعالیت ± انحراف معیار)

Figure 2: Free radical scavenging activity of DPPH by crab shell hydrolysis in summer and winter (activity percentage ± SD)

از نظر آماری بین هیدرولیزهای به‌دست آمده از نمونه‌های زمستان و تابستان به استثناء پاپایین و کموتریپسین اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد($p>0.05$). در کل، میزان درصد فعالیت حذف DPPH برای هیدرولیزهای آنزیم‌های آلکالاز، کموتریپسین، تریپسین، پپسین، پاپایین و نیوتراز به‌ترتیب ۹/۲۰±۶/۰۸، ۱۳/۶۵±۲۳/۶۷، ۲/۴۵±۱۱/۸۳، ۶/۸۳± ۱۴/۴۷، ۲۳/۱۳±۰۲/۸۵ و ۱۹/۷۳±۸/۹۶ محاسبه گردید که بر اساس نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌داری بین برخی از آنها مشاهده شد ($p<0.05$). میزان حذف رادیکال آزاد برای کموتریپسین و پاپایین به طور معنی‌داری بیش از آلکالاز مشاهده شد. ولی بین سایر آنزیم‌ها با آلکالاز و این دو آنزیم تفاوت معنی‌داری مشاهده نگردید. در این آزمایش از BHT (آنتی‌اکسیدان مصنوعی) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. میزان فعالیت حذف رادیکال DPPH این ترکیب در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۵/۸۸±۸۸/۵۷٪ اندازه‌گیری شد که به طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت هیدرولیزهای پوسته خرچنگ بود.

قدرت کاهندگی

میزان قدرت کاهندگی پپتیدها در فصول تابستان و زمستان در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مورد سنجش قرار گرفت، اما اختلاف معنی‌داری بین فصول مختلف مشاهده نگردید($p>0.05$). در کل میزان قدرت کاهندگی هیدرولیزهای آنزیم‌های آلکالاز، کموتریپسین، تریپسین، پپسین، پاپایین و نیوتراز به‌ترتیب ۰/۰۱۱±۰/۱۱۷، ۰/۰۱۲±۰/۰۷۲، ۰/۰۰۵±۰/۱۰۱، ۰/۰۰۶±۰/۱۰۴، ۰/۰۰۶±۰/۱۲۲ و ۰/۰۰۶±۰/۱۰۱ به‌دست آمد که براساس نتایج آنالیز واریانس یک‌طرفه اختلاف معنی‌دار بین آنزیم‌ها مشاهده شد ($p<0.05$). بیشترین میزان قدرت‌کاهندگی پپتیدها، مربوط به آنزیم‌های پاپایین و آلکالاز بود. همچنین میزان قدرت کاهندگی BHT در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با هیدرولیزهای مختلف اختلاف معنی‌دار نشان‌داد (میزان جذب ۰/۰۲±۰/۲۵) (شکل ۳).

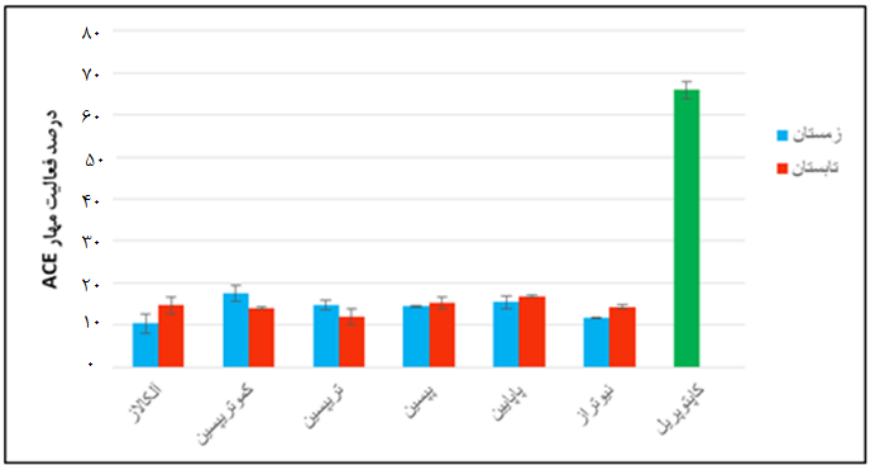


شکل ۳: میزان قدرت کاهندگی هیدرولیزهای پوسته خرچنگ در تابستان و زمستان (قدرت کاهندگی±انحراف معیار).

Figure 3: Reducing power of crab shell hydrolysis in summer and winter (reducing power± SD)

خاصیت مهار ACE

نتایج بررسی‌ها با آنالیز واریانس یک‌طرفه بین هیدرولیزهای به‌دست‌آمده از پوسته خرچنگ‌ها در فصول زمستان و تابستان از نظر درصد مهار ACE اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>0.05$) (شکل۴). میزان فعالیت مهارکنندگی برای پپتیدهای آنزیم‌های آلکالاز، پاپایین، کموتریپسین، تریپسین، پپسین و نیوتراز به‌ترتیب ۱۲/۵۱±۱/۷۷، ۱۶/۲۰±۰/۷۵، ۱۵/۸۲±۱/۲۴، ۱۳/۳۱±۱/۲۰، ۱۴/۸۶±۰/۶۶ و ۱۳/۰۵±۰/۷۷ محاسبه گردید که بر اساس نتایج آنالیز واریانس یک طرفه اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نگردید ($p>0.05$). با این‌حال، به‌نظر می‌رسد هیدرولیزهای آنزیم‌های پاپایین و کموتریپسین دارای بیشترین میزان فعالیت بودند. در این تحقیق از Captopril (ترکیب مصنوعی مهارکننده ACE) به عنوان کنترل مثبت استفاده‌گردید که میزان فعالیت آن در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر به طور معنی‌داری بیشتر از هیدرولیز پوسته خرچنگ می‌باشد (۶۵/۹±۲/۰۸ ٪) (شکل ۴).



شکل ۴: میزان فعالیت مهار ACE هیدرولیزهای پوسته خرچنگ در فصول تابستان و زمستان (درصد فعالیت±انحراف معیار)

Figure 4: ACE inhibition activity of crab shell hydrolysis in summer and winter (activity percentage± SD)

بحث

هیدرولیزهای پوسته دورریز خرچنگ *Portunus segnis* ، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نسبتاً مناسبی نشان داد که بیانگر پتانسیل استفاده از پوسته خرچنگ برای مصارف متعددی همانند برای تهیه مکمل‌های غذایی و مصارف دارویی و ... می‌باشد. نتایج حاصل از مطالعه Jiang و همکاران (۲۰۱۷) نشان‌داد که بخش‌های پپتیدی پوسته خرچنگ *Portunus trituberculatus* منبع خوبی از آنتی‌اکسیدان‌ها و پپتیدهای طبیعی با ویژگی‌های منحصربه‌فرد می‌باشد. در مطالعه حاضر از آنزیم‌های آلکالاز، نیوتراز، پاپایین، تریپسین، پپسین و کموتریپسین برای هیدرولیز پروتئین‌های پوسته خرچنگ *P. segnis* استفاده گردید و خواص آنتی‌اکسیدانی، قدرت کاهندگی پپتیدها و ضد ACE پپتیدها مورد بررسی قرار گرفت. تمامی پپتیدهای به‌دست‌آمده از هیدرولیز آنزیم‌های مختلف، خاصیت حذف رادیکال DPPH را در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند (شکل ۲). در کل، پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های کموتریپسین (۳۱٪) و پاپایین (۳۵٪) بیشترین فعالیت حذف رادیکال DPPH را نشان دادند که در فصل تابستان و زمستان نیز اختلاف معنی‌داری مشاهده شد. در مورد وجود اختلاف معنی‌دار این دو آنزیم در فصول مذکور باید به این نکته اشاره نمود که تمامی سخت‌پوستان از جمله خرچنگ *P. segnis* دارای اسکلت سخت بیرونی هستند که برای رشد، نیاز به پوست‌اندازی‌های مکرر در فصول مختلف داشته و در تشکیل اسکلت بیرونی مجدد، نیاز به جذب مواد معدنی دارند تا اسکلت بیرونی سخت شود. در فرآیند سخت‌شدن پوسته خرچنگ، پس از پوست‌اندازی دفع H^+ و جذب Ca^+ گزارش شده است که این تغییرات می‌تواند در عملکرد خاصیت انتی‌اکسیدانی پوسته خرچنگ اثر بگذارد (Cameron and Wood, 1985). همان‌گونه‌که در شکل ۲ نشان داده شده است، مقدار حذف رادیکال DPPH با BHT (آنتی‌اکسیدان مصنوعی) به عنوان کنترل مثبت با مقدار ۸۸/۵۷٪، بیشتر از سایر آنزیم‌ها بوده و خاصیت حذف DPPH را به طور معنی‌داری بیشتر از فعالیت هیدرولیزهای پوسته خرچنگ *P. segnis* نشان داده است. در توجیه آن می‌توان به این نکته اشاره نمود که پوسته خرچنگ *P. segnis* حاوی مقادیر زیادی از کیتین می‌باشد و تمامی آنزیم‌های هیدرولیزکننده پوسته خرچنگ در حذف رادیکال آزاد DPPH مشارکت نمی‌کنند. پوسته خرچنگ علاوه بر کیتین، دارای کاروتنوئیدها نیز می‌باشد (Harnedy and FitzGerald, 2012). به‌نظر می‌رسد در پوسته خرچنگ احتمالاً پپتیدهای الکترون‌دهنده وجود دارند که باعث می‌شود آنزیم‌های هیدرولیزکننده بتوانند با رادیکال‌های آزاد DPPH واکنش‌دهند. Wu و همکاران (۲۰۰۳) نیز در برخی از آبزیان همانند *Scomber austriasicus* وجود پپتیدهای الکترون‌دهنده را گزارش‌نموده‌اند که با ایجاد آنزیم‌های هیدرولیزکننده باعث می‌شوند این پپتیدها به محصولات پایدارتر تبدیل شوند و واکنش زنجیره‌ای رادیکال را به پایان برسانند. تفاوت مشاهده شده در میزان فعالیت حذف رادیکال آزاد این هیدرولیزها را می‌توان به متفاوت بودن اندازه و ترکیب پپتیدهای تولیدی در طول واکنش نسبت داد که با نوع آنزیم مورد استفاده کنترل می‌شود، زیرا هر آنزیم الگوی برش باند پپتیدی خاصی را دنبال می‌کند. همچنین نتایج برخی تحقیقات نشان داده‌اند که که فعالیت و خواص هیدرولیز پروتئین به ویژگی‌های سوبسترای پروتئینی و آنزیمی که برای پروتئولیز و هیدرولیز استفاده می‌شود، بستگی دارد. علاوه‌براین، می‌توان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها را از طریق تغییر در شرایط هیدرولیز افزایش‌داد (Dong *et al*., 2008, Li *et al*., 2008).

در تحقیق Sowmya و همکاران (۲۰۱۴) بر پوسته و ضایعات میگو، به این نتیجه دست یافتندکه برای به‌دست آوردن پروتئین جدا شده با افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، دمای بالاتر از ۵۰ درجه سانتی‌گراد، با غلظت آنزیم بالاتر از ۰/۵ درصد برای مدت کوتاه ایده‌آل‌تر است. نتایج به‌دست آمده در شکل ۳ نشان‌دهنده آن است که از نظر میزان قدرت‌کاهندگی آنزیم‌های هیدرولیزکننده ناشی از پوسته این خرچنگ، اختلاف معنی‌داری بین فصول تابستان و زمستان وجود ندارد. اما بر اساس نتایج آنالیز واریانس یک طرفه مابین آنزیم‌های مختلف، تفاوت

معنی‌دار بین آنها مشاهده شد ($p<0.05$) . بیشترین میزان قدرت کاهندگی پپتیدها، از آنزیم‌های پاپایین و آلکالاز بود. میزان قدرت کاهندگی BHT در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی لیتر به طور معنی‌داری با هیدرولیزهای مختلف اختلاف معنی‌دار نشان‌داد (میزان جذب ۰/۰۲±۰/۲۵) (شکل ۳). ترکیبات با قدرت کاهندگی بالاتر دارای توانایی بهتری برای دادن الکترون یا هیدروژن می‌باشند. بنابراین، به عنوان شاخصی قابل توجه برای استفاده به عنوان آنتی‌اکسیدان در نظر گرفته‌می‌شوند (Chalamaiah *et al.*, 2012). نتایج شکل ۳ نشان داد که قدرت کاهندگی پپتیدها به طور مشخصی به نوع آنزیم مورد استفاده بستگی دارد. Najafian و Babji (۲۰۱۴) در مورد ماهی *Pangasius sutchi* گزارش نمودند که هیدرولیزهای آنزیم پاپایین میزان قدرت کاهندگی بیشتری نشان می‌دهد که تا حدی با نتایج این تحقیق همخوانی دارد. همچنین Chalamaiah و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های تخم ماهی *Cyprinus carpio* از آنزیم‌های آلکالاز، پپسین و تریپسین استفاده نمودند و به این نتیجه رسیدند که هیدرولیزهای آنزیم آلکالاز بیشترین قدرت کاهندگی (تقریباً ۱/۳) را در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان دادند. در مطالعه‌ای دیگر فعالیت آنتی‌اکسیدانی خوبی برای پوسته خرچنگ *Portunus trituberculatus* در مقایسه با اسید اسکوربیک گزارش شده است (Jiang *et al.*, 2017). میزان قدرت کاهندگی پپتیدهای به‌دست آمده از خرچنگ *P. segnis* در مطالعه حاضر در مقایسه با نتایج سایر محققین، در حد متوسط قراردارد. میزان فعالیت مهاری ACE هیدرولیز به‌دست آمده از آنزیم‌های مختلف ناشی از خرچنگ *P. segnis* (شکل ۴)، نشان داد که ما بین فصول تابستان و زمستان اختلاف معنی‌داری وجود ندارد. همچنین این نتایج نشان داد که میزان فعالیت مهارکنندگی برای پپتیدهای آنزیم‌های آلکالاز، پاپایین، کموتریپسین، تریپسین، پپسین و نیوتراز بر اساس نتایج آنالیز واریانس یک طرفه، اختلاف معنی‌داری وجود نداشت($p>0.05$)، هر چند که بیشترین فعالیت مربوط به آنزیم پاپایین (۱۶/۷۵) و کموتریپسین (۱۵/۸۲) نسبت به سایر آنزیم‌ها بیشتر بود. به طور کلی، تمامی آنزیم‌ها قدرت کاهندگی متوسطی نشان دادند. در برخی تحقیقات دیگر نیز نتایج مشابه تحقیق حاضر را گزارش داده‌اند همانند تحقیق Yoon و همکاران (۲۰۱۳) که برای بررسی میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و مهار ACE پروتئین‌های پوسته خرچنگ *Chionoecetes japonicas* از آنزیم آلکالاز استفاده کردند. این هیدرولیزات دارای IC_{50}: 0.19 mg/ml (غلظتی از مهار کننده برای نشان دادن ۵۰٪ از فعالیت مهارگنندگی) برای فعالیت حذف رادیکال آزاد ABTS، IC_{50}: 5.629 mg/ml برای قدرت کاهندگی و IC_{50}: 0.47 mg/ml برای فعالیت مهاری ACE گزارش شده است. پس از جداسازی هیدرولیزات با سیستم فراپالایش، فرکشن‌های کوچک‌تر از ۳ کیلودالتون دارای بیشترین خاصیت حذف رادیکال ABTS و فعالیت مهار ACE می‌باشند، ولی قدرت‌کاهندگی کمی نشان دادند. شایان ذکر است، خواص عملکردی هیدرولیز پروتئین به مواد پروتئینی، نوع آنزیم، شرایط مورد استفاده در طول هیدرولیز، درجه هیدرولیز و ماهیت پپتیدهای آزاد شده (وزن مولکولی و ترکیب اسیدآمینه) بستگی‌دارد (He *et al.*, 2013). در برخی تحقیقات نیز ذکر شده که پوسته سخت‌پوستان علاوه بر داشتن مقادیر بالای کیتین و کاروتنوئیدها، تقریباً از ۳۸٪ از مواد پروتئینی تشکیل شده است (Harnedy and FitzGerald, 2012). محتوای پروتئین پوسته خرچنگ *P. trituberculatus* (پا، چنگال و سفالوتوراکس) با استفاده از روش کجدال به مقدار ۲۱/۸٪ برای هیدرولیز آنزیمی و پروتئین خام گزارش شده است(Jiang *et al.*, 2017). همچنین Pathaka و همکاران (۲۰۲۱) محتوای پروتئین پوسته سخت خرچنگ شناگر *Portunus pelagicus* را به میزان ۱۳/۴۴٪ گزارش نمودند. Lage-Yusty و همکاران (۲۰۱۱) نیز در بررسی ترکیب شیمیایی پوسته خرچنگ *Chionoecetes opilio* گزارش نمودند که پوسته خرچنگ دارای میزان پروتئین بالا (۳۴/۲٪)، چربی (۱۷/۱٪)، مواد معدنی از جمله کلسیم، فسفات و منیزیم (۲۸/۵٪) و نیز میزان سطح ویتامین E و بتا کاروتن ۲۳/۳ و ۰/۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نمونه بود. همچنین Tao و همکاران (۲۰۱۰)

در بررسی هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های ضایعات خرچنگ‌آبی *Portunus trituberculatus* نشان‌دادندکه این ترکیبات حاوی ۳۶/۵۴٪ از اسیدآمینه‌های‌ضروری می‌باشند. خرچنگ *Chionoecetes opilio* دارای منابع ارزشمند و مغذی مانند پروتئین، لیپیدها و کیتین می‌باشد که در وزن خشک ۸۷/۴ درصد و محصولات جانبی حاوی ۴۲/۹٪ پروتئین، ۱۴/۸٪ لیپید، ۲۵/۷٪ موادمعدنی، ۱۶/۲٪ کیتین وزن خشک بیان‌شده بودند (Beaulieu *et al*., 2009).

به طور کلی، هیدرولیزات با ارزش تغذیه‌ای بالای ناشی از پوسته خرچنگ‌ها می‌توانند در تغذیه جانوران به‌خصوص در آبزی‌پروری و به عنوان منبع نیتروژنی مؤثر در محیط کشت میکروبی مورد استفاده قرار گیرند. بنابراین، استفاده از آنها در صنایع غذایی و بهداشتی می‌تواند حائز اهمیت باشد. نتیجه این تحقیق نشان‌داد که پروتئین‌های پوسته خرچنگ پس از هیدرولیز آنزیمی، دارای فعالیت آنتی اکسیدانی، قدرت کاهندگی و مهار ACE متوسطی می‌باشد. البته باید علاوه بر پروتئین پوسته میگو و خرچنگ و هیدرولیزهای آن به کیتوزان موجود در ضایعات این سخت‌پوستان نیز توجه نمود. کیتوزان مشتق شده از کیتین نیز به‌نوبه خود از ضایعات سخت‌پوستان دریایی به‌خصوص خرچنگ‌ها و میگوها قابل بازیابی است. در آینده با توجه به محدودیت منابع فرآورده‌های غذایی باید به بازیابی پروتئین و کیتوزان از ضایعات سخت‌پوستان دریایی نگرشی نو و ویژه با استفاده از فناوری‌های جدید داشت.

منابع

اسدالهی، م.، سخایی، ن.، دوست شناس، ب.، غانمی، ک. و ارچنگی، ب.، ۱۳۹۸. خاصیت آنتی اکسیدانی صدف دسته چاقویی*Solen dactylus* با روش های DPPH، قدرت کاهندگی و ظرفیت آنتی اکسیدانی تام. مجله بوم شناسی آبزیان. ۹(۱):۵۰-۵۷.

اعتمادی دیلمی، ا.، سواری، ا.، ولی نسب ت. و سخایی، ن.، ۱۳۹۰. بررسی ترکیب صید خرچنگ‌های گر (Brachyura) . در آب‌های دریای عمان (استان هرمزگان) با تاکید بر گونه‌های دارای اهمیت تجاری. زیست شناسی دریا. ۱۲(۳) :۱-۱۳.

بخشان، ع.، علیزاده دوغیکلایی، ا. و طاهری ع.، ۱۳۹۳. بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت بدست‌آمده از ضایعات، در فرآیند فیله‌کردن ماهی‌آزاد (*Salmo salar*). پاتوبیولوژی مقایسه‌ای. ۱۱(۱):۱۱۵۲-۱۱۴۳.

خفایی زاده، ک.، سخایی، ن.، دوست شناس، ب.، غانمی، ک. و ذوالقرنین، ح.، ۱۳۹۵. ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تخلیص شده از هیدورلیز روتیفر *Brachionus plicatilis*. مجله علمی شیلات ایران. ۲۵(۲): ۶۹-۷۸.
DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240

طاهری، ع.، عابدیان کناری، ع م.، معتمدزادگان، ع. و حبیبی رضایی، م.، ۱۳۹۱. بهینه‌سازی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت ساردین پهلو طلایی (*Sardinella gibossa*) با استفاده از روش سطح پاسخ. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران. ۸(۳): ۲۷۰-۲۶۲.
DOI:10.22067/ifstrj.v8i3.18466

عبادی، م.، دوست‌شناس، ب.، سخایی، ن. و غانمی، ک.، ۱۳۹۶. بررسی پراکنش و ریخت‌شناسی خرچنگ‌های Leucosiidae و Xanthidae در آبهای زیر جزر و مدی سواحل استان خوزستان (خلیج فارس). اقیانوس شناسی. ۸ (۳۰): ۱۹-۲۸. DOI: 10.29252/joc.8.30.19

یعقوب زاده، ز.، کابوسی، ح.، صفری، ر.، پیروی قادیکالیی، ف. و فتاحی، ا.، ۱۳۹۸. بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران. ۲۸(۲): ۱۱۷-۱۲۹. DOI: 10.22092/ISFJ.2019.119049

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.

Aluko, R.E., 2012. In Functional foods and nutraceuticals. Springer-Verlag New York. 155. DOI:10.1007/978-1-4614-3480-1.

Balti, R., Bougherra, F., Bougatef, A., Hayet, B.K., Dhulster, P., Guillochon, D. and Nasri, M., 2012. Chymotrypsin from the hepatopancreas of cuttlefish (*Sepia officinalis*) with high activity in the hydrolysis of long chain peptide substrates: Purification and biochemical characterization. *Food Chemistry*, 130(3): 475-484. DOI:10.1016/j.foodchem.2011.07.019.

Beaulieu, L., Thibodeau, J., Bryl, P. and Carbonneau, M.E., 2009. Characterization of enzymatic hydrolyzed snow crab (*Chionoecetes opilio*) by-product fractions: a source of high-valued biomolecules . *Bioresource Technology*, 100(3): 3332-3342. DOI:10.1016/j.biortech.2009.01.073.

Bougatef, A., Hajji, M. and Balti, R., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114(4), 1198-1205. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.10.075.

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: 842-846. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.04.003.

Cameron , J.N. and Wood, C.M., 1985. Apparent H^+ Excretion and CO_2 Dynamics Accompanying Carapace Mineralization in the Blue Crab (*Callinectes Sapidus*) Following Moulting. *Journal of Experimental Biology*, 114 (1): 181–196. DOI:10.1242/jeb.114.1.181.

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 15: 135(4): 3020-3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H., 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107: 4, 1485–1493. DOI:10.1016/j.foodchem.2007.10.011.

Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J., 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4(1): 6-24. DOI:10.1016/j.jff.2011.09.001

He, R., Girgih, A.T., Malomo, S.A., Ju, X. and Aluko, R.E., 2013. Antioxidant activities of enzymatic rapeseed proteinhydrolysates and the membrane ultrafiltration fractions. *Journal of*

Functional Foods, 5: 219–227. DOI: 10.1016/j.jff.2012.10.008.

Hou, W.C., Chen, H.J. and Lin, Y.H., 2003. Antioxidant peptides with angiotensin converting enzyme inhibitory activities and applications for angiotensin converting enzyme purification. *Journal of agricultural and Food Chemistry*, 51(6): 1706-1709. DOI: 10.1021/jf0260242.

Jiang, W., Hu, S., Li, S. and Liu, Y., 2017. Biochemical and antioxidant properties of peptidic fraction generated from crab (*Portunus trituberculatus*) shells by enzymatic hydrolysis. *The Food Science and Biotechnology*, 52(11): 2479-2488. DOI:10.1111/ijfs.13533.

Jianga, W., Liua, Y., Yangb, X. and Shiwei, H., 2018. Antioxidant and antibacterial activities of modified crab shell bioactive peptides by Maillard reaction. *International Journal of Food Properties*, 21(1): 2730–2743. DOI:10.1080/10942912.2018.1561463.

Koracevic, D., Koracevic, G., Djordjevic, V., Andrejevic, S. and Cosic, V., 2001. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. *Journal of Clinical Pathology*, 54: 356–361. DOI: 10.1136/jcp.54.5.356.

Korhonen, H. and Pihlanto, A., 2006. Bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*,16(9): 945-960. DOI:10.1016/j.idairyj.2005.10.012.

Lage-Yusty, M.A., Vilasoa-Martínez, M., Álvarez-Pérez, S. and López-Hernández, J., 2011. Chemical composition of snow crab shells (*Chionoecetes opilio*). *CyTA-Journal of Food*, 9(4): 265-270. DOI:10.1080/19476337.2011.596285.

Li, Y., Bo, J., Tao, Z., Mu, W. and Jian, L., 2008. Antioxidant and free radical-scavenging activities of chickpea protein hydrolysate (CPH). *Food Chemistry*, 106: 444–450. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.04.067.

Mendis, E., Rajapakse, N. and Kim, S.K., 2005. Antioxidant properties of a radical-scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(3): 581-587. DOI: 10.1021/jf048877v.

Naderloo, R., Ebrahimnejad, S., Dustali, A. and Mahdian, M., 2016. Five crabs of the families Xanthidae and Pilumnidae (Crustacea: Decapoda: Brachyura) from Abu-Musa Island, Iran; new records for the Persian Gulf. *Marine Biodiversity Records*, 9(1): 19. DOI:10.1186/s41200-016-0019.

Najafian, N. and Babji, A.S., 2014. Production of bioactive peptides using enzymatic hydrolysis and identification antioxidative peptides from patin (*Pangasius sutchi*) sarcoplasmic protein hydolysate. *Journal of Functional Foods*, 9: 280-289.

Oyaizu, M., 1986. Studies on Products of Browning Reaction Antioxidative activities of browning reaction products prepared from glucosamine. *The Japanese Journal of*

Nutrition and Dietetics, 44: 307-315. DOI:10.5264/eiyogakuzashi.44.307.

Pathaka, N., Shakilaa, R.J., Jeyasekaranb, G., Padmavathy, P., Neethiselvan, N. and Arisekar, U., 2021. Variation in the Nutritional Composition of Soft and Hard Blue Swimming Crabs (*Portunus pelagicus*) Having Good Export Potential. *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 30(6): 706-719. DOI:10.1080/10498850.2021.1936324.

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. B*ioresource Technology*, 99(9): 3365-3371. DOI:10.1016/j.biortech.2007.08.018.

Sowmya, R.T., Ravikumar, M., Vivek, R., Rathinaraj, K. and Sachindra, N.M., 2014. Optimization of enzymatic hydrolysis of shrimp waste for recovery of antioxidant activity rich protein isolate. *Journal of Food Science and Technology*, 51(11): 3199–3207. DOI: 10.1007/s13197-012-0815-8.

Tao, X.M., Wang, Z.N., Yu, S.H. and Zhang, J.F., 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of swimming crab waste for preparing protein hydrolysate. *Food Science*, 31(16): 139-144. DOI: 10.7506/spkx1002-6630-201016029.

Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y., 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Research International*, 36(9): 949-957. DOI:10.1016/S0963-9969(03)00104-2.

Yoon, N.Y., Shim, K.B., Lim, C.W. and Kim, S.B., 2013. Antioxidant and angiotensin I converting enzyme inhibitory activities of red snow crab *Chionoecetes japonicas* shell hydrolysate by enzymatic hydrolysis. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 16(4): 237-242. DOI: 10.5657/FAS.2013.0237.

Evaluation of antioxidant activity of hydrolyzed peptides from *Portunus segnis* shell Crab

Ebadi Z.[1]; Doustshenas B.[1*]; Sakhaei N.[1]; Ghanemi K.[2]

[*]doustshenas@kmsu.ac.ir

1- Department of Marine Biology, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

2-Department of Marine Chemistry, Faculty of Marine Science, Khorramshahr University of Marine Science and Technology, Khorramshahr, Iran

Abstract

True crabs are always part of the catch, especially trawling. Given the lack of direct consumption of crabs in the region, their shell waste can be used as a valuable source of protein to extract antioxidant compounds. In this study, samples of *Portunus segnis* crabs were collected by trawl nets with apertures of 40 mm from depths of 20 to 30 m from the west coast of Khuzestan province. The enzymes a-chymotrypsin, Trypsin, Pepsin, Papain, Neutrase and Alcalase were used to hydrolyze crab crust proteins. The antioxidant activity of the crab shell was investigated by removing the free radical activity of DPPH, reducing antioxidant power assay and measuring the ACE inhibitory activity of hydrolyzed proteins. The highest radical removal activity of diphenyl picrylhydrazyl (DPPH) was observed for proteins hydrolyzed with chymotrypsin and papain enzymes at 23.67±13.65 and 23.13 02.85, respectively. The lowest reduction power of hydrolyzing enzymes with chymotrypsin was 0.072 and the highest value for papain was 0.122. The level of inhibitory activity of crab shell hydrolyzates showed that the highest activity was related to Papain enzyme (16.20%) and the lowest was related to Alkalase enzyme (12.51%). According to the observations, it seems that crab shell proteins after enzymatic hydrolysis have moderate antioxidant activity, reducing power and inhibition of ACE, and probably after additional research of hydrolyzed proteins of crab exoskeleton as a suitable source of Antioxidant compounds can be used.

Keywords: Crab, DPPH, Antioxidant peptides, Enzyme hydrolysis, Pepsin

[*]Corresponding author