

(مقاله پژوهشی)

بررسی خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی بیاچ (*Liza abu*)

سید رسول شاه حسینی^۱، سیدروح ا...جوادیان^{۲*}، رضا صفری^۳

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نور، دانشگاه آزاد اسلامی، نور، ایران.

۲- گروه شیلات، واحد قائم شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم شهر، ایران.

۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج جهاد کشاورزی، ساری، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۲۳

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۵/۰۹

چکیده

در این پژوهش فعالیت آنتی اکسیدانی و خاصیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی بیاچ (*Liza abu*) مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین هیدرولیز در سه زمان مختلف (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه)، با استفاده از آنزیم های تجاری آلکالاز و فلاورزایم و به نسبت ادرصد آنزیم به پروتئین نمونه اولیه، در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد تولید شد. نتایج نشان که با افزایش زمان هیدرولیز میزان بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز افزایش می یابد ($p < 0/05$) و پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز از لحاظ میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز بالاتر از سایر پروتئین های هیدرولیز شده بود ($p < 0/05$). بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی (فعالیت به دام انداختن رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی فریک و فعالیت به دام انداختن رادیکال آزاد ABTS) و بیشترین خاصیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد ($p < 0/05$). نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی بیاچ دارای فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالاست، که می تواند به عنوان مکمل های پروتئینی در مواد غذایی و در فرمول های رژیم غذایی استفاده شود.

واژه های کلیدی: ماهی بیاچ، هیدرولیز آنزیمی، آنزیم های تجاری، فعالیت آنتی اکسیدانی، فعالیت ضد میکروبی.

۱-مقدمه

در بین اقلام غذایی، آبریزان دارای اهمیت ویژه‌ای در مقوله امنیت غذایی است. به طوری که در حال حاضر بخش مهمی از امنیت غذای جهان بخصوص در سواحل و کشورهای در حال توسعه به عهده آبریزان است. پروتئین ماهی یک منبع ضروری غذایی برای بسیاری از مردم می‌باشد. تخمین زده شده است که معیشت یک میلیارد نفر در سرتاسر جهان وابسته به تولید، فرآوری و تجارت ماهی بستگی دارد (۲۶). ماهیان کم مصرف و ضایعات آبریزان منبع تولید پروتئین هیدرولیزه هستند. فرآیند هیدرولیز طراحی شده تا ماهیان کم مصرف و ضایعات آبریزان را قابل بهره برداری کند تا به جای استفاده در غذای دام یا استفاده به شکل کود، مورد مصرف غذای انسانی واقع گردد (۳۳). طی پروسه هیدرولیز پروتئین، سوبسترای پروتئین از طریق آنزیم‌های پروتئولیتیک، اسید یا باز و باکتری‌های تخمیر کننده، تحت فرآیند هیدرولیز قرار می‌گیرد. در هیدرولیز پروتئین، روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی بیشترین کاربرد را دارد و استفاده از روش‌های هیدرولیز شیمیایی در صنعت متداول‌تر است. اما از بین روش‌های هیدرولیز روش آنزیمی مناسب‌تر می‌باشد چرا که پروتئین‌های به دست آمده از هیدرولیز آنزیمی ارزش غذایی و خواص عملکردی بسیار خوبی دارند (۲۴). پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهیان به دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال، کندروتین سولفات و خواص ضداکسایشی، از جمله مواد مناسب برای درمان سرطان محسوب می‌شوند. از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی هستند و می‌توانند به‌عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبریزان مورد استفاده قرار گیرند (۲۷). اهمیت اکسیداسیون در بدن و مواد غذایی شناخته شده است و این متابولیسم برای بقای سلول ضروری است. یکی از اثرات جانبی این واکنش تولید رادیکال‌های آزاد و دیگر گونه‌های اکسیژن فعال است که باعث تغییرات اکسیداتیو می‌شود (۲۵). اکسیداسیون چربی منجر به توسعه طعم و بوی نامطلوب و تولید فرآورده‌های سمی می‌گردد. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های

مصنوعی ممکن است برای کنترل اکسیداسیون چربی مورد استفاده قرار گیرند اما از نظر جنبه‌های سلامتی و همچنین عدم‌پذیرش آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی توسط مصرف‌کنندگان کاربرد آنها در فرآورده‌های غذایی محدود شده است (۳۵). بنابراین علاقه‌مندی به شناسایی خواص آنتی‌اکسیدانی بسیاری از ترکیبات طبیعی شامل برخی از ترکیبات پروتئینی و تغذیه‌ای رشد فزاینده‌ای یافته است. یکی از منابع آنتی‌اکسیدانی طبیعی که امروزه مورد توجه محققان قرار گرفته، پروتئین هیدرولیز شده از ماهی می‌باشد. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده و کاربردهای آنها در تحقیقات و شاخه‌های متفاوت از صنعت مورد بررسی قرار گرفته است. پروتئین‌های هیدرولیز شده بر اساس ویژگی‌های ساختاری و ترکیب آمینو اسیدی، نقش‌های متعددی مانند مهارکنندگی عناصر کمیاب، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، فعالیت ضد میکروبی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، کاهش دهنده‌گی کلسترول و فعالیت ضد فشار خون بالا از خود نشان می‌دهند. که در بسیاری از مطالعات به خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نیز اشاره شده است (۱۲، ۲۸، ۳۲، ۳۶). با عنایت به مطالب ذکر شده تا کنون تحقیقی در خصوص تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی بیاح (که دارای ذخایر مناسب در آب‌های سواحل جنوبی و قیمت ارزان می‌باشد) توسط آنزیم‌ها و بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آن صورت نپذیرفته است. تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم بر درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی، طول زنجیره پپتیدی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده از امعا و احشاء ماهی بیاح انجام شد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-تهیه ماهی و مواد اولیه

ماهی بیاح (*Liza abu*) با میانگین وزنی 400 ± 35 ، از سواحل خلیج فارس (جزیره خور موسی) صید شد. به منظور جلوگیری از تخریب آنزیمی و میکروبی، توسط جعبه یونولیتی در مجاورت پودر یخ با نسبت ماهی به

بودر پروتئین هیدرولیز شده تبدیل گردیدند (۲۸). تولید پروتئین هیدرولیز شده توسط هر آنزیم، در سه تکرار انجام شد

۲-۳- تعیین ترکیب شیمیایی

برای تعیین میزان پروتئین از روش استاندارد AOAC به شماره ۹۳۰.۱۵، ۹۵۴.۰۱، ۹۴۲.۰۵ استفاده گردید (۱۵). برای تعیین میزان پروتئین کل، از دستگاه کلدال (Behr، آلمان) و با استفاده از ضریب تبدیل نیتروژن ۶/۲۵ استفاده شد. برای تعیین میزان چربی از استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۴۲ استفاده شد (۳).

۲-۴- تعیین درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز با افزودن حجم برابر از تری کلرواستیک-اسید (TCA) ۲۰ درصد به نمونه پروتئین هیدرولیز شده اندازه گیری شد و از طریق رابطه زیر محاسبه گردید (۱۶).

۱۰۰ (نیتروژن کل در نمونه هیدرولیز شده) / (میزان نیتروژن محلول در محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد) = درجه هیدرولیز (درصد)

۲-۵- طول زنجیره پپتیدی

برای اندازه‌گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم‌های مختلف از روش Kristinsson and Rasco (۲۰۰۰) استفاده شد. در این روش از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره به کمک فرمول زیر استفاده گردید (۲۱).

۱۰۰

$$\text{درجه هیدرولیز اسیون} = \frac{\text{طول زنجیره پپتیدی}}{100}$$

۲-۶- بازیافت پروتئین

بازیافت پروتئین به صورت درصد بیان شد و با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۲).

$$\text{مقدار پروتئین موجود در پروتئین هیدرولیز شده} \times 100 = \frac{\text{بازیافت پروتئین (درصد)}}{\text{مقدار پروتئین اندرونه}}$$

۲-۷- اندازه گیری فعالیت مهارکنندگی رادیکال های

DPPH

غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر از نمونه پروتئین هیدرولیز شده در آب مقطر تهیه و ۱ میلی لیتر از آن با ۱ میلی لیتر محلول DPPH (۱/۱ میلی مولار) تهیه شده در اتانول ۹۰ درصد

یخ ۱ به ۲ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل گردید. ابتدا در آزمایشگاه امعاء و احشاء جداسازی و در ادامه با استفاده از چرخ گوشت با قطر سوراخ ۰/۵ میلی متر به طور کامل چرخ و هموزن شد. سپس ۵۰ گرم از نمونه جهت اندازه‌گیری ترکیب شیمیایی (پروتئین و چربی) و مابقی امعاء و احشاء چرخ شده جهت تولید پروتئین هیدرولیز شده، در کیسه‌های پلاستیکی قرار داده و به منظور آزمایش‌های بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آنزیم آلکالاز و فلاورزایم از نمایندگی شرکت نووازیم (دانمارک) در ایران تهیه و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

۵۰ گرم از نمونه هموزن شده امعاء و احشاء ماهی بیاح پس از انجمادزدایی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته و سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد، سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیر فعال سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد. در ادامه با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال، pH بهینه فعالیت آنزیم‌های آلکالاز ۸/۵ و فلاورزایم ۷ تنظیم گردید. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده و آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خشک شدن تا دمای اتاق با استفاده از سانتریفوژ (Kokusan، ژاپن) با دور ثابت ۸۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شدند، مایع رویی حاصل از سانتریفوژ، جمع‌آوری و با استفاده از خشک‌کن انجمادی (Operon، کره جنوبی) تحت شرایط خلاء و دمای ۵۰- درجه سانتی‌گراد خشک و به

نانومتر عدد 0.7 ± 0.2 به دست آید، ترکیب شد. ۶۵ میکرو مولار نمونه محلول با ۶۵ میکرو مولار بافر فسفات ترکیب شد ۶۶/۶۷ میکرو مولار از این مخلوط با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و ۶۶/۶۷ میکرو مولار بافر فسفات به عنوان شاهد با ۹۱۰ میکرو مولار محلول ABTS ترکیب شد و پس از ۱۰ دقیقه در دمای محیط در تاریکی قرار گرفت و جذب در ۷۳۴ نانومتر قرائت شد تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

$$100 \times \left(\frac{\text{میزان جذب نمونه}}{\text{میزان جذب کنترل}} - 1 \right) = \text{درصد پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS}$$

۲-۱۰-۱- بررسی فعالیت ضد میکروبی

۲-۱۰-۱-۱- آماده سازی باکتری

میکروارگانسیم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: اشرشیا کلی ۱۳۹۹:PTCC به نمایندگی از باکتری‌های گرم منفی و استافیلوکوکوس اورئوس PTCC ۱۱۱۲ به نمایندگی از باکتری‌های گرم مثبت که از مرکز تحقیقات و پژوهش علمی صنعتی ایران تهیه و طبق روش Grisi and Lira (۲۰۰۵) آماده‌سازی شد (۱۴).

۲-۱۰-۲- تعیین حداقل غلظت بازدارندگی MIC و

حداقل غلظت کشندگی MBC^۱

باکتری‌های مورد مطالعه غلظت تقریبی 10^8 cfu/g به میزان ۰/۲ میلی لیتر به هر یک از لوله‌های آزمایش افزوده شد. در مرحله بعد محلول‌های پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از Tween 80 (مرک آلمان) و آب مقطر به نحوی تهیه شدند که با ریختن مقدار ۰/۲ میلی لیتر از هر کدام از محلول‌ها درون لوله آزمایش حاوی محیط کشت مایع و باکتری‌های مورد آزمایش (استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی) ساخته شد. سپس لوله‌های آزمایش در انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد برای باکتری‌ها گرمخانه‌گذاری می شود. پس از ۲۴ ساعت پائین ترین غلظتی که در آن هیچ کدورتی مشاهده نگردید به عنوان

ترکیب شد. پس از انکوباسیون نمونه در تاریکی، جذب نوری آن در ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. در نمونه شاهد به جای پروتئین هیدرولیزه، از آب مقطر استفاده شد (۷).

۲-۸- اندازه گیری قدرت احیا کنندگی آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

با استفاده از روش معرفی شده توسط Aleman و همکاران (۲۰۱۱) و با اندکی تغییر از این روش برای بررسی قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از امعاء و احشاء ماهی بیاح استفاده شد (۷). ابتدا مقدار ۰/۵ میلی لیتر پودر هیدرولیز شده با غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با $\text{pH}=6/6$ و ۲/۵ میلی لیتر محلول ادرصدوزنی - حجمی پتاسیم فری سیانید مخلوط گردید. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد قرار گرفت و پس از این مدت با افزودن ۲/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد، واکنش پایان یافت. سپس این محلول ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ و در نهایت ۲/۵ میلی لیتر از مایع رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی لیتر کلرید فریک ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط قرار گرفت و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل لامبدا، PerkinElme) در طول موج ۷۰۰ نانومتر تعیین گردید. جذب بالاتر نشان دهنده قدرت احیا کنندگی بالاتر پودر پروتئین هیدرولیز شده بود.

۲-۹- اندازه گیری میزان فعالیت آنتی اکسیدانی به روش ABTS

تعیین فعالیت پاک کنندگی رادیکال آزاد ABTS با روش Aleman و همکاران (۲۰۱۱) تعیین شد (۷). محلول رادیکال ABTS با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر از ABTS ۷ میلی مولار و ۸۸ میکرو مولار پتاسیم پرسولفات ۱۴۰ میلی مولار مهیا شد و ۱۶ ساعت در دمای محیط در تاریکی نگهداری شد، ۰/۵ میلی لیتر از محلول موجود با ۴۰ میلی لیتر (بافر فسفات ۵ میلی مولار، $\text{pH} 7/4$ ، حاوی $\text{NaCl} 0/2$ مولار) تا جذب محلول رادیکال ABTS بتواند در ۷۳۴

1- Minimum Bactericidal Concentration

۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها، با توجه به نرمال بودن داده‌ها و همگنی واریانس، با استفاده از روش آنالیز واریانس یک طرفه (One-Way ANOVA) استفاده شد. برای مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام داده‌ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شد و ارزیابی‌ها در ۳ تکرار صورت پذیرفت. از نرم افزار (SPSS version 18) برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید. نمونه‌ها به صورت زیر کدگذاری شد.

MIC در نظر گرفته شد. پس از تعیین MIC جهت تعیین MBC در شرایط کاملاً استریل از محتویات ارلن‌هایی که پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری هنوز شفاف بودند و کدورتی در آن‌ها مشاهده نشده باشند به میزان ۰/۱ میلی لیتر در پتری دیش‌های حاوی محیط کشت مناسب هر گونه باکتری کشت سطحی داده می‌شوند. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای مناسب رشد و عدم رشد باکتری‌ها بررسی و اولین غلظتی که در آن رشد مشاهده نگردید به عنوان MBC در نظر گرفته می‌شود (۵).

جدول ۱- کدگذاری نمونه‌ها

کد	نمونه
F ₁₀	پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم ۱۰ دقیقه
F ₂₀	پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم ۲۰ دقیقه
F ₃₀	پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم ۳۰ دقیقه
A ₁₀	پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۱۰ دقیقه
A ₂₀	پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۲۰ دقیقه
A ₃₀	پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز ۳۰ دقیقه

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه گیری ترکیبات شیمیایی امعاء و احشاء ماهی بیاح و پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آن
نتایج مربوط به ماده خام و پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آلکالاز و فلاورزایم در جدول ۲ ارائه شده است. اختلاف معنی داری از لحاظ میزان پروتئین بین نمونه‌های

هیدرولیز شده وجود دارد ($p < 0/05$). به طوری که میزان پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز ($78/91 \pm 1/25$) بیشتر از فلاورزایم ($72/16 \pm 2/57$) می‌باشد. همچنین میزان چربی نسبت به ماده خام اولیه به طور قابل توجهی کاهش پیدا کرده است بطوریکه اختلاف معنی داری در میزان چربی بین نمونه‌های هیدرولیز شده دیده نمی‌شود ($p > 0/05$).

جدول ۲- ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

چربی	پروتئین	ماده
$8/26 \pm 1/43^a$	$13/53 \pm 0/45^c$	ماده خام
$0/97 \pm 0/09^b$	$78/91 \pm 1/25^a$	آلکالاز
$1/02 \pm 0/11^b$	$72/16 \pm 2/57^b$	فلاورزایم

* همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین \pm انحراف از معیار)

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.

اکسیداسیون لیپیدها نقش چشمگیری دارد و سبب پایداری محصول می شود (۲۹). نتایج سایر محققین حاکی از آن است که میزان چربی در پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۰/۵ درصد می باشد. اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹) با بکار بردن آنزیم آلکالاز، میزان چربی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء فیل ماهی را بعد از ۲۰۵ دقیقه، ۰/۱۸ درصد گزارش نمودند (۲۷).

۳-۲-درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و بازیافت پروتئینی

نتایج درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی و طول زنجیره پپتیدی در جدول ۳ ارائه شده است. با افزایش زمان هیدرولیز درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی به طور معنی داری (p<۰/۰۵) افزایش یافت. همچنین نتایج طول زنجیره پپتیدی با نتایج درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی رابطه عکس داشت با افزایش زمان هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی به طور معنی داری (p<۰/۰۵) کاهش یافت و طول زنجیره پپتیدی در آنزیم آلکالاز کمتر از آنزیم فلاورزایم بود.

اویسی پور و همکاران (۱۳۸۹) اثر ۳ آنزیم پروتاز را روی خواص پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تن زرد باله مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش نمودند بیشترین میزان محتوی پروتئینی مربوط به فرآورده تولید شده از ماده خام اولیه با آنزیم آلکالاز و کمترین محتوی پروتئینی مربوط به آنزیم فلاورزایم بود. میزان چربی در ماده خام اولیه در حدود ۸ درصد بود که بعد از انجام عمل هیدرولیز، میزان چربی در هر دو پروتئین هیدرولیز شده به شدت کاهش پیدا نمود. دلیل این کاهش، می تواند به دلیل شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتیفوژ نمونه ها دانست که باعث می شود در طی سانتیفوژ با دور بالا، چربی به پروتئین نامحلول متصل شده و همراه آنها رسوب کند. همچنین بخش اعظمی از چربی به صورت یک لایه مجزا، بعد از سانتیفوژ روی سوپرناتانت جمع می شود که به راحتی قابل برداشت است. ضمناً این چربی از ارزش غذایی بالایی برخوردار می باشد (۲، ۲۸). بنابراین مقدار اندکی لیپید برای شرکت در اکسیداسیون چربی وجود خواهد داشت. کاهش میزان لیپید پروتئین های هیدرولیز شده در پایداری

جدول ۳-درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و بازیافت پروتئینی، پروتئین هیدرولیز شده^{۲۰}

تیمار	درجه هیدرولیز (%)	طول زنجیره پپتیدی	بازیافت پروتئینی (%)
F ₁₀	۸/۸۹±۰/۴۵ ^e	۲۶/۱۱±۰/۵۷ ^a	۴۶/۵۶±۱/۲۵ ^e
F ₂₀	۱۰/۲۷±۰/۰۳ ^d	۹/۷۴±۰/۰۳ ^b	۵۲/۳۶±۱/۵۷ ^d
F ₃₀	۱۲/۲۵±۰/۲۸ ^c	۸/۱۶±۰/۱۹ ^c	۶۰/۰۵±۰/۲۵ ^c
A ₁₀	۱۲/۸۰±۰/۳۱ ^c	۷/۸۱±۰/۱۹ ^c	۵۹/۴۵±۱/۴۱ ^c
A ₂₀	۱۵/۶۲±۰/۳۸ ^b	۶/۴۰±۰/۱۵ ^d	۷۲/۹۲±۲/۳۶ ^b
A ₃₀	۲۰/۰۰±۰/۲۱ ^a	۵/۰۰±۰/۰۵ ^e	۸۱/۳۵±۱/۵۵ ^a

* همه اعداد بر حسب میانگین ± انحراف از معیار بیان شده اند

* اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند (a, b, c, ...)

اسیدهای آمینه، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده وابسته به شدت و درجه هیدرولیز می باشد (۲۹). با افزایش زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش یافت و میزان درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از آنزیم فلاورزایم بود (p<۰/۰۵) نتایج سایر محققین، نتایج تحقیق

یکی از مهم ترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز می باشد که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان

آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان‌کننده توانایی یک آنزیم در جدا سازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول، و در نتیجه میزان بازدهی فرآیند در طی هیدرولیز آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد (۱۷). با افزایش زمان هیدرولیز بازیافت پروتئینی به طور معنی‌داری افزایش یافت و میزان بازیافت پروتئینی توسط آلکالاز بیشتر از آنزیم فلاورزایم بود. که با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (۲۷، ۲۳، ۱۷). آنزیم آلکالاز، یک آنزیم مایع به رنگ قهوه‌ای تیره است که اندوپروتئیناز^۱ می‌باشد و دارای منشاء میکروبی از باکتری باسیلوس لیکنی فورمیس^۲ بوده و به همین جهت، خواص مناسب پروتئازی را از خود نشان می‌دهد (اویسی پور و قعی، ۱۳۸۷). در مطالعه حاضر با افزایش مدت زمان هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی افزایش یافت که این امر در چندین مطالعه گزارش شده است. در تحقیقی که توسط شکرپور و همکاران (۱۳۹۵) بر روی اثر شدت هیدرولیز بر بازیافت پروتئینی و اندازه مولکولی پروتئین گوشت کوسه چانه سفید انجام شد، گزارش شد که با افزایش زمان هیدرولیز از ۱۰ دقیقه به ۳۰ دقیقه بازیافت پروتئینی افزایش یافته است (۴). نتایج تحقیق- حاکی از ارتباط و ضریب همبستگی بین بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز می‌باشد که با افزایش درجه هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی افزایش پیدا می‌کند (۸).

۳-۳- خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

نتایج مربوط به خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده شامل روش‌های پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی فریک و پاک‌کنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS در جدول ۴ ارائه شده است نتایج مربوط به هر ۳ روش آزمون فعالیت آنتی‌اکسیدانی با هم، هم‌خوانی دارد و با توجه به نتایج، فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز است. با افزایش زمان هیدرولیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) افزایش یافت و میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی توسط آلکالاز به طور معنی‌داری ($p < 0.05$) بیشتر از آنزیم فلاورزایم بود.

حاضر را تأیید می‌کند (۱، ۲۳). دلیل این حالت را می‌توان در میزان فعالیت بیشتر آنزیم آلکالاز نسبت به آنزیم دیگر در نظر گرفت. همان‌طور که در بالا اشاره شد با افزایش مدت زمان هیدرولیز میزان درجه هیدرولیز افزایش پیدا کرده است که در چندین مطالعه این امر گزارش شده است. در مطالعاتی که توسط Khantaphant و همکاران (۲۰۱۱) بر روی پروتئین هیدرولیز شده عضله ماهی سرخوپهلو قهوه ای (*Lutjanus vitta*) (۱۹)، Klonopong و همکاران (۲۰۰۷) بر روی پروتئین هیدرولیز شده شانک زرد باله (*Selaroides leptolepis*) (۲۰) و Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) بر روی پروتئین هیدرولیز شده محصولات جانبی ساردین (*Mustelus mustelus*) (۹) انجام شده است گزارش شده است که با افزایش مدت زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد. دلیل این امر می‌تواند این باشد که در مدت زمان بیشتر فعالیت آنزیمی بیشتر صورت گرفته و باندهای پپتیدی مدت زمان بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند و دچار شکست بیشتر می‌شوند که حاصل شکست بیشتر باندهای پپتیدی نتیجه درجه هیدرولیز بیشتر را در پی دارد. نتایج مربوط به طول زنجیره پپتیدی نشان داد که به طور کلی با افزایش زمان هیدرولیز، طول زنجیره کاهش می‌یابد و این حالت در هر دو آنزیم مشابه می‌باشد و طول زنجیره پپتیدی توسط آلکالاز کمتر از آنزیم فلاورزایم بود. نتایج تحقیق حاکی از ارتباط بین طول زنجیره پپتیدی و درجه هیدرولیز می‌باشد. این یافته حاکی از آن است که با افزایش درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی کاهش پیدا می‌کند. محاسبه طول متوسط زنجیره با خواص عملکردی هیدرولیز تا حد زیادی تطابق دارد چرا که در شرایط هیدرولیز شدید پروتئین، خواص عملکردی ضعیف می‌شود و برای بروز خواص عملکردی مطلوب باید پپتیدها حداقل از ۲۰ اسید آمینه تشکیل شوند (۳۵). نتایج سایر محققین، نتایج تحقیق حاضر را تأیید می‌کند (۲۳، ۲۵). بازیافت پروتئینی یکی دیگر از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد

¹ - Endoproteinase

² - *Bacillus Licheniformis*

جدول ۴- فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده^۱

تیما	DPPH (%)	قدرت احیا کنندگی فریک	ABTS (%)
F ₁₀	47/71 ± 2/63 ^e	0/17 ± 0/002 ^e	53/35 ± 2/96 ^e
F ₂₀	59/04 ± 1/12 ^d	0/27 ± 0/023 ^d	57/17 ± 0/39 ^d
F ₃₀	63/85 ± 1/97 ^c	0/31 ± 0/004 ^c	62/91 ± 3/28 ^c
A ₁₀	62/91 ± 1/94 ^c	0/30 ± 0/002 ^c	62/88 ± 2/02 ^c
A ₂₀	79/05 ± 0/72 ^b	0/35 ± 0/003 ^b	74/04 ± 2/29 ^b
A ₃₀	88/88 ± 1/87 ^a	0/39 ± 0/003 ^a	86/83 ± 1/00 ^a

*همه اعداد بر حسب میانگین ± انحراف از معیار بیان شده اند

*اعداد در یک ستون با حروف متفاوت متفاوت معنی دار دارند (a, b, c, ...)

پپتیدهای آنتی اکسیدانی پروتئین های سارگوپلاسمیک کپور نقره ای با استفاده از روش سطح پاسخ صورت گرفت گزارش شد که با افزایش دما از ۵۲ درجه سانتی گراد به ۶۰ درجه سانتی گراد میزان حذف رادیکال آزاد افزایش یافت (۳۰). که این احتمالاً مربوط خصوصیات دمایی پروتئین های خام بستگی دارد و با افزایش دما انتقال گرما گیر افزایش می یابد. با افزایش دما ساختار پروتئین دچار شکست می شود و گروه های هیدروفوبیک و اهدا کننده ی پروتون در معرض قرار می گیرند و از این طریق در فعالیت آنتی اکسیدانی شرکت می کنند. قدرت احیا کنندگی فریک به طور کلی کاهش ظرفیت یون فریک (Fe^{3+}) را اندازه گیری می کند و با ظرفیت پاک کردن رادیکال های آزاد در ارتباط است (۶). نتایج مطالعه حاضر نشان داد، تمامی پروتئین های هیدرولیز شده دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشند و فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم آلکالاز بالاتر از فعالیت آنتی اکسیدانی آنزیم فلاورزایم بود. قدرت کاهش دگی برای تعیین توانایی ترکیبات در کاهش آهن (III) به آهن (II) مورد استفاده قرار می گیرد و به وسیله ی یک واکنش رنگ سنجی redox linked - تعیین می شود (۷). حضور آنتی اکسیدان در پروتئین های هیدرولیز شده باعث کاهش کمپلکس آهن (III) یا فریک سیانید به شکل آهن (II) می شود. با توجه به نتایج جدول ۴، پروتئین های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی بیاح دارای توانایی اهدای الکترون یا هیدروژن می باشند. که افزایش قدرت کاهش دگی نشان از افزایش اهدای الکترون یا هیدروژن می باشد (۲۹، ۳۴). قدرت

فعالیت رادیکال DPPH به طور گسترده ای برای سنجش توانایی ترکیبات برای به دام انداختن رادیکال های آزاد و یا اهدا کردن اتم هیدروژن و در مجموع به عنوان ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی مورد بررسی واقع شده است (۱۸). نتایج مطالعه حاضر نشان داد تمامی پروتئین های هیدرولیز شده دارای فعالیت آنتی اکسیدانی می باشد. آنتی اکسیدان ها می توانند با مکانیسم حذف رادیکال آزاد از واکنش های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار می باشد که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر نشان می دهد. هنگامی که رادیکال DPPH در معرض یک ماده ی الکترون دهنده از قبیل آنتی اکسیدان قرار می گیرد، رادیکال مهار خواهد شد و جذب کاهش می یابد (۷). در چندین مطالعه میزان حذف رادیکال آزاد DPPH پروتئین های هیدرولیز شده تولید شده بیش از ۵۰ درصد گزارش شده است (۹، ۳۷). همچنین در مطالعه حاضر با افزایش زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدان، افزایش یافت. در مطالعه ای که Fang و همکاران (۲۰۱۲) بر روی بهینه سازی تولید پروتئین های هیدرولیز شده پروتئین عضله اسکوتید با استفاده از روش سطح پاسخ انجام دادند، گزارش شد که هنگام افزایش دما از ۴۵ به ۵۱ درجه سانتی گراد میزان حذف رادیکال آزاد افزایش پیدا کرد و با افزایش مدت زمان هیدرولیز از ۳۰ دقیقه به ۵۱ دقیقه میزان حذف رادیکال آزاد افزایش ولی از ۵۱ دقیقه به ۶۰ دقیقه میزان حذف رادیکال آزاد کاهش نشان داد (۱۳). در تحقیقی که توسط Ren و همکاران (۲۰۰۸) بر روی بهینه سازی تولید

پپتیدها و رادیکال‌های آزاد، گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یون‌های فلزی قابل تغییر که منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود تأثیر مستقیم داشته باشد. ولی این بدان معنا نیست که پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ای که دارای مدت زمان بیشتر هستند، همیشه دارای ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری هستند. مطالعات متعددی بیانگر این موضوع می‌باشد که هیدرولیز گسترده می‌تواند باعث کاهش خواص آنتی اکسیدانی شود (۳۵). هیدرولیز گسترده باعث تولید بیش از حد اسیدآمین‌های آزاد می‌شود. در کل پپتیدها دارای پتانسیل آنتی اکسیدانی بهتری نسبت به اسیدهای آمینه به علت فعالیت حذف رادیکال آزاد و فعالیت کلاته کردن یون فلزی بیشتر می‌باشند. همچنین هیدرولیز گسترده نیز باعث می‌شود که اندازه‌ی پپتیدها بیش از حد کوچک شود. به خوبی پذیرفته شده است که پپتیدهای کوتاه مسئول بخش عمده‌ای از فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشند (۷) در بررسی انجام شده توسط یعقوب زاده و همکاران (۲۰۲۰)، گزارش شده است که پپتیدهای آنتی اکسیدانی دارای بعضی کلاته‌کننده‌های یون فلزی یا هیدروژن یا فعالیت الکترون دهنده‌گی می‌باشند، که به آنها اجازه واکنش با رادیکال‌های آزاد و محدود کردن واکنش زنجیره رادیکال یا جلوگیری از تشکیلشان را دهد (۳۵).

۳-۴- خاصیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده
نتایج مربوط به خاصیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده علیه باکتری اشرشیاکلی و استافیلوکوکوس اورئوس در جدول ۵ ارائه شده است. با افزایش زمان هیدرولیز خاصیت ضد میکروبی به طور معنی داری ($p < 0.05$) افزایش یافت.

احیاکنندگی فریک برای پروتئین‌های هیدرولیز شده، mackerel (*Scomber austriasicus*) (۳۴)، کپورنقره‌ای (*Hypophthalmichthys militrux*) (۱۱) و- Cuttlefish (*Sepia pharaonis*) (۶)، ماهی کیلکای آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) (۲۸) گزارش شده است. آزمایش رادیکال ABTS یک معیار عالی برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی می‌باشد و همچنین به عنوان معیاری برای پاک کردن ترکیبات هیدروفیلک و لیپوفیلک گزارش شده است. با توجه به نتایج مربوط به پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS و بالابودن فعالیت آنتی اکسیدانی، پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی بیاچ، قادر به پاک کردن رادیکال ABTS می‌باشد، در نتیجه از اکسیداسیون چربی از طریق واکنش زنجیره‌ای رادیکال جلوگیری می‌کند. پاک کنندگی رادیکال‌های آزاد ABTS برای پروتئین‌های هیدرولیز شده، mackerel (*Scomber austriasicus*) (۳۴)، کپورنقره‌ای (*Hypophthalmichthys militrux*) (۱۱) و ماهی مرکب (*Sepia pharaonis*) (۶)، تیلاپای نیل (*Oreochromis niloticus*) (۱۸)، کیلکای آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) (۲۸) گزارش شده است. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده وابسته به پروتئین و شرایط هیدرولیز شده به کار گرفته شده می‌باشد (۷). در طی هیدرولیز طیف گسترده‌ای از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد بسته به ویژگی‌های آنزیم تولید می‌شوند. تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر روی فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیر می‌گذارد (۲۹). مدت زمان هیدرولیز ممکن است در افزایش شکست گروه‌هایی که باعث تسهیل واکنش میان

جدول ۵- حداقل غلظت بازدارندگی و حداقل غلظت کشندگی پروتئین هیدرولیز شده^۱ (بر حسب ppm)

تیمار	اشرشیاکلی (MIC)	اشرشیاکلی (MBC)	استافیلوکوکوس (MIC)	استافیلوکوکوس (MBC)
F ₁₀	۱۰۰۶/۶۲±۲۴/۵۷ ^a	۱۲۵۵/۱۹±۶۷/۵۷ ^a	۷۷۴/۰۷±۲۱/۴۰ ^a	۹۴۸/۴۳±۴۴/۳۹ ^a
F ₂₀	۷۵۵/۴۱±۱۳/۹۰ ^b	۱۰۲۸/۵۷±۴۰/۲۰ ^b	۶۵۰/۷۴±۰/۷۱ ^b	۷۲۹/۹۳±۲۱/۶۰ ^b
F ₃₀	۵۵۱/۸۰±۹/۳۹ ^c	۸۵۹/۸۷±۲۰/۱۹ ^c	۴۷۷/۷۱±۳/۵۳ ^c	۵۲۸/۳۹±۲۰/۰۶ ^c
A ₁₀	۵۳۳/۹۲±۱۱/۳۹ ^c	۸۴۰/۷۳±۰/۶۷ ^c	۴۶۴/۲۳±۱۶/۹۴ ^c	۵۲۴/۲۵±۱۴/۰۹ ^c
A ₂₀	۳۶۶/۴۸±۲۹/۰۱ ^d	۵۳۴/۷۷±۲۹/۰۵ ^d	۲۹۱/۹۵±۹/۱۹ ^d	۳۴۵/۷۶±۷/۷۹ ^d
A ₃₀	۲۱۵/۴۱±۵/۸۷ ^e	۲۹۰/۶۸±۴/۹۹ ^e	۱۵۶/۱۰±۱/۷۱ ^e	۲۱۸/۹۰±۰/۷۷ ^e

^a همه اعداد بر حسب میانگین ± انحراف از معیار بیان شده اند

^a اعداد در یک ستون با حروف متفاوت متفاوت اختلاف معنی دار دارند (a, b, c, ...)

متعدد بیان نموده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات ضد باکتریایی حساس تر هستند و این حساسیت بالای باکتری‌های گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی است که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی جلوگیری به عمل آورد (۱۰). مقاومت باکتری‌های گرم منفی در برابر مواد ضد باکتریایی با سطح هیدروفیلی غشای خارجی باکتری‌ها که غنی از مولکول‌های لیپوبلی ساکارید است و یک حائل در برابر نفوذ مولکول‌های آنتی بیوتیکی مختلف ایجاد می‌کند و نیز با آنزیم‌های فضای پری پلاسمی که قادر به شکستن مولکول‌های وارد شده از خارج هستند نیز در ارتباط می‌باشد. باکتری‌های گرم مثبت چنین غشای خارجی در ساختار دیواره سلولی ندارند. برخی از آنتی بیوتیک می‌توانند به آسانی دیواره سلول باکتریایی و غشای سیتوپلاسمی را تخریب نموده و منجر به خروج سیتوپلاسم آن گردند (۵).

۴- نتیجه گیری

در تحقیق حاضر اثر دو آنزیم تجاری پروتاز (آلکالاز و فلاورزایم) روی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی بیاح در زمان‌های هیدرولیز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از میان آنزیم‌های مورد بررسی، آنزیم آلکالاز می‌تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی کوتاهتر و بازیافت پروتئینی بالاتری تولید کند. همچنین نتایج نشان داد، پروتئین هیدرولیز شده در زمان ۳۰ دقیقه از درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی بیشتری برخوردار است. پروتئین هیدرولیز شده از فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بالایی نیز برخوردار بوده است، طبق بررسی‌های صورت گرفته در این تحقیق پروتئین‌های هیدرولیز شده ی تولیدی دارای خاصیت حذف رادیکال آزاد DPPH قابل ملاحظه و میزان قدرت کاهندگی قابل قبولی بودند. همچنین از نتایج بر می‌آید که افزایش زمان هیدرولیز باعث افزایش فعالیت حذف رادیکال آزاد شد. همچنین بالاترین فعالیت ضد میکروبی

یکی از معیارهایی که به وسیله بیشتر محققین جهت اندازه‌گیری فعالیت ضد باکتریایی عوامل ضد میکروب استفاده می‌گردد، اندازه‌گیری حداقل غلظت مهارکنندگی و حداقل غلظت کشندگی می‌باشد (۳۱). نتایج مربوط به خاصیت ضد میکروبی علیه هر دو باکتری با هم، هم خوانی دارد و با توجه به نتایج، خاصیت ضد میکروبی به طور معنی‌داری تحت تاثیر نوع آنزیم و زمان هیدرولیز است. نتایج مطالعه حاضر نشان دهنده خاصیت ضد میکروبی بالای پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز می‌باشد. ویژگی مشترک اکثر پپتیدهای آنتی میکروبی^۱ دارا بودن ساختمان آلفا هلیکس است و این ساختمان احتمالاً به دلیل قرارگیریشان در کانال یونی غشای باکتری و تغییر نفوذ پذیری و به دنبال آن شکستن سلول باکتری است (۵) مکانیسم دفاعی AMPs به طور عمده به ۳ قسمت عمده تقسیم می‌شود.

۱- پپتیدها به غشای باکتری باند می‌شوند و سوراخ‌های غیر قابل برگشتی ایجاد می‌کنند و یا غشای باکتری را از بین می‌برند و باعث جریان یافتن سیتوپلاسم می‌شوند. این شیوه که غشا مختل شده^۲ نام دارد باعث نابودی کامل باکتری‌ها می‌شود.

۲- پپتیدها از بین غشای باکتری عبور می‌کنند و با باند شدن با ترکیبات داخل سلولی از رشد باکتری جلوگیری می‌کنند که این روش غشا غیر مختل شده^۳ نامیده می‌شود.

۳- پپتیدهایی که به صورت غیر مختل شده^۴ در مقابل باکتری‌ها فعالیت می‌کنند غنی از اسید آمینه آرژنین - پرولین هستند، با توجه به عملکرد آنزیم آلکالاز برای شکستن زنجیره پروتئینی که از موقعیت آرژنین - لیزین اسید آمینه را می‌شکند می‌توان وجود اسیدهای آمینه غنی از آرژنین را در پپتیدها محتمل دانست. همچنین با توجه به نتایج، باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس مقاومت پایین تری نسبت به باکتری اشرشیاکلی (گرم منفی) دارا بود. گزارشات

^۱ - AMPs

^۲ - Membrane - Disruptive

^۳ - Membrane - Non - Disruptive

^۴ - Non - Disruptive

کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی

شیلات ایران. دوره ۲۸، شماره ۲، ۱۱۷-۱۲۸.

6. Aewsiri, T., Benjakul, S., Visessanguan, W., Eun, J.B., Wierenga, P., Gruppen, H. 2009. Antioxidative activity and emulsifying properties of cuttlefish skin gelatin modified by oxidised phenolic compounds. *Food Chemistry*, 117: 160-168.
7. Aleman, A., Gimenez, B., Perez-Santin, E., Gomez-Guillen, M., Montero, P. 2011. Contribution of Leu and Hyp residues to antioxidant and ACE-inhibitory activities of peptide sequences isolated from squid gelatin hydrolysate. *Food Chemistry*, 125: 334-341.
8. Benjakul, B. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45: 34-24.
9. Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M. 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, 114: 1198-1205.
10. Bozin, B., Mimica-Dukic, N., Samojlik, I., Jovin, E. 2007. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55: 7879-7885.
11. Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y., Yang, H. 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107: 1485-1493.
12. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., Shamasundar, B. A. 2014. Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*Catla catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3): 1207-1214.

توسط آنزیم آلکالاز در در زمان ۳۰ دقیقه مشاهده شد و فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده نسبت باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس بالاتر از باکتری اشرشیاکلی (گرم منفی) بود. در نهایت می‌توان گفت که پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی بیاح به وسیله آنزیم آلکالاز دارای خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی مناسب می‌باشد و در صورتی که از نظر زیستی و ایمنی برای انسان بی‌ضرر باشد و مطالعات کلینیکی آن را تایید کند می‌تواند به عنوان یک افزودنی در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار گیرد.

۵-منابع

۱. اویسی پور، م.، عابدیان کناری، ع. م.، معتمدزادگان، ع.، نظری، ر. م. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم های تجاری. نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران، دوره ۶، شماره ۱، ۷۶-۶۸.
۲. اویسی پور، م.، قمی، م. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن.
۳. بی نام. ۱۳۵۰. گوشت و فرآورده های آن، اندازه گیری چربی، مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، استاندارد ملی ایران، شماره ۷۴۲.
۴. شکرپور، ر.، معتمدزادگان، ع.، حسینی پرور، ه.، اویسی پور، م. ۱۳۹۵. بررسی خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*). نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، دوره ۵، شماره ۱، ۳۸-۲۷.
۵. یعقوبزاده، ز.، کابوسی، ح.، پیروی قادیکالایی، ف.، صفری، ر.، فتاحی، ا. ۱۳۹۸. بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلائی رنگین

- Production, biochemical and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40:43-81.
22. Morr, C.V., German, B., Kinsella, J.-E., Regenstein, J.M., Buren, J.V., Kilara, A., Lewis, B.A. and Mangino, M.E. 1985. A collaborative study to develop a standardized food protein solubility procedure. *Journal of Food Science*, 50(6):1715-1718.
 23. Nemati, M., Javadian, S.R., Ovissipour, M. and Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal*, 18 (7): 950-956.
 24. Nikoo, M., Benjakul, S. and Xu, X. 2015. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry*, 181: 295–303.
 25. Nikoo, M., Benjakul, S., Ehsanid, A., Jing Lib, F.W., Yangb, N., Xue, B., Jina, Z. and Xua, X. 2014. Antioxidant and cryoprotective effects of a tetrapeptide isolated from Amur sturgeon skin gelatin. *Journal of Functional Foods*, 7: 609–620.
 26. Oosterveer, P. 2008. Governing global fish provisioning: Ownership and management of marine resources. *Ocean and Coastal Management*, 51: 797–805.
 27. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238–242.
 28. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1718–1726.
 29. Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M. and Rafieian-Kopaei, M.
 13. Fang, X., Xie, N., Chen, X., Yu, H., Chen, J. 2012. Optimization of antioxidant hydrolysate production from flying squid muscle protein using response surface methodology. *Food and Bioproducts Processing*, 90: 676-682.
 14. Grisi, T C. and Lira, K G. 2005. Action of nisin and high ph on growth of *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. in pure culture and the meat of land crab (*Ucides cordatus*). *Brazilian Journal of Microbiology*, 36: 151-156.
 15. Horwitz, W. 2010. Official methods of analysis of AOAC International. Volume I, agricultural chemicals, contaminants, drugs/edited by William Horwitz. Gaithersburg (Maryland): AOAC International, 1997.
 16. Hoyle, N.T. and Merritt, J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59(1):76-79.
 17. Jang, H.L., Liceaga, A.M., Yoon, K.Y. 2016. Purification, characterization and stability of an antioxidant peptide derived from sandfish (*Arctoscopus japonicas*) protein hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 20: 433–442.
 18. Kelfala Foh, M.B., Amadou, I., Mabel Foh, B., KamaraM.T. and Xia, W. 2010. Functionality and Antioxidant Properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) as Influenced by the Degree of Hydrolysis. *International Journal of Molecular Science*, 11: 1851-1869.
 19. Khantaphant, S., Benjakul, S. and Ghomi, M.R. 2011. The effects of pretreatments on antioxidative activities of protein hydrolysate from the muscle of brownstripe red snapper (*Lutjanus vitta*). *Food Science and Technology*, 44: 1139-1148.
 20. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. 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 Chemistry*, 102(4): 1317-1327.
 21. Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates:

- Agricultural and Food Chemistry*, 58: 1202–1207.
34. 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: 949-957.
 35. Yaghoub zadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., Fattahi, E. 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate, *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26:625–632.
 36. Zhang, M., Mu, T.H. and Sun, M.J. 2014. Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, 7: 191–200.
 37. Zhong, S., Ma, Ch., Lin, Y.C. and Luo, Y. 2011. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 126: 1636-1642.
 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 55:e18304, 1-10.
 30. Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, Ch., Kakuda, Y. and Jun Xue, S. 2008. Optimization of antioxidant peptide production from grass carp sarcoplasmic protein using response surface methodology. *Food Science and Technology*, 41: 1624-1632.
 31. Sacchetti, G. 2005. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. *Food Chemistry*, 91: 621-632.
 32. Salampessy, J., Reddy, N., Kailasapathy, K. and Phillips, M. 2015. Functional and potential therapeutic ACE-inhibitory peptides derived from bromelain hydrolysis of trevally proteins. *Journal of Functional Foods*, 14: 716–725.
 33. Sheih, I., Fang, T., Wu, T. and Lin, P. 2010. Anticancer and antioxidant activities of the peptide fraction from algae protein waste. *Journal of*

(Original Research Paper)

Evaluation of Antibacterial and Antioxidant Activities of *Liza abu* Viscera Protein Hydrolysate

Seyyed Rasoul Shah Hosseini¹, Seyyed Rohollah Javadian^{2*}, Reza Safari³

1-Department of Food Science and Technology, Nour Branch, Islamic Azad University, Nour, Iran.

2- Department of Fisheries, Qaemshahr Branch, Islamic Azad University, Qaemshahr, Iran.

3- Caspian Sea Ecology Research Institute, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research Education and Extension Organization, Sari, Iran.

Received:30/07/2020

Accepted:14/10/2020

Abstract

In the present study, Antioxidant and antimicrobial activities of protein hydrolysates from viscera of *Liza abu* by products were investigated. Hydrolysis was performed at three different times (10, 20 and 30 min), using commercial enzyme alcalase and flaverzyme and an enzyme to substrate ratio of 1% meat protein at 50°C. The results indicated that, Protein recovery and degree of hydrolysis increased with increasing incubation time (P<0.05) and the protein hydrolysate from alcalase had the highest protein recovery and degree of hydrolysis (P<0.05). The highest antioxidant activity (DPPH radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power and ABTS radical scavenging activity) and the highest antimicrobial activity of protein hydrolyzed against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were observed in protein hydrolysates with alcalase after 30 min (P<0.05). The results revealed that *Liza abu* by product hydrolysates have high antioxidant and antimicrobial activity, which may be useful ingredients in food and formulated diets applications.

Keywords: *Liza abu*, Protein Hydrolysates, Commercial Enzymes, Antioxidant Activity, Antibacterial Activity

*Corresponding Author: ro.javadian@gmail.com