Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(2):145-155

Proximate and Amino Acid Composition, Antioxidant Properties, ACE Inhibitory Effect, and Antibacterial Power of Protein Hydrolysates of Common Carp Roe by Alcalase

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Ghelichi S.[1] *PhD*,
Shabanpour B.* *PhD*,
Pourashouri P.[1] *PhD*

How to cite this article
Ghelichi S, Shabanpour B, Pourashouri P. Proximate and Amino Acid Composition, Antioxidant Properties, ACE Inhibitory Effect, and Antibacterial Power of Protein Hydrolysates of Common Carp Roe by Alcalase. Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(2):145-155.

*Seafood Science & Technology Department, Fisheries & Environmental Science Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran
[1]Seafood Science & Technology Department, Fisheries & Environmental Science Faculty, Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Gorgan, Iran

Correspondence
Address: Gorgan University of Agricultural Sciences & Natural Resources, Basij Square, Gorgan, Iran. Postal Code: 4918943464
Phone: +98 (17) 32427040
Fax: +98 (17) 32424155
bshabanpour@yahoo.com

Article History
Received: May 3, 2017
Accepted: November 29, 2017
ePublished: June 21, 2018

ABSTRACT

Aims Fish egg has a high nutritional value and is known as an offshore product in the fish processing industry in Asia. Thus, the present study aimed at evaluating proximate and amino acid composition, antioxidant properties, ACE inhibitory effect, and antibacterial power of protein hydrolysates from lyophilized common carp roe by Alcalase.

Materials & Methods In the present experimental study, the lyophilized roe was subjected to hydrolysis by Alcalase for 30, 60, 90, and 120 minutes at pH 8 and 55°C. Fat, as well as moisture, ash and protein were measured by AOAC and amino acid composition by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. DPPH scavenging activity, metal ion chelating, ACE inhibitory effect and anti-bacterial power of the samples were analyzed. The data were analyzed by SPSS 21, using ANOVA and LSD tests. Antioxidant property of hydrolysates increased with their concentrations.

Findings By increasing the hydrolysis time, protein content, protein recovery percentage, and ash content increased, but the amount of fat and moisture decreased. The most abundant amino acids in common carp roe and its protein hydrolysates were valine, lysine, arginine, and leucine. The antioxidant properties of the samples increased with increasing concentration. DPPH scavenging activity of hydrolysates at 20mg/ml was significantly higher than that of BHT solution ($p<0.05$). All the hydrolysates exhibited antioxidant, ACE inhibitory and antibacterial effects.

Conclusion Due to the high content of protein, bioactive peptides, and essential and unnecessary amino acids, Common carp roe protein hydrolysates has a high antioxidant property, ACE inhibitory and antibacterial properties.

Keywords Protein Hydrolysate; Common Carp Roe; Antioxidant Properties; ACE inhibitory Effect; Anti-Bacterial Power

CITATION LINKS

[1] Purification and characterization ... [2] Chemical composition and ... [3] Fish viscera protein hydrolysates ... [4] Hydrolysates from Atlantic cod ... [5] Enzymatic hydrolysis of cuttlefish ... [6] Fish protein hydrolysate production ... [7] Extraction of proteins from ... [8] Utilization of tilapia processing ... [9] Protein hydrolysate from visceral ... [10] New proteases extracted ... [11] In vitro evidence for gut hormone ... [12] Effect of eel head protein ... [13] Fermentative recovery of ... [14] Isolation and characterization ... [15] Isolation and characterization of ... [16] Antioxidant activity of protein ... [17] Antioxidant and cryoprotective ... [18] Bioactive and functional ... [19] Functional properties of ... [20] Roe protein hydrolysates ... [21] Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional ... [22] Physical and oxidative stability ... [23] Antioxidant and functional properties ... [24] Measurement of antioxidant ... [25] Preparation and antioxidative ... [26] Antioxidant activity and ... [27] Functional properties and ... [28] Antioxidative and functional ... [29] Physico-chemical, functional ... [30] Functional, antioxidant and ... [31] Antibacterial peptides from ... [32] Targeted separation of ... [33] Detection of antibacterial ... [34] A rapid method of ... [35] Official Methods of Analysis ... [36] Quality of fish protein ... [37] Antioxidative properties of xanthan ... [38] Action of phenolic derivatives ... [39] Spectrophotometric assay and ... [40] Screening methods for antibacterial ... [41] The effect of enzymatic hydrolysis ... [42] Fish protein hydrolysates... [43] Optimization of enzymatic ... [44] Enzymatic hydrolysis of by-products ... [45] Optimization of enzymatic hydrolysis ... [46] Enzymatic hydrolysis of ... [47] Functional and antioxidant ... [48] Arginine deficiency in preterm ... [49] Amino acid composition ... [50] Antioxidative activity and functional ... [51] Antioxidant activity ... [52] Autolysis-assisted production ... [53] Antioxidative activity of protein ... [54] Antioxidant activity of proteins ... [55] Improvement of functional ... [56] ACE inhibitory peptides ... [57] Influence of degree of hydrolysis ... [58] The influence of the extent of

Copyright© 2018, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

ترکیب تقریبی و آمینواسیدی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین و قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز

سخی قلیچی PhD
گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
بهاره شعبان‌پور* PhD
گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران
پرستو پورعاشوری PhD
گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی، گرگان، ایران

چکیده
اهداف: تخم ماهی ارزش غذایی بالایی داشته و در قاره آسیا، به‌عنوان یک محصول جانبی در صنعت فرآوری ماهیان شناخته شده است. هدف پژوهش، بررسی ترکیب تقریبی و آمینواسیدی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز بود.
مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر روی تخم ماهی کپور معمولی، پس از لیوفلیزه‌کردن تخم ماهی، عمل هیدرولیز با استفاده از آلکالاز در چهار زمان ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه در pH=۸ و دمای ۵۵ºC انجام شد. میزان چربی، رطوبت، خاکستر و پروتئین براساس روش‌های AOAC و ترکیب آمینواسیدی با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا- طیف‌سنجی جرمی سنجیده شدند. قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH، چلاته‌کردن یون فلزی، مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و قدرت ضدباکتریایی نمونه‌ها بررسی و داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 21 از طریق آزمون تحلیل واریانس و آزمون LSD تحلیل شدند.
یافته‌ها: با افزایش زمان هیدرولیز، مقدار پروتئین، درصد بازیابی پروتئین و میزان خاکستر افزایش یافت، ولی میزان چربی و رطوبت کاهش یافت. فراوان‌ترین آمینواسیدها والین، لایزین، آرژنین و لوسین بودند. قدرت ضداکسیدانی نمونه‌ها با افزایش غلظت افزایش یافت. قدرت حذف رادیکال DPPH در غلظت ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، در همه نمونه‌ها به طور معنی‌داری بالاتر از محلول BHT بود ($p<0/05$). همه نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده قدرت ضداکسیدانی، مهارکنندگی ACE و ضدباکتریایی داشتند.
نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی به‌دلیل دارابودن درصد بالایی از پروتئین، پپتیدهای زیست‌فعال و آمینواسیدهای ضروری و غیرضروری، خواص آنتی‌اکسیدانی، مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و ضدباکتریایی بالایی دارد.
کلیدواژه‌ها: پروتئین هیدرولیزشده، تخم ماهی کپور معمولی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی ACE، قدرت ضدباکتریایی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۲/۱۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۹/۰۸
*نویسنده مسئول: bshabanpour@yahoo.com

مقدمه
پسماندهای حاصل از آبزی‌پروری، صید و فرآوری ماهیان، موادی با میزان پروتئین بالا و ارزش تغذیه‌ای مناسب بوده است که غالباً حاوی آمینواسیدهای ضروری مورد نیاز بدن نیز هستند. همچنین پروتئین‌های حاصل از ماهیان را می‌توان به‌عنوان غذاهای کارکردی در نظر گرفت، زیرا منبع ارزشمندی از پپتیدهای زیست‌فعال هستند که در توالی‌های آمینواسیدی جای گرفته‌اند و این پپتیدها را می‌توان از طریق هیدرولیز آنزیمی آزاد کرد[1]. تخم ماهی ارزش غذایی بالایی داشته و در بخش‌هایی از جهان، تخم برخی از گونه‌ها از جمله ماهیان خاویاری به‌عنوان یک غذای محبوب مورد استفاده قرار می‌گیرد. در قاره آسیا، تخم ماهی به‌عنوان یک محصول جانبی در صنعت فرآوری ماهیان شناخته شده است. ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) بیشترین سهم پرورش ماهی در جهان را به خود اختصاص داده است[2]. تولید کپور پرورشی حدود ۱۴% (تقریباً ۳/۲میلیون تُن) از میزان کل تولید آبزی‌پروری در آب‌های شیرین را به خود اختصاص می‌دهد[2]. با درنظرگیری این میزان پرورش، استفاده بهینه از باقیمانده‌های مواد خام حاصل از مصرف مستقیم و فرآوری ماهیان می‌تواند به‌عنوان یکی از مهم‌ترین حوزه‌های شیلاتی مطرح شود[3]. یکی از رایج‌ترین شیوه‌های استفاده از باقیمانده‌های ماده خام صنعت فرآوری آبزیان، هیدرولیزکردن آنها به‌منظور بازیابی منابع پروتئینی و همچنین حصول ترکیباتی با خواص کارکردی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی و همچنین اثرات مثبت روی سلامتی است. پروتئین هیدرولیزشده از باقیمانده‌های ماهیان از قبیل امعا و احشا[3, 4-11]، سر[12-15] یا ماهیان کم‌مصرف و بدون مصرف خوراکی[16-18] حاصل شده است. به‌علاوه، پروتئین هیدرولیزشده از تخم ماهی *کاتلا* (*Catla catla*) [19]، ماهی هامور (*Epinephelus lanceolatus*) [20] و ماهی روهو (*Labeo rohita*) [21] نیز به دست آمده است.
اکسیداسیون چربی‌ها از طریق تولید رادیکال‌های آزاد و تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون، نگرانی‌های زیادی را ایجاد کرده است[22]. از سوی دیگر، مصرف غذاهای اکسیدشده می‌تواند منجر به بروز مشکلات خطرناکی از قبیل بیماری‌های قلبی- عروقی، دیابت، اختلالات عصبی و حتی آلزایمر شود[23]. در نتیجه، توجه زیادی به شناسایی ترکیبات آنتی‌اکسیدان برای غلبه بر مشکلات مربوط به پراکسیداسیون چربی‌ها شده است. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل‌هیدروکسی‌آنیزول (BHA)، بوتیل‌هیدروکسی‌تولوئن (BHT)، پروپیل‌گالات (PG) و تری‌بوتیل‌هیدروکینون (TBHQ) به‌عنوان ترکیبات بسیار قوی برای نگهداری مواد غذایی طی دهه‌های گذشته به‌دلیل هزینه پایین و نداشتن طعم استفاده شده‌اند[24]، اما در سال‌های اخیر، این ترکیبات به‌دلیل تقاضای مشتریان برای محصولاتی با نشان "پاک و طبیعی" محبوبیت خود را از دست داده‌اند. به همین دلیل، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با ویژگی‌های مشابه با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مورد توجه زیادی قرار گرفته است[24].
رادیکال آزاد دی‌فنیل- پیکریل- هیدرازیل (DPPH) یک ماده پایدار و بنفش پُررنگ است. سنجش قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH نشان‌دهنده قدرت یک ترکیب آنتی‌اکسیدان برای دادن الکترون به DPPH و خنثی‌کردن آن است. این واکنش همراه با تغییر رنگ است و هر چقدر این تغییر رنگ شدیدتر باشد، نشان‌دهنده قدرت بیشتر آنتی‌اکسیدان است[24]. همچنین یون فرو، یک یون فعال و کلیدی برای تشکیل اکسیدان در سلول‌ها است که منجر به افزایش پراکسیداسیون چربی می‌شود. فروزین با یون Fe^{2+} تشکیل کمپلکس می‌دهد. تشکیل این کمپلکس در حضور یک عامل چلاته‌کننده دچار اختلال شده و مانع فعالیت اکسیداتیو آن می‌شود[25]. در مطالعات گذشته، قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH و همچنین چلاته‌کردن یون فلزی توسط پروتئین هیدرولیزشده حاصل از تخم ماهی کپور معمولی[26]، تخم گونه‌های ماهی سرماری (*Channa striatus*)، ماهی روهو[27] و هوور مسقطی (*Katsuwonous pelamis*) [28] و همچنین

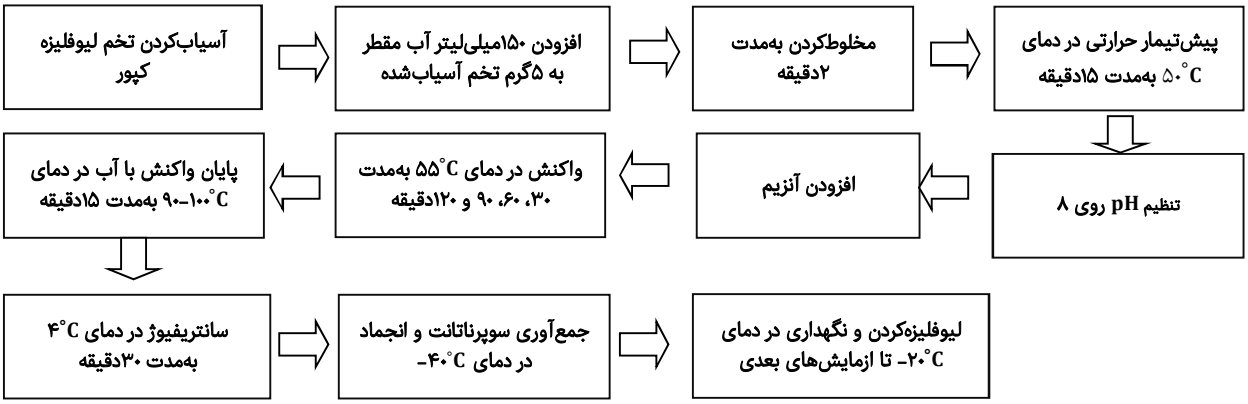
کنسانتره پروتئین تخم ماهی کپور و *اپی‌نفلوس تاوینا* (*Epinephelus tauvina*) [29] نشان داده شده است. همچنین پروتئین هیدرولیزشده حاصل از منابع دریایی می‌تواند به‌عنوان غذادارو نیز مورد استفاده قرار بگیرد و باعث پیشگیری از بروز مشکلاتی از قبیل فشار خون بالا و سرطان شود. پروتئین هیدرولیزشده با مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسین I به II می‌تواند مانع افزایش فشار خون شود[21]. علاوه بر اکسیداسیون، بیماری‌های ناشی از میکروارگانیزم‌های موجود در مواد غذایی هم حایز اهمیت فراوان است[30]. این میکروارگانیزم‌ها ممکن است سبب بروز مشکلات سلامتی در مصرف‌کننده‌ها از طریق فساد، توکسین‌ها و همچنین کاهش کیفیت مواد غذایی شوند. از سوی دیگر، استفاده از مواد مصنوعی ضدباکتریایی در مواد غذایی ممکن است سبب ایجاد اثرات جانبی و همچنین مقاومت میکروارگانیزم‌ها شود[31]. در این راستا مطالعات نشان داده‌اند که پروتئین هیدرولیزشده حاصل از منابع دریایی دارای خواص ضدباکتریایی هستند[32, 33].

تخم کپورماهیان معمولاً بدون استفاده خاصی دور ریخته می‌شود یا به‌صورت محدود مورد استفاده خوراکی قرار می‌گیرد[2] و تاکنون تلاشی برای استخراج پروتئین هیدرولیزشده از تخم ماهی کپور معمولی و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی، مهارکنندگی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین (ACE) و ضدباکتریایی آن در ایران انجام نشده است. لذا تحقیق حاضر به‌دنبال بررسی امکان استفاده از تخم ماهی کپور معمولی برای بازیابی پروتئین و استفاده از پروتئین هیدرولیزشده به‌عنوان یک ترکیب زیست‌فعال بود. بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی ترکیب تقریبی و آمینواسیدی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز بود.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر از نوع تجربی روی تخم ماهی کپور معمولی (دوکیلوگرم) اجرا شد که به‌صورت تازه از بازار ماهی گرگان تهیه و با یخ (به نسبت ۳:۱ تخم: یخ) پوشانده شد. سپس به آزمایشگاه دانشکده شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان انتقال یافت. تخم ماهی کپور معمولی به‌مدت یک ساعت در دمای ۴°C در یخچال نگهداری و پس از جداسازی عروق و لخته‌های خونی و سپس لیوفلیزه‌کردن تا شروع آزمایشات در دمای یخچال نگهداری شد. آلکالاز (نووزیمس؛ دانمارک) به محقق اهدا و تمام مواد مورد استفاده از شرکت‌های معتبر (مرک و سیگما- آلدریچ؛ آلمان) تهیه شدند و دارای درجه آزمایشگاهی بودند.

تهیه پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی: هیدرولیز تخم لیوفلیزه ماهی کپور براساس روش *اینتاراسیریساوات* و همکاران[28] انجام شد، بدین ترتیب که ۳گرم تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی در ۱۰۰میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و پس از انکوباسیون اولیه در دمای ۵۵°C به‌مدت ۱۵دقیقه و تنظیم pH برابر با ۸، آلکالاز به‌میزان ۱/۵% حجم مخلوط به آن اضافه شد. برای بررسی تاثیر زمان هیدرولیزاسیون، انکوباسیون مجدد در دمای ۵۵°C در چهار زمان ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه انجام شد. برای اتمام واکنش، مخلوط در آب با دمای ۹۰-۱۰۰°C قرار گرفت و پس از خنک‌سازی، لیوفلیزه و برای آزمایشات بعدی در دمای ۲۰°C- نگهداری شد (شکل ۱).



شکل ۱) فرآیند تولید پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی

سنجش ترکیب تقریبی نمونه‌های هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی: میزان چربی با استفاده از روش *بلای* و *دایر*[34] با کمی تغییرات به‌منظور استفاده از مقدار کمتر کلروفرم و متانول انجام شد. رطوبت، خاکستر و میزان پروتئین براساس روش‌های انجمن بین‌المللی شیمیدان‌های کشاورزی (AOAC) [35] سنجیده شدند. بدین منظور رطوبت و خاکستر به شیوه توزین حرارتی و با قراردادن نمونه‌ها در دمای ۱۰۵°C برای رطوبت و ۵۵۰°C برای خاکستر تا رسیدن به وزن ثابت اندازه‌گیری شدند. میزان پروتئین نیز با روش کلدال و با درنظرگیری ضریب تبدیل نیتروژن به پروتئین معادل ۶/۲۵ اندازه‌گیری شد. پس از به‌دست‌آوردن میزان پروتئین تخم لیوفلیزه و همچنین نمونه‌های هیدرولیزشده، میزان بازیابی پروتئین (بر حسب درصد) بعد از هیدرولیزاسیون نیز به روش زیر محاسبه شد:

$$\text{میزان بازیابی پروتئین} = \frac{\text{میزان پروتئین نمونه}}{\text{میزان پروتئین ماده خام}} \times ۱۰۰$$

درجه هیدرولیز براساس روش *هویله* و *مریت*[36] تخمین زده شد. حجمی از تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰% تهیه و به‌میزان مساوی به مایع روماند اضافه شد تا فازهای TCA ۱۰% محلول به دست آید و سپس در ۶۷۰۰دور در دقیقه به‌مدت ۲۰دقیقه در دمای ۱۰°C سانتریفیوژ و درجه هیدرولیز (بر حسب درصد) به شکل زیر محاسبه شد:

$$\text{هیدرولیز} = \frac{\text{میزان نیتروژن محلول در نمونه}}{\text{میزان نیتروژن کل ماده خام}} \times ۱۰۰$$

پس از لیوفلیزه‌کردن تخم ماهی کپور معمولی، هیدرولیزاسیون در چهار زمان ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه با استفاده از آلکالاز انجام گرفت. پس از هیدرولیز تخم لیوفلیزه‌شده، ترکیب تقریبی پروتئین هیدرولیزشده در چهار زمان مختلف سنجیده شد.

ترکیب آمینواسیدی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی: ترکیب آمینواسیدی با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا- طیف‌سنجی جرمی (HPLC-MS) و با استفاده از کیت آمینواسید EZ:faast (Phenomenex؛ ایالات متحده) در گروه بایواکتیو دانشگاه فنی دانمارک (DTU) سنجیده شد. آزادسازی آمینواسیدها از طریق هیدرولیز با استفاده از هیدروکلرید (HCl) ۶مولار به‌مدت یک ساعت در دمای ۱۱۰°C در یک سیستم مایکروویو آماده‌سازی نمونه با مدل Multiwave 3000 (Anton Paar GmbH؛ استرالیا) انجام شد. پس از خنثی‌سازی pH و خالص‌سازی با استخراج فاز جامد، نمونه به دستگاه Agilent HPLC 1100 (Agilent؛ ایالات متحده) با یک Agilent Ion Trap MS (Agilent؛ ایالات متحده) تزریق شد. جداسازی آمینواسیدها در دمای ۳۵°C روی یک ستون Zebron ZB-AAA (Phenomenex؛ ایالات متحده) با اندازه ۳/۰×۲۵۰میلی‌متر با یک گرادیان ۸۳-۶۸% آمونیوم‌فرمات ۱۰میلی‌مولار در متانول و آمونیوم‌فرمات ۱۰میلی‌مولار در آب با نرخ جریان ۰/۵میلی‌لیتر در دقیقه انجام گرفت. یونیزاسیون مثبت از طریق یونیزاسیون شیمیایی در فشار اتمسفری (APCI؛ ۴۵۰°C) حاصل شد و شناسایی ترکیبات با مقایسه زمان بازداری و طیف‌های جرمی یک مخلوط استاندارد بیرونی انجام پذیرفت. ارزیابی کمّی با استفاده از منحنی‌های کالیبراسیون انجام شد.

سنجش قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH: قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH با روش *شیمادا* و همکاران[37] با کمی تغییر سنجیده شد. نمونه‌های لیوفلیزه‌شده پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی برای حصول غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر با آب مقطر مخلوط و ۱۵۰میکرولیتر از محلول حاصل با ۱۵۰میکرولیتر محلول اتانولی ۰/۱میلی‌مولار DPPH مخلوط شد. این مخلوط به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای اتاق در تاریکی نگهداری و سپس میزان جذب نمونه در ۵۱۵نانومتر در دستگاه Eon™ microplate spectrophotometer (BioTek Instruments Inc؛ ایالات متحده) خوانده شد. برای شاهد، ۱۵۰میکرولیتر آب مقطر به‌جای نمونه استفاده و شاهد نمونه هم با مخلوط‌کردن ۱۵۰میکرولیتر نمونه با ۱۵۰میکرولیتر اتانول ۹۵% تهیه و تمامی سنجش‌ها سه‌بار تکرار شد. محلول BHT (۰/۲میلی‌گرم/میلی‌لیتر) نیز به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH (بر حسب درصد) با روش زیر سنجیده شد:

$$\text{قدرت حذف رادیکال آزاد} = \left[1-\frac{(\text{جذب نمونه}-\text{جذب شاهد})}{\text{جذب شاهد}}\right]\times 100$$

مقدار IC_{50} (غلظتی از محلول بر حسب میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر برای ممانعت از ۵۰% فعالیت DPPH) برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.

سنجش قدرت چلاته‌کردن یون فلزی: قدرت چلاته‌کردن یون فلزی با استفاده از روش *دایینیس* و همکاران[38] با کمی تغییر سنجیده شد. نمونه‌های لیوفلیزه‌شده پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی در نسبت‌های ۰/۲، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲ و ۱/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر با آب مقطر مخلوط و سپس ۲۰۰میکرولیتر از هر محلول با ۲۷۰میکرولیتر آب مقطر و ۱۰میکرولیتر کلریدفروس ۲میلی‌مولار مخلوط شدند. پس از ۳دقیقه، ۲۰میکرولیتر محلول فروزین ۵میلی‌مولار اضافه و پس از ۱۰دقیقه در دمای اتاق، میزان جذب نمونه در ۵۶۲نانومتر در دستگاه Eon™ microplate spectrophotometer قرائت شد. برای شاهد، آب مقطر به‌جای نمونه مورد استفاده قرار گرفت و شاهد نمونه هم با روش ذکرشده ولی بدون افزودن فروزین تهیه و تمامی سنجش‌ها سه‌بار تکرار شد. محلول اتیلن‌دی‌آمین‌تتراستیک (EDTA؛ ۰/۵میلی‌مولار) نیز به‌عنوان کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت. قدرت چلاته‌کردن یون فلزی (بر حسب درصد) با روش زیر سنجیده شد:

$$\text{قدرت چلاته کردن یون فلزی} = \left[1-\frac{(\text{جذب شاهد نمونه}-\text{جذب نمونه})}{\text{جذب شاهد}}\right]\times 100$$

مقدار IC_{50} (غلظتی از محلول بر حسب میلی‌گرم پروتئین در میلی‌لیتر برای چلاته‌کردن ۵۰% یون فلزی) برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه شد.

سنجش قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE): ACE پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی براساس روش *سوشمن* و *چونگ*[39] در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲، ۱/۵ و ۱/۸میلی‌گرم در میلی‌لیتر برای رسیدن به مقدار IC_{50} سنجیده شد. ۵۰میکرولیتر از محلول پروتئین هیدرولیزشده و ۵۰میکرولیتر ACE به‌مدت ۱۰دقیقه در دمای محیط مورد انکوباسیون قرار گرفتند. سپس ۲۵۰میکرولیتر محلول فسفونوهیستیدین- هیستیدین- لوسین (Hip-His-Leu) اضافه شد و به‌مدت ۳۰دقیقه در دمای ۳۷°C مورد انکوباسیون قرار گرفت. واکنش با افزودن ۲۵۰میکرولیتر اسیدهیدروکلریک یک نرمال خاتمه یافت. اسیدهیپوریک آزادشده با استفاده از ۵۰۰میکرولیتر اتیل‌استر استخراج و سپس در یک‌میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. میزان جذب نمونه در طول موج ۲۲۸نانومتر در دستگاه Eon™ microplate spectrophotometer قرائت شد. برای نمونه شاهد از پروتئین هیدرولیزشده استفاده نشد و سنجش‌ها سه‌بار تکرار شد. قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (بر حسب درصد) نیز با روش زیر سنجیده شد:

$$\text{قدرت مهارکنندگی مبدل آنژیوتنسین} = \left[(\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد})\right]\times 100$$

سنجش قدرت ضدباکتریایی: قدرت ضدباکتریایی براساس روش *برگ* و *ولیتینک*[40] سنجیده شد. پنج باکتری گرم‌مثبت و چهار باکتری گرم‌منفی برای این سنجش مورد استفاده قرار گرفتند. باکتری‌های گرم‌مثبت شامل *استافیلوکوکوس اورئوس* (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923)، *میکروکوکوس لوتئوس* (*Micrococcus luteus* ATCC 4698)، *باسیلوس سرئوس* (*Bacillus cereus* ATCC 11778)، *لیستریا مونوسیتوژنز* (*Listeria monocytogenes* ATCC 43251)، و *انتروکوکوس فکالیس* (*Enterococcus faecalis* ATCC 29212) بودند. باکتری‌های گرم‌منفی نیز شامل *اشیرشیا کلی* (*Escherichia coli* ATCC 25922)، *سودوموناس آئروژینوزا* (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853)، *کلبسیلا پنومونیه* (*Klebsiella pneumonia* ATCC 13883) و *سالمونلا انتریکا* (*Salmonella enterica* ATCC 43972) بودند. برای سنجش خواص ضدباکتریایی، محلول پروتئین هیدرولیزشده با غلظت ۲۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب مقطر تهیه و

از فیلتر غشایی نایلونی ۰/۲۲میکرومتر عبور داده شد. سوسپانسیون‌های کشت (۱۰^۶واحد تشکیل‌دهنده کلونی در یک‌میلی‌لیتر سوسپانسیون) روی مولر- هینتون آگار گسترده شدند. سپس چهار چاهک به قطر ۴میلی‌متر ایجاد و ۱۰۰میکرولیتر محلول پروتئین هیدرولیزشده درون آنها ریخته شد. همچنین یک چاهک دیگر هم با ۱۰۰میکرولیتر بافر فسفات‌سدیم به‌عنوان نمونه شاهد منفی پر شد. پس از یک ساعت در دمای ۴°C، پتری‌دیش‌ها به‌مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷°C مورد انکوباسیون قرار گرفتند. قدرت ضدباکتریایی براساس قطر منطقه بازدارندگی از رشد باکتری‌ها تعیین شد. تیمارهای آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شدند.

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 21 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌راهه برای بررسی تفاوت در میانگین‌های قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH، قدرت چلاته‌کردن یون فلزی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و قدرت ضدباکتریایی بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون و آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) برای مقایسه میانگین‌ها صورت گرفت.

یافته‌ها

ترکیب تقریبی و آمینواسیدی پروتئین‌های هیدرولیزشده: میزان پروتئین حاصل از سنجش کلدال پس از هیدرولیز به‌مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه به‌ترتیب به ۶۸/۹۴%، ۷۱/۵۱% و ۷۳/۱۶% و ۷۸/۶۶% رسید. با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، میزان بازیابی پروتئین براساس گرم پروتئین در ماده خام و همچنین درجه هیدرولیز نیز افزایش پیدا کرد. میزان چربی در نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده کمتر از ۱۶% و میزان رطوبت در پروتئین هیدرولیزشده در ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه به‌ترتیب ۹/۹۰%، ۶/۲۹%، ۵/۳۰% و ۵/۲۸% بود. همچنین میزان خاکستر نمونه‌ها با افزایش درجه هیدرولیز بیشتر شد و از ۶/۳۴% تا ۸/۹۰% متغیر بود (جدول ۱).

فراوان‌ترین آمینواسیدها در تخم ماهی کپور و پروتئین‌های هیدرولیزشده آن، والین، لایزین، آرژنین و لوسین بودند. همچنین آمینواسیدهای غیرضروری غالب در تخم ماهی کپور و پروتئین‌های هیدرولیزشده آن شامل گلوتامیک‌اسید، آسپارتیک‌اسید و گلایسین بود (جدول ۲).

جدول ۱) ترکیب تقریبی تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی و پروتئین هیدرولیزشده آن (CRPH) در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه

ترکیب	۳۰دقیقه	۶۰دقیقه	۹۰دقیقه	۱۲۰دقیقه
رطوبت (درصد وزن)	۹/۹۰±۰/۰۵	۶/۲۹±۰/۸۶	۵/۳۰±۰/۳۳	۵/۲۸±۰/۱۹
پروتئین (درصد وزن)	۶۸/۹۴±۰/۹۸	۷۱/۵۱±۰/۷۴	۷۳/۱۶±۱/۲۰	۷۸/۶۶±۰/۷۸
چربی (درصد وزن)	۱۵/۷۶±۱/۰۳	۱۱/۲۶±۱/۴۱	۱۱/۱۶±۱/۲۳	۱۱/۸۹±۰/۰۲
خاکستر (درصد وزن)	۶/۳۴±۰/۵۰	۷/۲۵±۰/۰۲	۸/۵۶±۰/۲۷	۸/۹۰±۰/۱۸
بازیابی پروتئین (درصد)	۵۳/۴۹	۵۷/۶۵	۶۰/۸۰	۶۴/۰۷
درجه هیدرولیز (درصد)	۷/۵۹	۹/۷۰	۱۰/۰۶	۱۰/۱۸

جدول ۲) ترکیب آمینواسیدی تخم ماهی کپور معمولی و پروتئین هیدرولیزشده آن (CRPH) طی ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه

ترکیب آمینواسیدی	تخم ماهی کپور	۳۰دقیقه	۶۰دقیقه	۹۰دقیقه	۱۲۰دقیقه
آمینواسیدهای ضروری					
آرژنین	۳/۹۰±۱/۲۷	۳/۶۵±۰/۹۳	۴/۶۰±۰/۵۷	۶/۶۲±۱/۹۱	۵/۵۰±۲/۶۱
هیستیدین	۰/۰۶±۰/۰۴	۰/۰۴±۰/۰۰۱	۰/۰۳±۰/۰۱	۰/۰۶±۰/۰۱	۰/۰۶±۰/۰۲
ایزولوسین	۱/۴۶±۰/۴۵	۲/۱۰±۰/۶۸	۱/۱۳±۰/۳۹	۱/۵۳±۰/۰۶	۱/۲۰±۰/۷۴
لوسین	۴/۰۵±۰/۷۶	۳/۹۵±۰/۰۶	۳/۱۸±۰/۷۴	۳/۴۷±۰/۵۵	۳/۵۲±۱/۰۶
لایزین	۴/۸۶±۱/۱۱	۳/۲۰±۱/۰۲	۶/۵۰±۰/۶۱	۶/۱۶±۱/۷۰	۵/۳۶±۳/۰۴
متیونین	۱/۱۰±۰/۲۵	۱/۱۵±۰/۳۰	۱/۰۰±۰/۲۴	۱/۰۴±۰/۰۶	۰/۸۷±۰/۰۱
فنیل آلانین	۱/۷۵±۰/۲۰	۱/۷۱±۰/۲۲	۱/۴۵±۰/۵۱	۱/۵۴±۰/۲۲	۱/۳۳±۰/۳۴
ترئونین	۲/۸۱±۰/۵۳	۲/۶۷±۰/۵۲	۲/۵۴±۰/۴۹	۲/۷۵±۰/۴۴	۲/۵۷±۱/۱۰
تریپتوفان	۰/۲۸±۰/۰۳	۰/۲۵±۰/۰۱	۰/۳۹±۰/۰۲	۰/۳۷±۰/۰۵	۰/۳۸±۰/۰۶
والین	۵/۵۵±۱/۰۰	۶/۴۶±۰/۷۷	۶/۲۰±۱/۰۳	۶/۹۳±۱/۶۶	۶/۷۴±۲/۲۲
آمینواسیدهای غیرضروری					
آلانین	۱/۸۳±۱/۲۳	۰/۲۲±۰/۱۹	۱/۰۱±۰/۷۱	۲/۶۳±۱/۰۸	۱/۸۲±۱/۷۷
آسپارتیک‌اسید	۳/۶۵±۰/۷۱	۳/۶۲±۰/۵۸	۳/۴۶±۰/۶۴	۳/۶۸±۰/۵۷	۳/۷۸±۱/۱۳
سیستئین	۰/۲۲±۰/۰۲	۰/۳۴±۰/۰۶	۰/۱۶±۰/۰۶	۰/۱۹±۰/۰۳	۲/۰۰±۰/۰۴
هیدروکسی پرولین	۳/۸۷±۰/۷۲	۳/۷۰±۰/۰۷	۲/۸۹±۰/۶۱	۳/۴۰±۰/۰۴	۲/۰۰±۰/۰۴
گلایسین	۴/۴۹±۰/۱	۵/۰۶±۰/۴۶	۳/۷۶±۰/۷۸	۴/۷۴±۰/۹۴	۴/۹۷±۱/۰۹
گلوتامین	۵/۶۶±۱/۳۱	۵/۸۰±۰/۶۵	۶/۴۰±۰/۰۷	۶/۸۷±۱/۴۳	۶/۰۶±۳/۱۰
پرولین	۲/۴۵±۰/۵۹	۲/۴۳±۰/۲۵	۱/۸۳±۰/۴۱	۲/۴۵±۰/۲۱	۲/۲۸±۰/۵۸
سرین	۲/۸۷±۰/۵۹	۳/۲۱±۰/۴۵	۲/۶۴±۰/۳۹	۳/۰۴±۰/۵۶	۳/۰۰±۱/۳۱
تیروزین	۱/۲۵±۰/۱۵	۱/۲۷±۰/۲۱	۱/۱۵±۰/۲۵	۱/۱۴±۰/۱۴	۱/۰۶±۰/۲۸

قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH: با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده، درصد حذف رادیکال آزاد نیز افزایش پیدا کرد. قدرت آنتی‌اکسیدانی با افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان از ۵ تا ۱۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر افزایش معنی‌داری پیدا نکرد (نمودار ۱- الف). قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۱۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر، اختلاف معنی‌داری با آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT نداشت. همچنین مقدار IC_{50} برای پروتئین هیدرولیزشده به‌مدت ۳۰دقیقه در همان غلظت یک‌میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد که به‌میزان معنی‌داری پایین‌تر از قدرت آنتی‌اکسیدان BHT بود ($p<0/05$). قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT کمتر از غلظت ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر پروتئین هیدرولیزشده بود، ولی اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور در ۶۰دقیقه، قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH نیز افزایش پیدا کرد (نمودار ۱- ب). با افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان از یک تا ۱۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH به‌طور

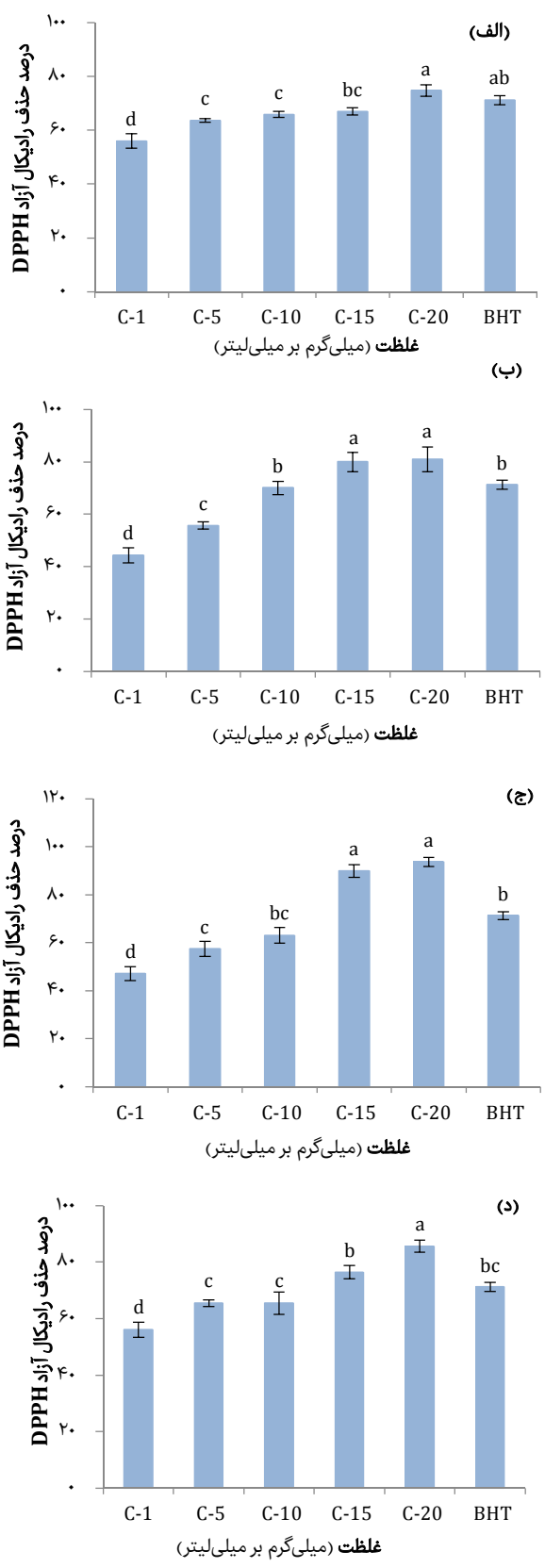
معنی‌داری افزایش پیدا کرد (p<۰/۰۵)، ولی اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد. مقدار IC_{50} برای پروتئین هیدرولیزشده به‌مدت ۶۰دقیقه، در غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد. به عبارت دیگر، غلظت بالاتری از پروتئین هیدرولیزشده به‌مدت ۶۰دقیقه در مقایسه با ۳۰دقیقه برای حذف حداقل ۵۰% رادیکال آزاد DPPH مورد نیاز است. همچنین قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط پروتئین هیدرولیزشده با غلظت‌های ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بالاتر از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT بود (p<۰/۰۵).

قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH در پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی در ۹۰دقیقه در غلظت‌های ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بالاتر از آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT بود (p<۰/۰۵) و مقدار IC_{50} در غلظت ۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد. همچنین اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مشاهده نشد. اختلاف معنی‌داری در قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH بین پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور در مدت ۹۰دقیقه با BHT وجود نداشت (نمودار ۱- ج). با ادامه واکنش هیدرولیزاسیون تخم لیوفلیزه ماهی کپور تا ۱۲۰دقیقه، مقدار IC_{50} در غلظت یک‌میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حاصل شد (نمودار ۱- د). قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH در غلظت ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر به‌طور معنی‌داری بالاتر از غلظت‌های دیگر و همچنین BHT بود (p<۰/۰۵). اختلاف معنی‌داری بین قدرت آنتی‌اکسیدانی BHT و پروتئین هیدرولیزشده با غلظت ۱۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر وجود نداشت (نمودار ۱).

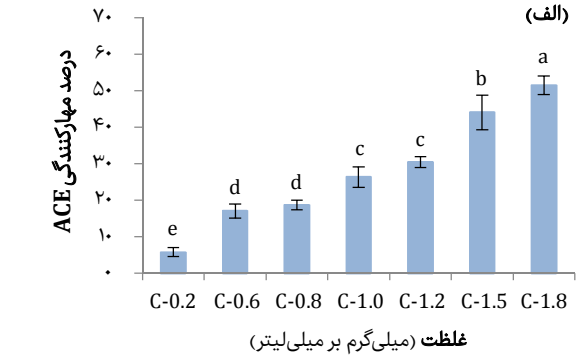
قدرت چلاته‌کردن یون فلزی: قدرت چلاته‌کردن یون آهن II با افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان افزایش یافت. در غلظت‌های پایین‌تر (۰/۸-۰/۲میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، پروتئین هیدرولیزشده طی ۳۰دقیقه ظرفیت بالاتری را برای چلاته‌کردن یون فلزی نشان داد، در حالی که در غلظت‌های بالاتر، نمونه‌های حاصل از افزایش زمان هیدرولیزاسیون، قدرت چلاته‌کردن بالاتری داشتند. پروتئین هیدرولیزشده طی ۱۲۰دقیقه در غلظت پایین‌تری به IC_{50} رسید و غلظت کمتری از آنتی‌اکسیدان در مقایسه با سه نمونه دیگر برای چلاته‌کردن ۵۰% یون فلزی مورد نیاز بود. قدرت چلاته‌کردن یون فلزی آنتی‌اکسیدان مصنوعی EDTA به‌طور معنی‌داری بالاتر از تمامی آنتی‌اکسیدان‌های حاصل از هیدرولیز آنزیمی پروتئین تخم ماهی کپور بود (p<۰/۰۵؛ نمودار ۲).

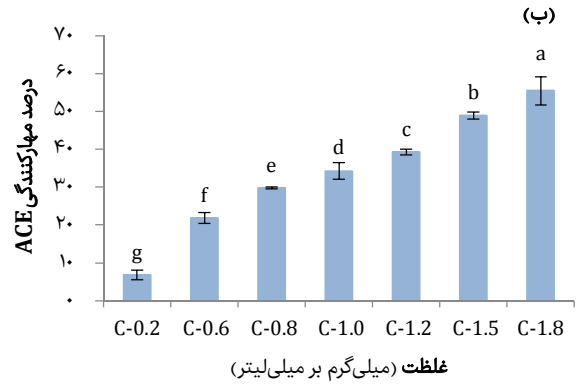
قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE): مقدار IC_{50} برای پروتئین هیدرولیزشده طی ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه به‌ترتیب در غلظت‌های ۱/۸، ۱/۸، ۱/۵ و ۱/۲میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد. قدرت مهارکنندگی ACE با افزایش غلظت و درجه هیدرولیز افزایش یافت. در همه نمونه‌ها به‌جز پروتئین هیدرولیزشده در ۳۰دقیقه، قدرت مهارکنندگی ACE با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده به‌طور معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵؛ نمودار ۳).

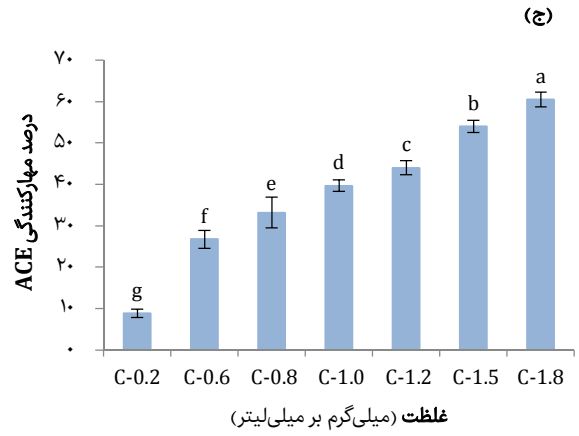
قدرت ضدباکتریایی: پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور دارای فعالیت ضدباکتریایی در برابر سه باکتری گرم‌مثبت *باسیلوس سرئوس*، *میکروکوکوس لوتئوس* و *استافیلوکوکوس اورئوس* و یک باکتری گرم‌منفی *اشیرشیاکلی* بود. پروتئین هیدورلیزشده تخم ماهی کپور معمولی نتوانست مانع رشد دو باکتری گرم‌مثبت *انتروکوکوس فکالیس* و *لیستریا مونوسیتوژنز* و همچنین سه باکتری گرم‌منفی *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا انتریکا* شود (جدول ۳).

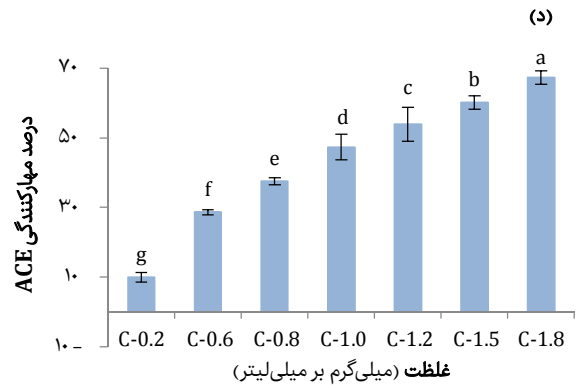


نمودار ۱) قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH توسط پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپورمعمولی بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
الف) ۳۰دقیقه هیدرولیزاسیون ب) ۶۰دقیقه هیدرولیزاسیون ج) ۹۰دقیقه هیدرولیزاسیون د) ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
c-1-20: پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپورمعمولی در غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۱۵ و ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر هستند.
حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

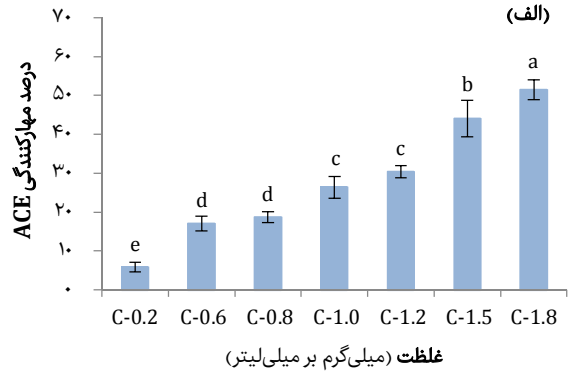


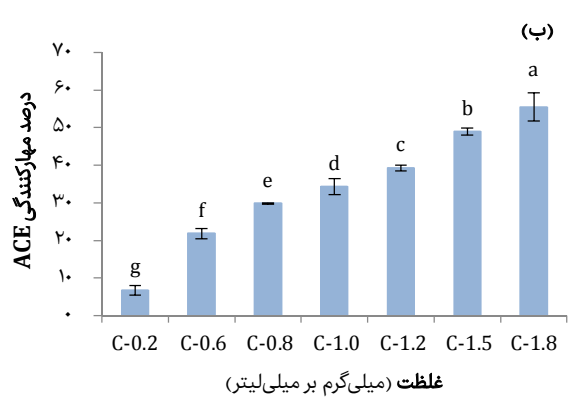


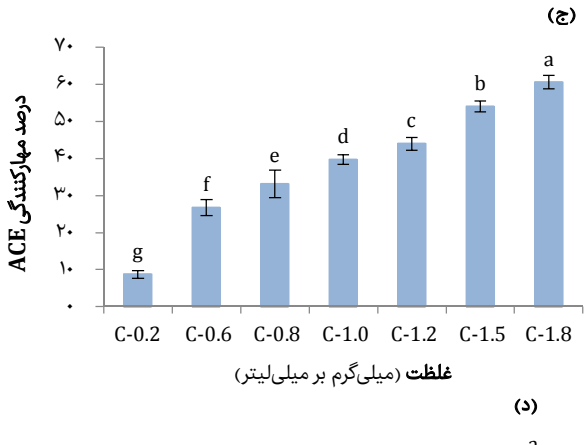


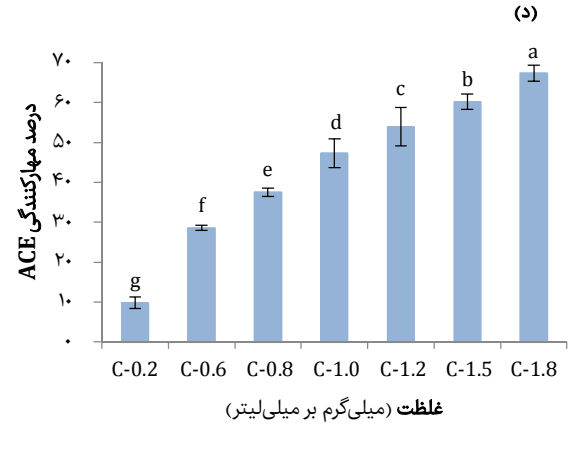


نمودار ۲) قدرت چلاته‌کردن یون فلزی توسط پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
الف) ۳۰دقیقه هیدرولیزاسیون ب) ۶۰دقیقه هیدرولیزاسیون ج) ۹۰دقیقه هیدرولیزاسیون د) ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
c-0/2-1/5: پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپورمعمولی در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲ و ۱/۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر هستند.
حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵)









نمودار ۳) قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین (ACE) توسط پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی بعد از ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
الف) ۳۰دقیقه هیدرولیزاسیون ب) ۶۰دقیقه هیدرولیزاسیون ج) ۹۰دقیقه هیدرولیزاسیون د) ۱۲۰دقیقه هیدرولیزاسیون
c-0/2-1/8: پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور در غلظت‌های ۰/۲، ۰/۶، ۰/۸، ۱/۰، ۱/۲، ۱/۵ و ۱/۸میلی‌گرم در میلی‌لیتر هستند.
حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار است (p<۰/۰۵)

جدول ۳) قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی طی ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه

باکتری	۳۰دقیقه	۶۰دقیقه	۹۰دقیقه	۱۲۰دقیقه
باکتری‌های گرم‌مثبت				
استافیلوکوکوس اورئوس	+	++	+++	+++
میکروکوکوس لوتئوس	+	+++	+++	+++
باسیلوس سرئوس	+	+	+	++
لیستریا مونوسیتوژنز	–	–	–	–
انتروکوکوس فکالیس	–	–	–	–
باکتری‌های گرم‌منفی				
اشیرشیا کلی	+	++	++	++
سودوموناس آئروژینوزا	–	–	–	–
کلبسیلا پنومونیه	–	–	–	–
سالمونلا انتریکا	–	–	–	–

* +، ++ و +++ به‌ترتیب نشان‌دهنده ۱/۵>، ۱/۵-۰/۵ و ۰/۵<سانتی‌متر قطر ناحیه بازدارندگی هستند و – نشان‌دهنده عدم وجود فعالیت ضدباکتریایی است

بحث

هدف پژوهش حاضر بررسی ترکیب تقریبی و آمینواسیدی، قدرت آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز بود. ترکیب شیمیایی مواد غذایی دارای اهمیت زیادی برای سلامتی انسان است و ترکیب شیمیایی پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان از دیدگاه تغذیه‌ای اهمیت زیادی برای سلامتی انسان دارد. در مطالعه حاضر، میزان پروتئین در هر چهار نمونه بالاتر از ۶۰% بود که با مطالعات گذشته همخوانی داشت[19, 29, 41]. میزان چربی در نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده کمتر از ۱۶% بود که میزان کم چربی در نمونه‌ها به‌دلیل حذف چربی‌ها با پروتئین‌های نامحلول طی مرحله سانتریفیوژ است[42]. همچنین میزان پروتئین در پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان بین ۶۰% و ۹۰% گزارش شده است [22,43] که مطالعه حاضر با آنها همخوانی داشت، زیرا مقادیر پروتئین در نمونه‌های هیدرولیزشده به‌مدت ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰دقیقه توسط آلکالاز بالاتر از ۶۰% حاصل شد. محتوای پروتئینی بالا در پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از ماهیان به‌دلیل حل‌شدن پروتئین‌ها طی هیدرولیز و حذف ماده جامد نامحلول از طریق سانتریفیوژ است[42]. مکانیزم عمل آنزیم در دو مرحله اتفاق می‌افتد، بدین گونه که ابتدا طی یک واکنش سریع اولیه، زنجیره‌های پلی‌پپتیدی با پیوند سست شکسته و ذرات پروتئینی نامحلول تشکیل می‌شوند. در مرحله دوم، پروتئین‌های به‌هم‌فشرده تحت تاثیر آنزیم قرار می‌گیرند و هضم می‌شوند. با گذشت زمان، سرعت واکنش کاهش پیدا می‌کند که به‌دلیل کاهش فعالیت آنزیم، اشباع‌شدن سوبسترا یا بازدارندگی محصول است[44]. در اکثر مطالعات انجام‌شده روی پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان، میزان رطوبت کمتر از ۱۰% گزارش شده است[22, 45]. در مطالعه حاضر نیز میزان رطوبت نمونه‌ها پایین‌تر از ۱۰% بود که با مطالعات قبلی همخوانی داشت. رطوبت پایین پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان به‌دلیل استفاده از دماهای بالا در طول فرآیند و استفاده از روش‌هایی مانند خشک‌کردن پاششی یا لیوفلیزه‌کردن است[42]. همچنین مطابق انتظار، خاکستر در نمونه‌های هیدرولیزشده افزایش یافت. میزان خاکستر در پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از ماهیان در مطالعات گذشته از ۰/۴۵% تا ۲۷% متغیر بوده است[22, 41] که مطالعه حاضر (۹-۶%) با آنها مطابقت داشت. خاکستر در پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان به‌دلیل اسید یا باز اضافه‌شده برای تنظیم pH در طول واکنش ایجاد می‌شود[42, 46]. ترکیب آمینواسیدی ترکیبات غذایی اهمیت بسزایی در تعیین اثرات آنها روی انسان دارند. محتوای آمینواسیدی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور در مطالعه حاضر با مطالعات گذشته روی تخم ماهی کپور[2] و گونه‌های دیگر[22, 42, 47] مطابقت داشت. آرژنین در اینجا به‌عنوان یک آمینواسید ضروری در نظر گرفته شد[28]، هر چند این آمینواسید در برخی از مطالعات دیگر به‌عنوان یک آمینواسید غیرضروری در نظر گرفته شده بود[42]. این تفاوت در دیدگاه‌ها را می‌توان با توجه به نیازهای متفاوت بدن انسان در سنین مختلف توضیح داد[48]. میزان کل آمینواسیدها و میزان کل آمینواسیدهای ضروری در پروتئین‌های هیدرولیزشده بالاتر از تخم هیدرولیزنشده بود. همچنین میزان کل آمینواسیدهای غیرضروری در پروتئین‌های هیدرولیزشده به‌مدت ۹۰ و ۱۲۰دقیقه بالاتر از تخم هیدرولیزنشده بود که این نشان از کارآیی هیدرولیز آنزیمی برای بهبود ترکیب آمینواسیدی است. البته تفاوت‌هایی در مقدار آمینواسیدهای مختلف مشاهده شد، برای مثال، علی‌رغم افزایش در بیشتر آمینواسیدها پس از هیدرولیز، تخم هیدرولیزنشده مقدار بالاتری از لوسین، فنیل‌آلانین و ترئونین داشت. همچنین نوساناتی در ترکیب آمینواسیدی پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از زمان‌های مختلف واکنش مشاهده شد که این نوسانات می‌توانند مربوط به ماده خام، منبع آنزیمی و شرایط هیدرولیزاسیون باشند[49]. از آنجایی که ماده خام و آنزیم در مطالعه حاضر تفاوتی نداشتند، تغییرات در ترکیب آمینواسیدی پروتئین‌های هیدرولیزشده را می‌توان به مدت‌زمان تماس آنها با حرارت و همچنین تغییر در فعالیت آنزیم طی زمان نسبت داد.

در مطالعه حاضر افزایش زمان هیدرولیزاسیون و حصول درجه هیدرولیز بالاتر باعث کاهش خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده در غلظت‌های پایین شد. به این ترتیب که IC_{50} در مدت ۳۰دقیقه هیدرولیزاسیون، در غلظت یک‌میلی‌گرم در میلی‌لیتر به دست آمد، در حالی که وقتی هیدرولیزاسیون تا ۶۰ و ۹۰دقیقه ادامه پیدا کرد و طبیعتاً درجه هیدرولیز افزایش پیدا کرد، IC_{50} در غلظت ۵میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد. البته با ادامه واکنش تا ۱۲۰دقیقه، مجدداً IC_{50} در غلظت یک‌میلی‌گرم در میلی‌لیتر حاصل شد. یافته‌های حاصل در مطالعه حاضر در مورد قدرت حذف رادیکال DPPH با نتایج مطالعات گذشته همخوانی داشت[16, 22, 47, 50]. تفاوت در قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیزشده با درجه‌های هیدرولیز متفاوت می‌تواند به‌دلیل تفاوت در میزان پپتیدها و آمینواسیدها با وزن مولکولی پایین (کمتر از ۰/۳کیلودالتون) باشد. در این راستا، *فاروین* و همکاران[51] بیان کرده‌اند که پپتیدها و آمینواسیدها با وزن مولکولی پایین، قدرت آنتی‌اکسیدانی بسیار بالایی دارند. علی‌رغم اینکه مکانیزم عمل پروتئین هیدرولیزشده حاصل از منابع شیلاتی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان هنوز به‌طور کامل مشخص نشده است، اما آمینواسیدهای آب‌گریز مانند هیستیدین، متیونین، سیستئین، پرولین، والین، فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان نقش مهمی در خاصیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بازی می‌کنند[42]، در نتیجه، تفاوت بین پروتئین‌های هیدرولیزشده از منابع مختلف و با درجه‌های هیدرولیز متفاوت می‌تواند تا حد زیادی مربوط به ترکیب آمینواسیدی پپتیدهای حاصل از فرآیند هیدرولیزاسیون نیز باشد[22].

قدرت چلاته‌کردن پروتئین هیدرولیزشده اهمیت فراوانی دارد، زیرا یون‌های فلزی می‌توانند از طریق واکنش فنتون و تجزیه

هیدروپراکسیدهای چربی به رادیکال‌های پروکسیل و آلکوکسیل باعث آغاز اکسیداسیون چربی شوند[24]. در مطالعه حاضر، بالاترین قدرت چلاته‌کردن یون فلزی متعلق به پروتئین هیدرولیزشده به‌مدت ۱۲۰دقیقه در غلظت ۱/۵میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (۱/۷۳±۶۲/۱۳) که مطابق با مقدار گزارش‌شده توسط *چالامایا* و همکاران [26] در پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی بود، اما این مقدار با اختلاف معنی‌داری کمتر از قدرت چلاته‌کردن یون فلزی توسط آنتی‌اکسیدان EDTA بود. در مطالعه‌ای قدرت چلاته‌کردن یون فلزی در هیدرولیز پروتئین ماهیچه ماهی هیک اقیانوس آرام به مقادیر ۷ تا ۴۶% دست پیدا کرده‌اند[52]. البته *دیانسیلاکول* و همکاران[53] در بررسی قدرت چلاته‌کردن یون فلزی در هیدرولیز تهیه‌شده از پروتئین ماهی اسکاد گرد به مقادیر حدود ۶۰% رسیده‌اند. قدرت چلاته‌کردن یون فلزی توسط پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی می‌تواند در ارتباط با پپتیدها با وزن مولکولی پایین با آمینواسیدهای هیستیدین، گلوتامین، لایزین و آرژنین باشد[22, 42, 54] که قادر به چلاته‌کردن پرواکسیدان‌هایی از قبیل یون‌های آهن و مس هستند[55].

آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی به‌دلیل خطراتی که برای سلامتی انسان دارند، با محدودیت‌هایی مواجه هستند. به همین دلیل، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مثل پروتئین هیدرولیزشده حاصل از ماهیان، به‌جای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. بنابراین در پژوهش حاضر از BHT به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان مصنوعی به‌منظور مقایسه خواص آنتی‌اکسیدانی آن با پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور استفاده شد. نتایج نشان داد که نمونه تولیدشده در مطالعه حاضر در غلظت‌های ۱۵ یا ۲۰میلی‌گرم در میلی‌لیتر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری نسبت به آنتی‌اکسیدان مصنوعی BHT دارد که در برخی موارد اختلاف بین آنها معنی‌دار بود ($p<0/05$)، لذا می‌توان از پروتئین هیدرولیزشده تخم لیوفلیزه ماهی کپور معمولی در کاربردهای غذایی به‌جای BHT استفاده کرد. البته طعم تلخ و بوی تند پروتئین هیدرولیزشده می‌تواند به‌عنوان یک عامل محدودکننده کاربرد آن تلقی شود و در نتیجه مطالعات باید برای حذف طعم و بوی نامطلوب آن به شیوه‌ای قابل استفاده در صنعت انجام شود.

آنزیم مبدل آنژیوتنسین نقش مهمی در تنظیم فشار خون و عملکرد قلبی- عروقی بازی می‌کند. این آنزیم، آنژیوتنسین I را به آنژیوتنسین II تبدیل می‌کند. آنژیوتنسین II یک تنگ‌کننده قوی عروق بوده و گشادکننده‌های عروق را غیرفعال کرده و در نتیجه باعث افزایش فشار خون در فرد می‌شود[56]. در مطالعه حاضر، نمونه‌ها با درجه هیدرولیز بالاتر و در نتیجه، پپتیدها با وزن مولکولی پایین‌تر، قدرت مهارکنندگی بالاتری را در برابر ACE نشان دادند که با نتایج مطالعات گذشته مطابقت داشت[57, 58]. همچنین قدرت مهارکنندگی ACE می‌تواند به‌دلیل آمینواسیدهای آروماتیک و آب‌گریز در پروتئین هیدرولیزشده باشد[21].

قدرت ضدباکتریایی بیشتر پروتئین هیدورلیزشده تخم ماهی کپور معمولی در برابر باکتری‌های گرم‌مثبت با نتایج مطالعه *جمیل* و همکاران[30] مطابقت داشت. این محققان اعلام کرده‌اند که باکتری‌های گرم‌منفی مقاومت بیشتری در برابر پروتئین هیدورلیزشده دارند. همچنین نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش زمان هیدورلیزاسیون و در نتیجه درجه هیدرولیز، قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدورلیزشده تخم ماهی کپور معمولی نیز افزایش پیدا کرد که با نتایج حاصل از مطالعه *سیلا* و همکاران[31] مطابقت داشت. این محققان بیان کرده‌اند که پپتیدهای کوچک‌تر حاصل از مدت‌زمان بالاتر هیدرولیزاسیون، توانایی بیشتری برای ممانعت از رشد باکتری‌ها دارند. بنابراین خواص زیستی پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور تابعی از مدت‌زمان هیدرولیزاسیون و در نتیجه، درجه هیدرولیز و همچنین غلظت مورد استفاده است.

از محدودیت‌های پژوهش حاضر می‌توان به محدودیت دسترسی به تجهیزات پیشرفته برای شناسایی پپتیدهای فعال و همچنین محدودیت زمانی به‌منظور بررسی اثر غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیزشده در آزمایش‌های مختلف اشاره نمود. پیشنهاد می‌شود به جای دورریز ضایعات ماهی یا استفاده از آنها برای تولید محصولاتی از قبیل پودر ماهی، محصولات ارزش‌افزوده از قبیل روغن ماهی یا پروتئین هیدرولیزشده تولید شود. همچنین پیشنهاد می‌شود مطالعات آینده به تولید پروتئین هیدرولیزشده از تخم و دیگر ضایعات گونه‌های دیگر ماهیان و بررسی خواص کارکردی، آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی آن پرداخته شود.

نتیجه‌گیری

پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی به‌دلیل دارابودن درصد بالایی از پروتئین، پپتیدهای زیست‌فعال و آمینواسیدهای ضروری و غیرضروری، خواص آنتی‌اکسیدانی، مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتنسین و ضدباکتریایی بالایی دارد. از پروتئین هیدرولیزشده تخم ماهی کپور معمولی می‌توان به‌عنوان افزودنی طبیعی به‌جای مواد مصنوعی به‌منظور کاهش اکسیداسیون چربی‌ها، مهار آنزیم مبدل آنژیوتنسین و همچنین ممانعت از رشد برخی باکتری‌های بیماری‌زا استفاده کرد.

تشکر و قدردانی: بدین وسیله از زحمات و حمایت‌های پروفسور *شارلوت جیکوبسن*، دکتر *پدروخسوس‌گارسیامورنو*، دکتر *آن- دوریت مولتکه‌سورنسن* و مهندس *مونا حاج‌فتحعلیان* از مرکز بایواکتیو دانشگاه DTU دانمارک تشکر می‌شود. همچنین از نماینده شرکت نووزیمس دانمارک در ایران برای اهدای آلکالاز قدردانی می‌شود.

تاییدیه اخلاقی: این مقاله، حاصل بخشی از رساله دکتری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان به شماره مصوب ۹۱۲۱۰۶۴۱۰۲ بوده است.

تعارض منافع: نویسندگان این مقاله هیچ گونه تعارض منافعی نداشته‌اند.

سهم نویسندگان: سخی قلیچی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۵%)؛ بهاره شعبان‌پور (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر اصلی (۳۵%)؛ پرستو پورعاشری (نویسنده سوم)، پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری (۳۰%)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان ذکر نشده است.

منابع

1- Ennaas N, Hammami R, Beaulieu L, Fliss I. Purification and characterization of four antibacterial peptides from protamex hydrolysate of Atlantic mackerel (Scomber scombrus) by-products. Biochem Biophys Res Commun. 2015;462(3):195-200.

2- Chalamaiah M, Hemalatha R, Jyothirmayi T, Diwan PV, Bhaskarachary K, Vajreswari A, et al. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (Cyprinus carpio) egg. Nutrition. 2015;31(2):388-98.

3- Villamil O, Váquiro H, Solanilla JF. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties. Food Chem. 2017;224:160-71.
4- Aspmo SI, Horn SJ, Eijsink VGH. Hydrolysates from Atlantic cod (Gadus morhua L.) viscera as components of microbial growth media. Process Biochem. 2005;40(12):3714-22.
5- Kechaou ES, Dumay J, Donnay-Moreno C, Jaouen P, Gouygou JP, Bergé JP, et al. Enzymatic hydrolysis of cuttlefish (Sepia officinalis) and sardine (Sardina pilchardus) viscera using commercial proteases: Effects on lipid distribution and amino acid composition. J Biosci Bioeng. 2009;107(2):158-64.
6- Benhabiles MS, Abdi N, Drouiche N, Lounici H, Pauss A, Goosen MFA, et al. Fish protein hydrolysate production from sardine solid waste by crude pepsin enzymatic hydrolysis in a bioreactor coupled to an ultrafiltration unit. Mater Sci Eng, C. 2012;32(4):922-8.
7- Ramakrishnan VV, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM. Extraction of proteins from mackerel fish processing waste using Alcalase enzyme. Bioprocess Biotech. 2013;3:2.
8- Silva JFX, Ribeiro K, Silva JF, Cahú TB, Bezerra RS. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. Anim Feed Sci Technol. 2014;196:96-106.
9- Deraz SF. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of bolti fish (Tilapia nilotica): Chemical and nutritional variations as affected by processing pHs and time of hydrolysis. J Aquat Food Prod Technol. 2015;24(6):614-31.
10- Younes I, Nasri R, Bkhairia I, Jellouli K, Nasri M. New proteases extracted from red scorpionfish (Scorpaena scrofa) viscera: Characterization and application as a detergent additive and for shrimp waste deproteinization. Food Bioprod Process. 2015;94:453-62.
11- Cudennec B, Balti R, Ravallec R, Caron J, Bougatef A, Dhulster P, et al. In vitro evidence for gut hormone stimulation release and dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of protein hydrolysate obtained from cuttlefish (Sepia officinalis) viscera. Food Res Int. 2015;78:238-45.
12- Yanan Z, Li Z, Hua L, Wei S, Meilan Y. Effect of eel head protein hydrolysates on the denaturation of grass carp surimi during frozen storage. Procedia Eng. 2012;37:223-8.
13- Ruthu, Murthy PS, Rai AK, Bhaskar N. Fermentative recovery of lipids and proteins from freshwater fish head waste with reference to antimicrobial and antioxidant properties of protein hydrolysate. J Food Sci Technol. 2014;51(9):1884-92.
14- Chi CF, Wang B, Wang YM, Zhang B, Den SG. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (Navodon septentrionalis) heads. J Funct Foods. 2015;12:1-10.
15- Chi CF, Wang B, Wang YM, Zhang B, Deng SG. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (Navodon septentrionalis) heads. J Funct Foods. 2015;12:1-10.
16- García-Moreno PJ, Batista I, Pires C, Bandarra NM, Espejo-Carpio FJ, Guadix A, et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. Food Res Int. 2014;65(Part C):469-76.
17- Nikoo M, Benjakul S, Xu X. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. Food Chem. 2015;181:295-303.
18- Prabha J, Vincent S, Joseph S, Magdalene J. Bioactive and functional properties of fish protein hydrolysate from Leiognathus bindus. Asian J Pharm Clin Res. 2016;9(5):277-81.
19- Karakala B, Rao Pamidighantam P, Rao NG, Tummala J. Functional properties of roe protein hydrolysates from Catla catla. Electron J Environ Agric Food Chem. 2011;10(4):2139-47.
20- Yang JI, Tang JY, Liu YS, Wang HR, Lee SY, Yen CY, et al. Roe protein hydrolysates of giant grouper (Epinephelus lanceolatus) inhibit cell proliferation of oral cancer cells involving apoptosis and oxidative stress. BioMed Res Int. 2016;2016:8305073.
21- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Dinesh Kumar B. Antiproliferative, ACE-inhibitory and functional properties of protein hydrolysates from rohu (Labeo rohita) roe (egg) prepared by gastrointestinal proteases. J Food Sci Technol. 2015;52(12):8300-7.
22- García-Moreno PJ, Guadix A, Guadix EM, Jacobsen C. Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. Food Chem. 2016;203:124-35.
23- Naqash SY, Nazeer RA. Antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from pink perch (Nemipterus japonicus) muscle. J Food Sci Technol. 2013;50(5):972-8.
24- Shahidi F, Zhong Y. Measurement of antioxidant activity. J Funct Foods. 2015;18(Part B):757-81.
25- Je JY, Kim SY, Kim SK. Preparation and antioxidative activity of hoki frame protein hydrolysate using ultrafiltration membranes. Eur Food Res Technol. 2005;221(1-2):157-62.
26- Chalamaiah M, Jyothirmayi T, Diwan PV, Dinesh Kumar B. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (Cyprinus carpio) roe (egg). J Food Sci Technol. 2015;52(9):5817-25.
27- Rao GN, Rao Pamidighantam P, Akula S, Karakala B. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of Channa striatus and Labeo rohita. Food Chem. 2012;135(3):1479-84.
28- Intarasirisawat R, Benjakul S, Visessanguan W, Wu J. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (Katsuwonous pelamis) roe. Food Chem. 2012;135(4):3039-48.
29- Rao GN. Physico-chemical, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates from Cyprinus carpio and Epinephelus tauvina. J Food Pharm Sci. 2014;2(1):15-22.
30- Jemil I, Jridi M, Nasri R, Ktari N, Rabeb Ben Slama-Ben Salem, Mehiri M, et al. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis A26. Process Biochem. 2014;49(6):963-72.
31- Sila A, Nedjar-Arroume N, Hedhili K, Chataigné G, Balti R, Nasri M, et al. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. LWT-Food Sci Technol. 2014;55(1):183-8.
32- Tang W, Zhang H, Wang L, Qian H, Qi X. Targeted separation of antibacterial peptide from protein hydrolysate of anchovy cooking wastewater by equilibrium dialysis. Food Chem. 2015;168:115-23.

croaker and functional properties of its hydrolysates. J Food Sci. 2009;74(1):C17-24.
47- Morales-Medina R, Tamm F, Guadix AM, Guadix EM, Drusch S. Functional and antioxidant properties of hydrolysates of sardine (S. pilchardus) and horse mackerel (T. mediterraneus) for the microencapsulation of fish oil by spray-drying. Food chem. 2016;194:1208-16.
48- Wu G, Jaeger LA, Bazer FW, Rhoads JM. Arginine deficiency in preterm infants: Biochemical mechanisms and nutritional implications. J Nutr Biochem. 2004;15(8):442-51.
49- Klompong V, Benjakul S, Yachai M, Visessanguan W, Shahidi F, Hayes KD, et al. Amino acid composition and antioxidative peptides from protein hydrolysates of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis). J Food Sci. 2009;74(2):C126-33.
50- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (Selaroides leptolepis) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chem. 2007;102(4):1317-27.
51- Farvin KH, Lystbæk Andersen L, Hauch Nielsen H, Jacobsen C, Jakobsen G, Johansson I, et al. Antioxidant activity of Cod (Gadus morhua) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. Food Chem. 2014;149:326-34.
52- Samaranayaka AGP, Li-Chan ECY. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (Merluccius productus). Food chem. 2008;107(2):768-76.
53- Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Antioxidative activity of protein hydrolysate from round scad muscle using Alcalase and Flavourzyme. J Food Biochem. 2007;31(2):266-87.
54- Elias RJ, Kellerby SS, Decker EA. Antioxidant activity of proteins and peptides. Crit Rev Food Sci Nutr. 2008;48(5):430-41.
55- Hmidet N, Balti R, Nasri R, Sila A, Bougatef A, Nasri M. Improvement of functional properties and antioxidant activities of cuttlefish (Sepia officinalis) muscle proteins hydrolyzed by Bacillus mojavensis A21 proteases. Food Res Int. 2011;44(9):2703-11.
56- Vercruysse L, Van Camp J, Smagghe G. ACE inhibitory peptides derived from enzymatic hydrolysates of animal muscle protein: A review. J Agric Food Chem. 2005;53(21):8106-15.
57- Jamdar SN, Rajalakshmi V, Pednekar MD, Juan F, Yardi V, Sharma A. Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. Food Chem. 2010;121(1):178-84.
58- Nasri R, Jridi M, Lassoued I, Jemil I, Rabeb Ben Slama-Ben Salem, Nasri M, et al. The influence of the extent of enzymatic hydrolysis on antioxidative properties and ACE-inhibitory activities of protein hydrolysates from goby (Zosterisessor ophiocephalus) muscle. Appl Biochem Biotechnol. 2014;173(5):1121-34.
33- Wald M, Schwarz K, Rehbein H, Bußmann B, Beermann C. Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. Food Chem. 2016;205:221-8.
34- Bligh EG, Dyer WJ. A rapid method of total lipid extraction and purification. Can J Biochem Physiol. 1959;37(8):911-7.
35- AOAC, AOAC International. Official Methods of Analysis of AOAC International. 18th Edition. Horwitz W, Latimer GV, editors. Arlington: AOAC International; 2006.
36- Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysates from herring (Clupea harengus). J Food Sci. 1994;59(1):76-9.
37- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. J Agric Food Chem. 1992;40(6):945-8.
38- Dinis TCP, Maderia VMC, Almeida LM. Action of phenolic derivatives (Acetaminophen, Salicylate, And 5-Aminosalicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and as peroxyl radical scavengers. Arch Biochem Biophys. 1994;315(1):161-9.
39- Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem Pharmacol. 1971;20(7):1637-48.
40- Berghe VA, Vlietinck AJ. Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. In: Hostettmann K, editor. Methods in plant biochemistry: Assays for bioactivity. 6th Volume. Cambridge: Academic Press; 1991. pp. 47-68.
41- Ovissipour M, Abedian AM, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R, Shahiri H. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Food Chem. 2009;115(1):238-42.
42- Chalamaiah M, Dinesh Kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. Food Chem. 2012;135(4):3020-38.
43- Nilsang S, Lertsiri S, Suphantharika M, Assavanig A. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. J Food Eng. 2005;70(4):571-8.
44- Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterisation and nutritional evaluation. J Sci Food Agric. 2000;80(5):581-9.
45- Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresour Technol. 2008;99(2):335-43.
46- Choi YJ, Hur S, Choi BD, Konno K, Park JW. Enzymatic hydrolysis of recovered protein from frozen small