مجله علمی ـ پژوهشی زیست‌شناسی جانوری تجربی
سال نهم، شماره دوم، پیاپی سی و چهارم، پاییز ۱۳۹۹ (۳۵-۲۳)

مقاله پژوهشی:

ارزیابی خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون (*Saurida tumbil*)

سمیه بهرام[1*]، محمد خضری[2]، سید روح الله جوادیان[1]
۱. گروه شیلات، واحد قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائمشهر، ایران
۲. گروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی، دانشگاه کردستان، کردستان، سنندج

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۱۵ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۸/۱٤)

چکیده

امروزه با آشکار شدن سمیت و عوارض جانبی نگهدارنده‌های سنتزی مصرف‌کنندگان به‌دنبال ترکیبات طبیعی با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی هستند. در پژوهش حاضر عضله ماهی حسون به‌کمک آنزیم آلکالاز در دو غلظت ۲ و ٤ درصد و در زمان‌های ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزه توسط فعالیت حذف‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و هیدروکسیل، فعالیت شلاته‌کنندگی فروس و کاهندگی فریک بررسی شد. فعالیت ضدمکیروبی با روش انتشار دیسک و MIC تعیین شد. پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز فعالیت قابل‌ملاحظه‌ای در حذف رادیکال‌های DPPH (۳۷/۹۲درصد)، ABTS (۷۷/۳٤ درصد)، و هیدروکسیل (۲۱/۷۹درصد) و شلاته کنندگی یون فروس (۲٦/۹۵ درصد) و فعالیت ضعیفی در کاهندگی یون فریک (جذب نوری ۰/۱۳±۰/۰۰ در طول موج ۷۰۰) نشان دادند. در مطالعه حاضر بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH (IC50=۲/۸) و هیدروکسیل (IC50=۸/۵۹) توسط نمونه هیدرولیزشده با ٤ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد. بیشترین بازیافت پروتیئنی نیز توسط نمونه فوق مشاهده شد. نمونه‌های پروتیئن هیدرولیز ماهی حسون فاقد فعالیت ضدباکتریایی بر علیه ۵ سویه باکتری بودند. پروتیئن هیدرولیزشده ماهی حسون دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالقوه بوده و می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدان ارزان قیمت جهت استفاده در صنایع غذایی، غذاهای فراسودمند و خوراک دام توصیه شود.

واژه‌های کلیدی: آلکالاز، ویژگی زیست‌فعالی، ماهی حسون، پروتئین هیدرولیز شده.

Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of hydrolyzed protein of *Saurida tumbil*

Somayeh Bahram[1*], Mohammad Khezri[2], Seyed Rohollah Javadian[1]
1. Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran
2. Department of Fisheries, Natural Resources Faculty, University of Kurdistan, Sanandaj, Kurdistan, Iran

(Received: May 05, 019- Accepted: Nov. 04, 2020)

Abstract

Todays, with the clarifying of the toxicity and side effects of synthetic preservatives, consumers are looking for natural compounds with anti-oxidant and antimicrobial effects. In the present study, lizardfish (*Saurida tumbil*) muscle was hydrolyzed by Alcalase at two concentrations of 2 and 4% and two times of 90 and 180 min. Then the antioxidant activity of fish protein hydrolysates (FPH) was evaluated by measuring DPPH, ABTS and OH free radical scavenging activity, and reducing power and ferrous ion-chelating assays. Antimicrobial activity was determined by disc diffusion and mic test. Alcalase enzymes hydrolyzed proteins showed remarkable activity in removing DPPH (37.92%), ABTS (77.34%) and hydroxyl (21.79%), as well as ferrous ion (26.95%) and poor activity in ion ferric degradation (Optical absorption of 0.13 ± 0.00 at a wavelength of 700). In the present study, the most inhibitory activity of DPPH and OH radicals was observed by hydrolyzed samples with 4% enzyme for 180 minutes. The most protein recovery yield was observed by the above sample. FPH showed no antibacterial activity against the studied bacterial strains. FPH of lizard fish with potential antioxidant activity can be recommended as an inexpensive antioxidant for use in the food industry, functional foods and animal feed.

Keywords: Alcalase, Bioactive properties, Lizardfish, Protein hydrolysate

* نویسندهٔ مسئول: سمیه بهرام Email: bahramsomi@gmail.com

مقدمه

رادیکال‌های آزاد و گونه‌های دیگر اکسیژن فعال (ROS)[1] به‌طور معمول در طول فرآیند متابولیکی اکسیداتیو تشکیل می‌شوند. علاوه بر این، گونه‌های اکسیژن فعال علت غالب فروپاشی کیفی مواد غذایی هستند که منجر به ترشیدگی، سمیت و تخریب بیومولکول‌های مهم در متابولیسم فیزیولوژیک می‌شوند (Wikarata & kim, 2011). جهت جلوگیری از کاهش کیفیت غذا از آنتی‌اکسیدان‌ها استفاده می‌شود. آنتی‌اکسیدان‌ها جهت جلوگیری از آسیب‌های اکسیداتیو به‌واسطه رادیکال‌های آزاد تولیدشده توسط اکسیداسیون و نیز برای جلوگیری از بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان و دیابت شناخته شده‌اند (Pezeshk *et al*., 2017_a). با توجه به نگرانی‌هایی که در ارتباط با ایمنی و جنبه‌های وابسته به سلامتی آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی وجود دارد تحقیقات زیادی در زمینه شناخت منابع جدید، ایمن و طبیعی آنتی اکسیدان‌ها انجام شده است (Wikarata & kim, 2011). یکی از منابع جدید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، پروتئین هیدرولیزشده مواد غذایی مانند کازئین شیر، پروتئین سویا، پروتئین زرده تخم مرغ و پروتئین محصولات دریایی می‌باشد (Pezeshk *et al*., 2017_a). پروتئین‌های هیدرولیزشده ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که تحت عنوان پپتیدهای زیست‌فعال شناخته می‌شوند. این ترکیبات پس از ورود به بدن به آسانی جذب شده و نقش‌های بیولوژیکی مهمی را در سطوح سلولی ایفا می‌کنند (Mehregan Nikoo *et al*., 2013).

پروتئین‌های هیدرولیزشده ماهیان، دارای کاربردهای وسیعی هستند. این مواد به‌دلیل داشتن پپتیدهای زیست‌فعال، دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی هستند. شواهد علمی روزافزونی وجود دارد که بسیاری از پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیز مشتق‌شده از منابع دریایی به‌جهت داشتن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی قادرند سلامتی انسان را ارتقا داده و از بروز بیماری‌های مزمن جلوگیری کنند (Rabiei *et al*., 2016). مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین هیدرولیزشده حاصل از منابع دریایی دارای خواص ضدباکتریایی هستند و میزان فعالیت ضدمیکروبی این هیدرولیز شده‌ها به درجه هیدرولیز، غلظت آنزیم و مدت زمان هیدرولیزاسیون بستگی دارد (Sila *et al*., 2014; Ghelichi *et al*., 2018). همچنین قابلیت آنتی‌اکسیدانی این هیدرولیز شده‌ها به ویژگی‌هایی شامل توانایی آن‌ها در زدودن رادیکال‌های آزاد، عمل به‌عنوان شلاته‌کننده فلزات، خاموش کننده‌ی اکسیژن یا دهنده هیدروژن و امکان جلوگیری از نفوذ آغازکننده‌های اکسیداسیون چربی به‌وسیله تشکیل لایه‌ای در اطراف قطرات روغن نسبت داده می‌شود (Mehregan Nikoo *et al*., 2013; Nikoo *et al*., 2016).

ماهی حسون (*Saurida tumbil*) گونه‌ای از ماهیان آب شور و از خانواده Synodontidae است. این ماهی با نام کریشو (کیجار بزرگ) به عنوان یکی از گونه‌های صید دور ریز در آب‌های جنوب کشور محسوب می‌شود. در بررسی انجام‌شده توسط Eskandari *et al*. (2016) این گونه ۳۵/۹۱ درصد از آبزیان دور ریز شده در تور ترال در سواحل خوزستان را تشکیل داده است و به‌عنوان گونه تجاری ریز از آن نام برده شد. صید دورریز یکی از مهم‌ترین مشکلات صید و صیادی در سراسر جهان است. به منظور جلوگیری از اثرات محیط زیستی برگشت آن‌ها به اکوسیستم دریایی می‌توان از آن‌ها به‌صورت تازه یا با ارزش افزوده استفاده کرد (Eskandari *et al*., 2016). تبدیل این بخش از صید به مواد دیگری که دارای ارزش دارویی یا تغذیه‌ای باشند هر روزه علاقمندی بیشتری را به خود جلب می‌کند (Shabanpour *et al*., 2015). شاید بتوان اذعان

1. Reactive Oxygen Species

نمود که یکی از بهترین راه‌ها برای تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا به‌کارگیری آنزیم‌های تجاری برای تولید پروتئین هیدرولیزشده از این آبزیان می‌باشد. لذا با توجه به اهمیت غذایی، دارویی و خواص کاربردی پروتئین هیدرولیزشده آبزیان و نیز ضرورت استفاده بهینه از صید دور ریز و تبدیل آن به محصول با ارزش برای مصرف انسان هدف از پژوهش حاضر بررسی شرایط هیدرولیز بر خواص ضدمیکروبی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده عضله ماهی حسون (*Saurida tumbil*) بود.

مواد و روش ها

تهیه پروتئین هیدرولیز شده ماهی

ماهی‌های حسون (*Saurida tumbil*) با طول متوسط ۳۵ سانتی‌متر و وزن ۵۲±۴۵۶/۳ گرم در سال ۱۳۹۶ از بازار استان بوشهر خریداری و پس از انجماد در فریزر به آزمایشگاه پارک علم و فناوری مازندران (ساری) منتقل و تا زمان شروع آزمایش‌ها در آن‌جا نگهداری شد. در شروع آزمایش پس از انجمادزدایی در یخچال، سرزنی، تخلیه امعا و احشا و کندن پوست، استخوان‌گیری ماهی‌ها انجام شد و پس از شست‌و شو با آب سرد دو بار با چرخ گوشت چرخ گردید و تا زمان آزمایش در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. برای انجام آزمایش ۵۰ گرم گوشت ماهی در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شده و میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با هم‌زن دیجیتالی (IKA, T25، آلمان) به‌مدت ۲ دقیقه همگن شد. سپس به‌مدت ۲۰ دقیقه در بن ماری (رادطب نوین، SL910، ایران) با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. در ادامه ۱۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات پتاسیم اضافه شد. سپس آنزیم آلکالاز با نسبت‌های ۲ و ۴ درصد (بر حسب میزان پروتئین نمونه) اضافه شد و در ظروف در دستگاه انکوباتور متحرک (نور صنعت فردوس، SHE، ایران) در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد با دور ثابت ۱۵۰ دور در دقیقه به‌مدت ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه قرار داده شدند تا هیدرولیز صورت گیرد (انتخاب غلظت و زمان بر اساس مطالعات انجام‌گرفته پیشین از جمله مطالعه Wisuthipha *et al*. (2016) و مطالعه Ramakrishnan *et al*. (2013) انجام شد. تیمار دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۱۵ دقیقه برای غیر فعال سازی آنزیم استفاده شده، مورد استفاده قرار گرفت. پس از خنک شدن در دمای اتاق نمونه‌ها در دمای ۱۰ درجه به‌مدت ۳۰ دقیقه در دور ۷۰۰۰ سانتریفیوژ (Labnet, C6، آمریکا) شدند. مایع رویی جمع‌آوری و در دستگاه خشک‌کن انجمادی (گزلین طب ایران، GTFD-40، ایران) قرار داده شد تا به‌صورت پودر درآیند (Ovissipour *et al*., 2009).

آنالیز تقریبی گوشت ماهی حسون

به‌منظور تعیین درصد رطوبت، ۲ گرم از نمونه گوشت در دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت خشک شد. میزان رطوبت بر اساس تفاوت وزن اولیه و ثانویه نمونه محاسبه شد. با قرار دادن نمونه در داخل یک کوره با دمای ۵۵۰ تا ۶۰۰ درجه سانتی‌گراد محتوای خاکستر آن تعیین شد. محتوای نیتروژن و چربی کل به‌ترتیب توسط روش استخراج کلدال و سوکسله انجام شد. پروتئین خام از طریق ضریب ۶/۲۵ در محتوای نیتروژن محاسبه شد (AOAC, 1995).

تعیین میزان بازیافت پروتئینی

جهت تعیین بازیافت پروتئینی میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت حاصل از هیدرولیز آنزیمی با روش بیورت تعیین شد. و میزان بازیافت پروتیئنی از طریق رابطه زیر محاسبه شد (James, 1995).

$$\text{بازیافت پروتئینی} = \frac{\text{میزان کل پروتیئن محلول}}{\text{پروتئین کل}} \times ۱۰۰$$

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH

پروتئین هیدرولیزه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه شده و ۱ میلی‌لیتر از آن با ۱ میلی‌لیتر محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار (تهیه‌شده در اتانول ۹۵ درصد) ترکیب شده و پس از انکوباسیون در تاریکی جذب نوری آن در ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. در نمونه کنترل به جای پروتئین هیدرولیزه، آب مقطر استفاده شد. درصد مهار رادیکال‌های DPPH برحسب فرمول زیر محاسبه شد (Alemán *et al*., 2011_a).

= فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های DPPH (درصد)

$$\frac{\text{جذب نوری کنترل} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times ۱۰۰$$

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس

یک میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیزه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۰/۱ میلی‌لیتر $FeCl_2$ ۲ میلی‌مولار و ۰/۲ میلی‌لیتر فروزین ۵ میلی‌مولار ترکیب شده و حجم آن توسط آب مقطر به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. پس از ۲۰ دقیقه در دمای اتاق جذب نوری ۵۶۲ نانومتر اندازه‌گیری شد. درصد فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن بر حسب فرمول زیر محاسبه شد (Alemán *et al*., 2011_a).

= فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس (درصد)

$$\frac{\text{جذب نوری کنترل} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times ۱۰۰$$

فعالیت کاهندگی یون فریک

دو میلی‌لیتر از نمونه پروتئین هیدرولیزه در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲ میلی‌لیتر بافر فسفات ترکیب شده و سپس ۲ میلی‌لیتر پتاسیم فری‌سیانید ۱ درصد به آن اضافه شد. نمونه‌ها به‌مدت ۲۰ دقیقه در ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از انکوباسیون ۲ میلی‌لیتر TCA ۱۰ درصد اضافه شده و ۲ میلی‌لیتر از محلول حاصل با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر و ۴ میلی‌لیتر FeCl3 ۰/۱ درصد ترکیب و پس از ۱۰ دقیقه جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (Alemán *et al*., 2011_a).

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS

پیش از آزمایش، محلول ABTS فعال شده توسط متانول رقیق شد تا به جذب نوری ۱/۱ در طول موج ۷۳۴ برسد. ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه پروتئین هیدرولیزه در غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با ۲۸۵۰ میکرولیتر ABTS مخلوط شده و پس از ۲ ساعت در دمای اتاق جذب نوری آن اندازه‌گیری شد. درصد مهار رادیکال‌های ABTS بر حسب فرمول زیر محاسبه شد (Alemán *et al*., 2011_a).

= فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS (درصد)

$$\frac{\text{جذب نوری کنترل} - \text{جذب نوری نمونه}}{\text{جذب نوری کنترل}} \times ۱۰۰$$

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل

ابتدا ۰/۱ فنانترولین و نمونه پروتئین هیدرولیزه به لوله آزمایش اضافه و مخلوط شدند. سپس محلول $FeSO_4$ به میزان ۱میلی‌لیتر مخلوط اضافه و در نهایت با افزودن ۱ میلی‌لیتر H_2O_2 واکنش آغاز شد. پس از ۶۰ دقیقه جذب نوری در ۵۳۶ نانومتر اندازه‌گیری شد. مخلوط فاقد پروتئین هیدرولیز کنترل منفی و مخلوط فاقد H_2O_2 و حاوی پروتئین هیدرولیز به عنوان بلانک در نظر گرفته شد. فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل توسط فرمول زیر محاسبه شد (Alemán *et al*., 2011_a).

= فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل (درصد)

$$\frac{(\text{جذب نوری نمونه} - \text{جذب نوری کنترل منفی})}{(\text{جذب نوری بلانک} - \text{جذب نوری کنترل منفی})} \times ۱۰۰$$

آزمون میکروبی

در تحقیق حاضر برای بررسی اثرات ضدباکتریایی پروتئین‌های هیدرولیزه از روش انتشار دیسک و از باکتری‌های *Escherichia coli*، *Bacillus cereus*، *Staphylococcus aureus*

Listeria monocytogenes،*Streptococcus iniae* و *Pseudomonas aeruginosa* که از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران تهیه شدند، استفاده شد. بدین منظور سوسپانسیون فعال هرکدام از باکتری‌های مورد مطالعه روی محیط مولر هینتون آگار تلقیح شدند. غلظت‌های مختلف (تا ۶۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر که حداکثر غلظت قابل‌حل پروتئین هیدرولیز شده بود) از پروتئین‌های هیدرولیزشده تهیه شد و روی دیسک‌های کاغذی استریل با قطر ۶ میلی‌متر تلقیح شد. پس از خشک شدن، دیسک‌ها به فاصله حداقل ۲۵ میلی‌متر از یکدیگر و از لبه پلیت روی محیط آگار قرار داده شدند. بعد از این مرحله، پلیت‌ها در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به‌مدت۴۸-۲۴ ساعت قرار گرفتند. پس از این مدت قطر هاله تشکیل شده اطراف دیسک توسط کولیس اندازه‌گیری شد. آزمون‌های حساسیت ضدباکتریایی به روش انتشار دیسک با ۳ مرتبه تکرار انجام شد. به‌منظور کنترل نتایج آزمون حساسیت ضد باکتریایی از آنتی بیوتیک تتراسایکلین به عنوان کنترل مثبت و آب مقطر به‌عنوان کنترل منفی استفاده شد (Khezri *et al*., 2016).

تجزیه و تحلیل آماری

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال‌بودن داده‌ها و همگنی واریانس، از روش آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده-ها به‌صورت میانگین± انحراف معیار گزارش شد و کلیه آزمایش‌های میکروبی و آنتی‌اکسیدانی در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم‌افزار (spss version 18) برای آنالیز داده‌ها و Microsoft Excel 2007 برای رسم نمودارها استفاده گردید.

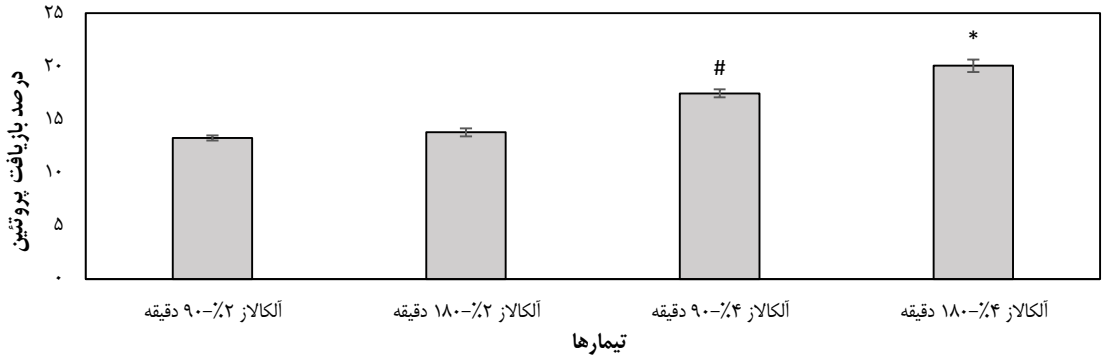
نتایج

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی عضله ماهی حسون در جدول ۱ نشان داده شده است.

جدول ۱. نتایج آنالیز تقریبی گوشت ماهی حسون بر حسب وزن تر گوشت (میانگین±انحراف معیار)

پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
۱۹/۷۱±۱/۶۸	۴/۴۱±۰/۰۹	۷۴/۸۰±۱/۹۹	۱/۲۹±۰/۰۱

همان‌طورکه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت آنزیم و نیز با افزایش زمان هیدرولیز میزان بازیافت پروتئین به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (P<۰/۰۵). بالاترین میزان بازیافت پروتئین (۲۰/۰۶ درصد) در تیمار ۴ درصد آنزیم آلکالاز و زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد (P<۰/۰۵).



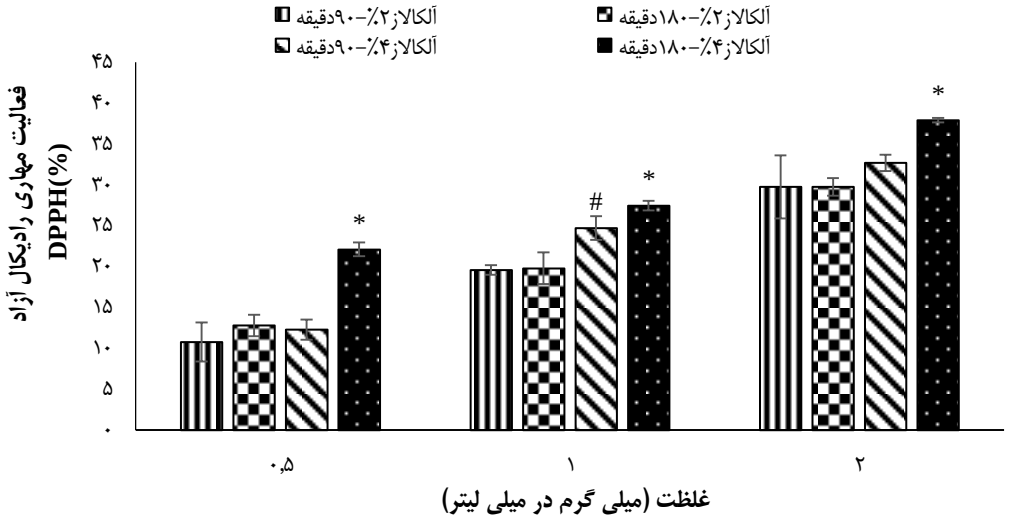
شکل ۱. میزان بازیافت پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪-۱۸۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۴٪ درصد -۹۰ دقیقه، آلکالاز ۲ درصد -۱۸۰ دقیقه و آلکالاز ۲ درصد -۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪ درصد -۹۰ دقیقه، آلکالاز ۲ درصد -۱۸۰ دقیقه و آلکالاز ۲ درصد -۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵

مطابق نتایج شکل ۲ با افزایش غلظت پروتئین، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. بالاترین فعالیت مهارکنندگی (۳۷/۹۲٪) در تیمار ۴٪ آنزیم و زمان ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد (P<۰/۰۵).

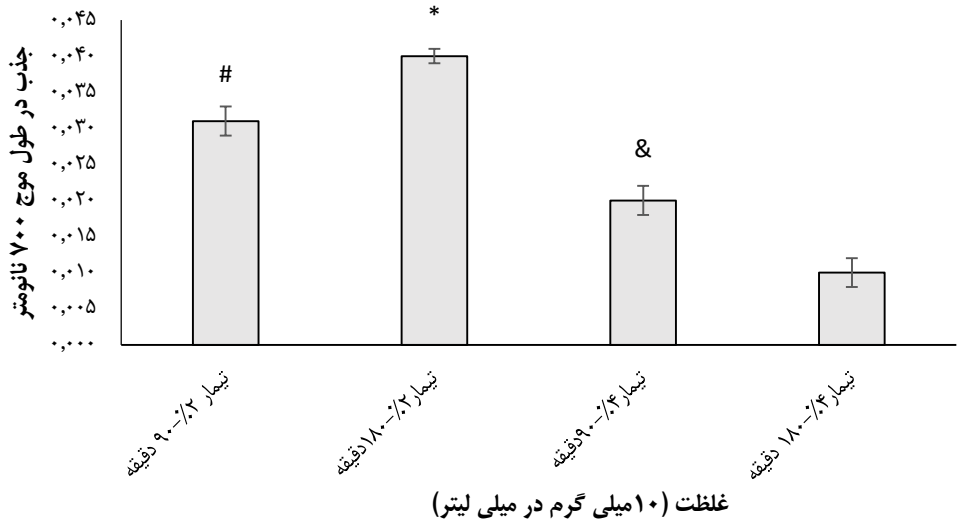
همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص است در تیمار ۲ درصد آنزیم آلکالاز با افزایش زمان هیدرولیز و با افزایش غلظت آنزیم قدرت کاهندگی یون فریک افزایش یافت (P<۰/۰۵).



شکل ۲. فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪-۱۸۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۴٪ درصد-۹۰ دقیقه، آلکالاز ۲ درصد-۱۸۰ دقیقه و آلکالاز ۲ درصد -۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪ درصد-۹۰ دقیقه با آلکالاز ۲ درصد-۱۸۰ دقیقه و آلکالاز ۲ درصد-۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.



شکل ۳. قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۲٪-۱۸۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۴٪ درصد -۱۸۰ دقیقه، آلکالاز ۲ درصد -۹۰ دقیقه و آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.

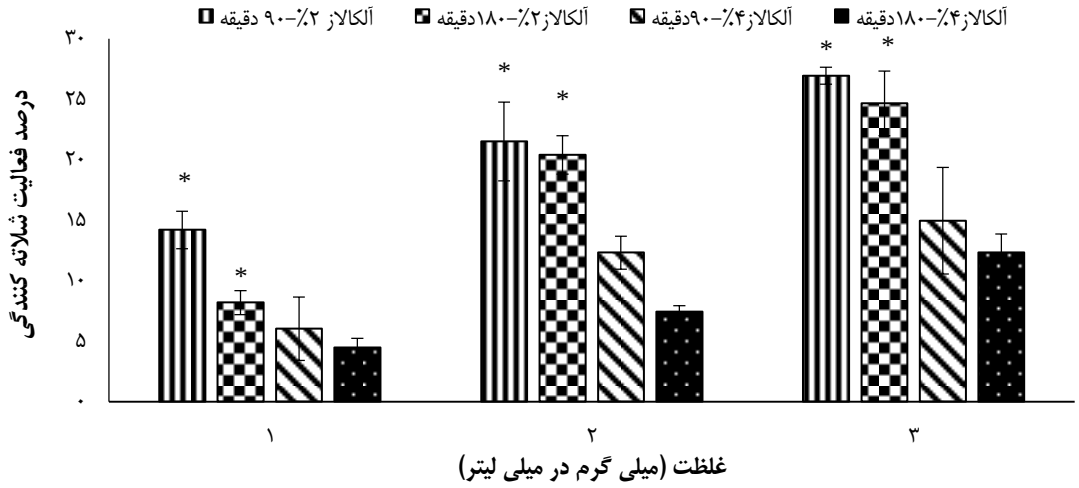
نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۲٪ درصد -۹۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۴ درصد -۹۰ دقیقه و آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.

& نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪ درصد -۹۰ دقیقه با نمونه آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه

فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس (Fe^{++})

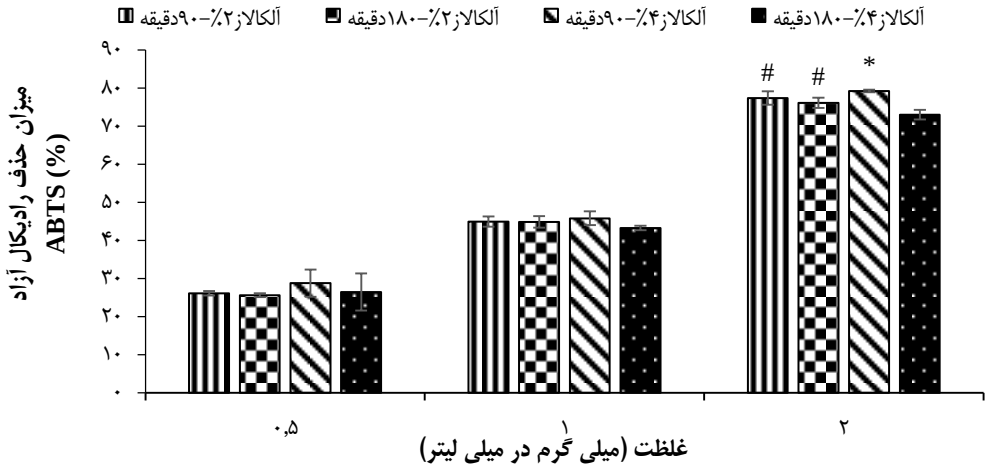
در شکل ۴ مشاهده می‌شود با افزایش غلظت پپتید توانایی شلاته‌کنندگی یون فروس افزایش یافت. بالاترین فعالیت شلاته‌کنندگی (۲۶/۹۵) در تیمار ۲٪ آنزیم و در زمان‌های ۹۰ و ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).

نتایج فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS نشان داد (شکل ۵) در غلظت‌های ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید با افزایش غلظت آنزیم و نیز با افزایش زمان هیدرولیز تغییری در قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS مشاهده نشده است ($P\geq۰/۰۵$). بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد در تیمارهای ۲ و ۴ درصد آنزیم آلکالاز با زمان ۹۰ دقیقه و در غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید مشاهده شد ($P<۰/۰۵$).



شکل ۴. فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس پروتئین هیدرولیز پشده ماهی حسون

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه‌های آلکالاز ۲٪-۹۰ دقیقه و آلکالاز ۲۵-۱۸۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۴٪ درصد -۹۰ دقیقه و آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه در سطح $P<۰/۰۵$.



شکل ۵. میزان مهار رادیکال آزاد ABTS پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون

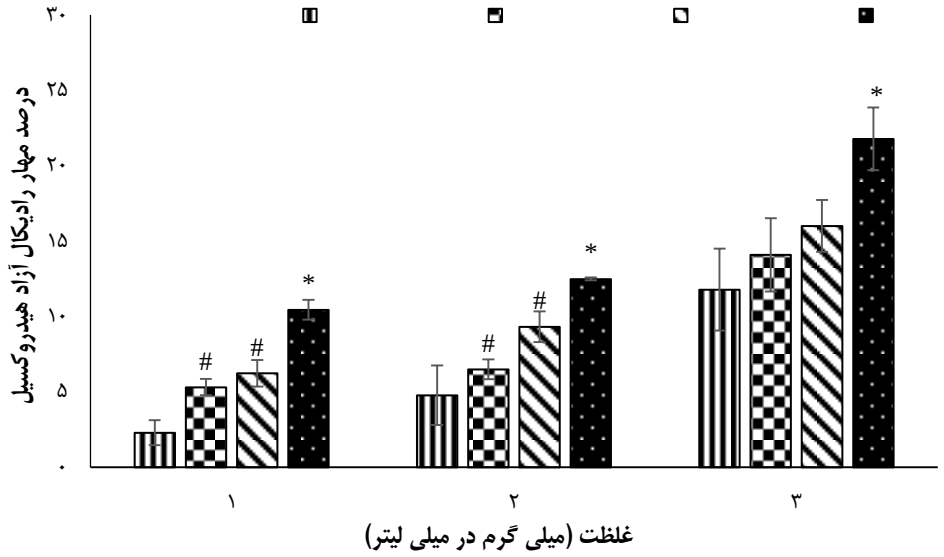
* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪-۹۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۲٪ درصد -۱۸۰ دقیقه، آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه در سطح $P<۰/۰۵$.

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۲٪ درصد -۹۰ دقیقه و نمونه‌های آلکالاز ۲ درصد -۱۸۰ دقیقه با نمونه آلکالاز ۴ درصد -۱۸۰ دقیقه در سطح $P<۰/۰۵$.

فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های هیدروکسیل

همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود در همه غلظت‌های پپتید با افزایش غلظت آنزیم و نیز با افزایش زمان هیدرولیز قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل افزایش یافت (P<۰/۰۵). بالاترین قدرت مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل (۲۱/۷۹درصد) نیز در تیمار ۴ درصد آنزیم با زمان ۱۸۰ دقیقه و در غلظت ۳ میلی‌گرم در میلی‌لیتر پپتید مشاهده شد (P<۰/۰۵).

همان‌طورکه در جدول ۲ مشخص است پروتئین هیدرولیز شده ماهی نتوانست در هیچ یک از غلظتهای مورد بررسی اثر مهارکنندگی و کشندگی علیه باکتری‌های مورد بررسی داشته باشد.



شکل ۶. میزان مهار رادیکال آزاد هیدروکسیل پروتئین هیدرولیز شده ماهی حسون

* نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه آلکالاز ۴٪–۱۸۰ دقیقه با نمونه‌های آلکالاز ۲٪ درصد –۹۰ دقیقه، آلکالاز ۲ درصد –۱۸۰ دقیقه و آلکالاز ۴٪ درصد ۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.

نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار نمونه‌های آلکالاز ۴٪ درصد –۹۰ دقیقه و آلکالاز ۲ درصد –۱۸۰ دقیقه با نمونه آلکالاز ۲ درصد –۹۰ دقیقه در سطح P<۰/۰۵.

جدول ۲. فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده در غلظت‌های مختلف علیه باکتری‌های مورد مطالعه

غلظت پپتید (میلی‌گرم/ میلی‌لیتر)	E coli	*Pseudomonas aeruginosa*	*S. aureus*	*Streptococcus iniae*	*B. cereus*	*L. monocytogenes*
۶۰۰	-	-	-	-	-	-
۳۰۰	-	-	-	-	-	-
۱۵۰	-	-	-	-	-	-
۷۵	-	-	-	-	-	-
۳۷/۵	-	-	-	-	-	-
۱۸/۷۵	-	-	-	-	-	-
۹/۳۷	-	-	-	-	-	-
۴/۶۸	-	-	-	-	-	-
۲/۳۴	-	-	-	-	-	-

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر بیشترین فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH و هیدروکسیل توسط نمونه هیدرولیزشده با ۴ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد، درحالی‌که این نمونه کمترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس، کمترین فعالیت کاهندگی یون فریک و کمترین حذف‌کنندگی رادیکال‌های ABTS را نشان داد که حاکی از ارتباط معکوس فعالیت مهارکنندگی DPPH و هیدروکسیل با فعالیت شلاته‌کنندگی و کاهندگی آهن و مهار ABTS است. هم‌راستا با نتایج حاضر در مطالعه صورت گرفته توسط Damgaard *et al.* (2014) بر روی پروتئین هیدرولیزشده ضایعات کشتارگاه مشاهده شد که نمونه پروتئین هیدرولیز با بیشترین فعالیت شلاته‌کنندگی آهن کمترین اثر مهاری را بر رادیکال‌های DPPH نشان می‌دهد. در مطالعه صورت گرفته بر روی ژلاتین هیدرولیز پوست اسکوئید نیز مشاهده شد که فعالیت شلاته‌کنندگی آهن با فعالیت مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS ارتباط مستقیمی دارد (Alemán *et al.*, 2011_b). در مطالعه صورت گرفته بر روی پروتئین هیدرولیزشده زئین نیز روند مشابهی برای فعالیت شلاته‌کنندگی یون مس و مهارکنندگی رادیکال‌های ABTS مشاهده شد (Zhu *et al.*, 2008). به‌نظر می‌رسد که فعالیت بیشتر نمونه هیدرولیز شده با ۴ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه در حذف رادیکال‌های DPPH و هیدروکسیل به دلیل کاهش اندازه پپتیدها با افزایش زمان هیدرولیز و غلظت آنزیم است.

Wu *et al.* (2003) با تحقیق روی ماهی ماکرل (*Scomber austriasicus*) و Batista *et al.* (2010) با پژوهش روی ماهی (*Aphanopus carbo*) گزارش نمودند که قدرت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH با افزایش مدت زمان واکنش افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. Mehregan Nikoo *et al.* (2013) با بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاراس (*Carassius carassius*)، افزایش میزان مهار رادیکال‌های آزاد DPPH را با افزایش زمان هیدرولیز تا ۱۵۰ دقیقه گزارش کردند. آن‌ها دلیل این امر را افزایش درجه هیدرولیز بیان کرد. در پژوهش Jeevitha *et al.* (2014) روی پروتئین هیدرولیزشده ماهی ساردین روغنی هندی (*Sardinella longiceps*) با افزایش غلظت آنزیم تریپسین از ۱ درصد به ۴ درصد میزان مهار رادیکال آزاد DPPH و هیدروکسیل افزایش یافت. همچنین Shabanpour *et al.* (2015) با بررسی هیدرولیز آنزیمی پروتئین ضایعات سرسینه میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و هیدروکسیل را با افزایش میزان آنزیم آلکالاز به سوبسترا گزارش کردند.

در بررسی حاضر نمونه هیدرولیزشده با ۴ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه کمترین فعالیت شلاته‌کنندگی یون فروس و کاهندگی یون فریک را نشان داد که احیانا آن نیز به‌دلیل کاهش اندازه پپتیدها است. همراستا با این نتایج Bamdad *et al.* (2011) در پژوهش خود گزارش کردند که پپتیدهای بزرگتر با وزن مولکولی بیشتر، فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بیشتری نشان می‌دهند که ناشی از به‌دام افتادن یون آهن داخل زنجیره پپتید می‌باشد. Theodore *et al.* (2008) نیز رابطه مثبتی بین اندازه پپتیدها و فعالیت کاهندگی یون فریک پروتیئن هیدرولیز گزارش کردند، به‌عبارتی پروتئین هیدرولیز با درجه هیدرولیز کمتر و پپتیدهای بزرگتر فعالیت کاهندگی بیشتری داشت. این در حالی است که در مطالعه Alemán *et al.* (2011_a) فعالیت کاهندگی با کاهش اندازه پپتیدها افزایش داشت. در مطالعه صورت گرفته توسط Alemán *et al.* (2011_b) مشاهده شد که ژلاتین هیدرولیز اسکوئید با درجه هیدرولیز بالاتر و وزن مولکولی کمتر از فعالیت شلاته‌کنندگی آهن بهتری برخوردار است، به‌طوری‌که نمونه با بیشترین فعالیت شلانه‌کنندگی آهن دارای پپتیدهایی با وزن مولکولی

۱۴۰۰-۵۰۰ دالتون است. تناقض‌های موجود در مطالعات مختلف پیشنهاد می‌کند که وزن مولکولی عامل اصلی در تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های پروتئین هیدرولیز و پپتید نیست و ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای بیواکتیو تحت تأثیر عوامل دیگری نظیر نوع اسیدهای آمینه، توالی اسیدهای آمینه و قرارگیری در موقعیت‌های C و N انتهایی زنجیره یا نزدیک به این موقعیت‌ها قرار می‌گیرد (Giri & Ohshima, 2012). عواملی چون تیمار ماده اولیه، نوع آنزیم، درجه حرارت، مدت واکنش و تراکم پروتئین بر ساختار پپتید و عملکرد پپتید تأثیر می‌گذارند (FitzGerald & Harnedy, 2012). با این وجود جهت اظهار نظر قطعی در این رابطه نیاز است در مطالعات آتی با تعیین دامنه وزن مولکولی پپتیدها با استفاده از روش‌های hplc ارتباط فعالیت آنتی اکسیدانی با وزن مولکولی پپتدها و تأثیر زمان و غلظت آنزیم بر هریک تعیین گردد.

در مطالعه حاضر با افزایش زمان هیدرولیز میزان بازیافت پروتئینی افزایش معنی‌داری داشته است بالاترین میزان بازیافت پروتئینی در نمونه هیدرولیز شده با ۴ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه مشاهده شد. بررسی‌های مختلف نشان داد میزان بازیافت پروتئین تحت تأثیر غلظت آنزیم، دما و زمان هیدرولیز قرار دارد (Ghelichi *et al*., 2018; Yasemi *et al*., 2013). Jeevitha *et al*. (2014)، با تحقیق روی ماهی ساردین *Sardinella longiceps* و Ghelichi *et al*. (2018) با پژوهش روی تخم ماهی کپور نشان دادند با افزایش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز بازیافت پروتئین افزایش می‌یابد که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت دارد. به‌نظر می‌رسد افزایش غلظت آنزیم و زمان هیدرولیز با افزایش سرعت واکنش و میزان فعالیت آنزیم باعث افزایش میزان بازیافت پروتئین می‌شود. هرچند بازیافت پروتئینی در مطالعه حاضر چندان مطلوب نیست و پیشنهاد می‌شود مطالعات بیشتری با استفاده از غلظت‌های بالاتر آنزیم، دماهای مختلف و زمان‌های هیدرولیزمتفاوت صورت گیرد.

در پژوهش حاضر پروتئین هیدرولیزشده ماهی حسون نتوانست اثر مهارکنندگی و کشندگی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی مورد مطالعه داشته باشد. برخی پژوهش‌ها نشان دادند پپتیدهای جداشده از آبزیان دارای خواص ضدمیکروبی هستند (Liu *et al*., 2008; Pezeshk *et al*., 2017_b) که با نتایج پژوهش حاضر مغایرت دارد. گزارش‌های کمی در خصوص عدم فعالیت ضدمیکروبی پروتئین هیدرولیزشده وجود دارد. در پژوهش Ghelichi *et al*. (2018) میزان فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی با افزایش زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۱۲۰ دقیقه افزایش یافت با این وجود پروتئین هیدرولیزشده نتوانست برخی از باکتری‌های گرم مثبت مانند *لیستریا مونوسیتوژنز*، *انتروکوکوس فکالیس* و برخی از باکتری‌های گرم منفی مانند *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیا پنومونیه* و *سالمونلا انتریکا* را مهار کند. Zhang *et al*. (2015) با پژوهش روی اویستر (*Crassostrea gigas*) گزارش نمودند فعالیت ضدمیکروبی پروتئین هیدرولیزشده اویستر به میزان درجه هیدرولیز بستگی دارد، به‌طوری‌که در درجه هیدرولیزهای ۳۰/۱۲ درصد، ۳۲/۶۹ درصد و ۳۸/۴۷ درصد و غلظت‌های ۴، ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر پپتید هیچ‌گونه فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های *اشیریشیاکلی*، *باسیلوس سرئوس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *سودوموناس آئروژینوزا* و چند گونه از جنس ویبریو مشاهده نشد اما با افزایش درجه هیدرولیز به ۳۹/۸۹ درصد و در غلظت‌های بالای پپتید اثر ضدباکتریایی مشاهده شد. Kumar, (2013) نیز در پژوهشی روی ۱۵ گونه ماهی نشان داد پروتئین هیدرولیزشده عضله ماهی‌ها دارای فعالیت ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نیست.

در نتیجه‌گیری می‌توان گفت که پروتئین هیدرولیزشده به‌وسیله آنزیم آلکالاز دارای خواص ضداکسیداسیونی قابل‌توجهی بود. در بین آزمون‌های مورد بررسی تیمارهای هیدرولیزشده پاسخ بهتری به دفع رادیکال آزاد ABTS، DPPH و قدرت مهار یون آهن در مقایسه با قدرت احیاکنندگی نشان دادند. نمونه‌های هیدرولیزشده با ۴ درصد آنزیم به‌مدت ۱۸۰ دقیقه بیشترین بازیافت پروتئینی و فعالیت مهار رادیکال‌های DPPH و هیدروکسیل را داشتند. همچنین نتایج نشان داد که تولید پروتئین هیدرولیزشده ماهی تحت تأثیر شرایط واکنش یعنی زمان، غلظت پروتئین و غلظت آنزیم است. به‌طوری‌که با افزایش زمان و غلظت پپتید خواص ضداکسیداسیونی پروتئین هیدرولیزشده افزایش یافت، اما افزایش غلظت آنزیم تأثیر چندانی نداشت. همچنین نتایج نشان داد پروتئین هیدرولیزشده عضله ماهی حسون خواص ضدمیکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت و منفی نداشت. از محدودیت‌های پژوهش حاضر عدم اندازه‌گیری درجه هیدرولیز بود، لذا پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی پروتئین‌های هیدرولیزشده با درجه هیدرولیز مختلف تهیه شده و ارتباط فعالیت آنتی‌اکسیداسیونی و ضدباکتریایی پروتئین‌های هیدرولیزشده و پپتیدها با میزان درجه هیدرولیز آن‌ها سنجیده شود.

سپاسگزاری

از معاونت پژوهشی دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائمشهر جهت تأمین منابع مالی قدردانی می‌گردد.

REFERENCES

Alemán, A.; Giménez, B.; Pérez-Santin, E.; Gómez-Guillén, M.; Montero, P.; (2011a.). Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. Journal of Food Chemistry; 125: 334-341.

Alemán, A.; Pérez-Santín, E.; Bordenave-Juchereau, S.; Arnaudin, I.; Gómez-Guillén, M.; Montero, P.; (2011_b). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Research International; 44(4):1044-51.

Bamdad, F.; Wu, J.; Chen, L.; (2011). Effects of enzymatic hydrolysis on molecular structure and antioxidant activity of barley hordein. Journal of Cereal Science; 54(1):20-8.

Batista, I.; Ramos, C.; Coutinho, J.; Bandarra, NM.; Nunes ML.; (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Journal of Process Biochemistry; 45: 18-24.

Chemists, AoOA.; Chemists, AoOA.; (1920). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists: Association of Official Analytical Chemists.

Damgaard, TD.; Otte, JA.; Meinert, L.; Jensen, K.; Lametsch, R.; (2014). Antioxidant capacity of hydrolyzed porcine tissues. Journal of Food science and nutrition; 2(3):282-8.

Eskandari, G.; Koochaknejad, E.; Mayahi. Y.; Ansari, A.; (2016). Rate, ratio and amount of annual discards in commercial trawl net in northwestern part of the Persian Gulf (Khuzestan Coastal Waters). Journal of Marine Science and Technology; 15(1): 84-99. (In Persian)

Giri, A.; Ohshima, T.; (2012). Bioactive marine peptides: Nutraceutical value and novel approaches. Advances in Food and Nutrition Research; 65: 73-105.

Harnedy, PA.; FitzGerald, RJ.; (2012). Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. Journal of Functional Foods; 4(1):6-24.

James,CS.; (1995). Analytical Chemistry of Foods. Blackie Academic and Professional.

Jeevitha, K.; Mohana Priya, K.; Samanta, SK.; (2014). Antioxidant activity of Fish Protein Hydrolysates from *Sardinellalongiceps.* International Journal of Drug Development and Research; 6 (4): 137-145.

Ghelichi, S.; Shabanpour, B.; Pourashouri, P.; (2018). Proximate and amino acid composition, antioxidant properties ACE inhibitory effect and antibacterial power of protein hydrolysate of common carp roe by alcalase. Journal of Fisheries science and Technology; 7 (2);145-155. (In Persian)

Khezri Ahmadabad, M.; Rezaei, M.; Zolfaghari, M.; (2016). Studying the possibility of using the extract of Entromorpha intestinalis in order to control some food-borne pathogens. Food Science and Technology; 58(13):81-91. (In Persian)

Kumar, LV.; (2013). Antimicrobial activity of biopeptides extracted from fish protein hydrolaysate. Thesis submitted in part fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Fisheries Science in Fish Processing Technology to the Tamilnadu Veterinary and Animal Science University, Chennai. 79 pp.

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

Mehregan Nikoo, A.; Ghorbani, M.; Taheri, A.; Kamali, F.; (2014). Effect of hydrolysing condition on antioxidant activity of protein hydrolysate from Crucian carp (*Carassius carassius*). Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology; 2(4):351-364. (In Persian)

Nikoo, M.; Rabiei, S.; Rezaei, M.; Khezri, M.; (2016). Antioxidant peptides from marine sources: Identification, purification and mechanism of their action. Aquatic Physiology and Biotechnology; 4(3): 99-122. (In Persian)

Ovissipour, M.; Taghiof, M.; Motamedzadegan, A.; Rasco, B.; EsmaeiliMolla, A.; (2009). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. Journal of International Aquatic Research;1: 31-38.

Pezeshk, S.; Ojagh, SM.; Rezaei, M.; Shabanpour, B.; (2017_a). Optimization of protein hydrolysates with antioxidant activity of viscera yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) with the protomex enzyme. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology; 12 (3): 99-108. (In Persian)

Pezeshk, S.; Ojagh, SM.; Rezaei, M.; Shabanpour, B.; (2017_b). Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. Journal of Genetic Resources; 3(2):103-112. (In Persian)

Rabiei, S.; Nikoo, M.; Rezaei, M.; Rafieian-Kopaei, M.; (2016). A review on therapeutic effects of marine bioactive peptides in animal models and human. Iranian Journal of Physiology and Pharmacology; 2 (2): 67-79. (In Persian)

Ramakrishnan, AA.; Ghaly, AE.; Brooks, MS.; Budge, SM.; (2013). Extraction of Proteins from Mackerel Fish Processing Waste Using Alcalase Enzyme. Journal of Bioprocessing & Biotechniques; 3 (2):1-9.

Shabanpour, B.; Kordjazi, M.; Nazari, KH.; (2015). Optimization of enzymatic hydrolysis of green tiger shrimp (Penaeus semisulcatus) head wastes protein with Response Surface methodology; 4(3);29-50. (In Persian)

Sila, A.; Nedjar-Arroume, N.; Hedhili, K.; Chataigné, G.; Balti, R.; Nasri, M.; (2014). Antibacterial peptides from

barbelmuscle protein hydrolysates: Activity against somepathogenic bacteria. Food Science and Technology; 55(1): 183-8.

Theodore, A.; Raghavan, S.; Kristinsson, H.; (2008). Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 56(1):7459–66.

Wikarata, J.; Kim, SM.; (2011). Antioxidant and Anticancer Activities of Enzymatic Hydrolysates of Solitary Tunicate (*Styela clava*). Journal of Food Science and Biotechnol; 20(4): 1075-1085.

Wisuthiphaet, N.; Klinchan, S.; Kongruang, S.; (2016). Fish Protein Hydrolysate Production by Acid and Enzymatic Hydrolysis. KMUTNB Int J Appl Sci Techno; 9 (4): 261-270.

Wu, HC.; Chen, HM.; Shiau, CY.; (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomberaustriasicus*). Journal of Food Research International; 36: 949–957.

Yasemi, M.; Ghomi Marzdashti, MR.; Darnahal, T.; Mohammadzadeh, B.; Amini, H.; (2013). Yelid of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) by using enzymes. 2013. Iranian Scientific Fisheries Journal; 22(1):149-156. (In Persian)

Zhang, L.; Liu, Y.; Tian, X.; Tian, Z.; (2015). Antimicrobial capacity and antioxidant activity of enzaymatic hydrolysates of protein from rushan bay oyster (*Crassostrea gigas*). Food Processing and Preservation;39:404-412.

Zhu, L.; Chen, J.; Tang, X.; Xiong, YL., (2008). Reducing, radical scavenging, and chelation properties of in vitro digests of alcalase-treated zein hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 56(8):2714-21.