

“Research article”

DOI: 10.30495/JFH.2022.1940567.1326

Evaluation of the relationship of molecular weight of bioactive peptides resulting from enzymatic hydrolysis of Vanami shrimp (*Litopenaeus vannamei*) head and shell with their antibacterial, antioxidant and functional properties

Reyhani Poul, S.^{1*}, Yeganeh, S.², Safari, R.³

1. Ph.D Graduate, Department of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran
 2. Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
 3. Assistant Professor, Caspian Sea Ecology Research Institute, Sari, Iran
- *Corresponding author: Soheylreyhani@gmail.com
(Received: 2021/10/7 Accepted: 2021/12/01)

Abstract

The current research aimed to determine the relationship between the molecular weight of bioactive peptides produced from Vanami shrimp wastes with their antibacterial, antioxidant activity, and functional properties. For this purpose, after performing the hydrolysis process, using ultrafiltration, peptides with a molecular weight of less than 3, between 3 and 10, and more than 10 kDa were separated and used for various tests. According to the results, peptides with a molecular weight of 3 to 10 kDa showed the highest growth inhibitory activity of *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, and *Staphylococcus aureus* ($p < 0.05$). The highest solubility and water holding capacity were related to peptides with molecular weight less than 3 kDa ($p < 0.05$). Among different molecular weights, the maximum emulsifying activity and emulsion stability indices were measured in peptides with a molecular weight between 3 and 10 kDa ($p < 0.05$). The strongest peptides in terms of foaming activity and foam stability index as well as oil absorption capacity were peptides with a molecular weight of more than 10 kDa ($p < 0.05$). The results of the evaluation of the antioxidant activity (Free radical scavenging activity of DPPH and ABTS) of peptides showed peptides with a molecular weight of less than 3 kDa have the highest antioxidant properties ($p < 0.05$). It was concluded that the properties of bioactive peptides change considerably under the influence of molecular weight and each of the peptides in a particular molecular weight has more properties and efficiency.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Shrimp wastes, Bioactive peptides, Molecular weight, Antibacterial activity

«مقاله پژوهشی»

DOI: 10.30495/JFH.2022.1940567.1326

ارزیابی رابطه وزن مولکولی پپتیدهای زیست‌فعال حاصل از آبکافت آنزیمی سر و پوسته میگوی وانامی (*Litopenaeus vannamei*) با خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و عملکردی آنها

سهیل ریحانی پول^{۱*}، سکینه یگانه^۲، رضا صفری^۳

۱. دانش‌آموخته دکتری تخصصی، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲. استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳. استادیار، پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: (Soheylreyhani@gmail.com)

(دریافت مقاله: ۱۴۰۰/۷/۱۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۰/۹/۱۰)

چکیده

هدف از تحقیق حاضر تعیین رابطه وزن مولکولی پپتیدهای زیست‌فعال تولیدشده از ضایعات میگوی وانامی با فعالیت آنتی‌باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی آنها بود. به این منظور پس از انجام فرایند آبکافت، با استفاده از اولترافیلتراسیون، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳، بین ۳ تا ۱۰ و بیش از ۱۰ کیلودالتون تفکیک و جهت انجام آزمون‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفتند. مطابق نتایج، پپتیدهایی با وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلودالتون بالاترین فعالیت مهارکنندگی رشد باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* را بروز دادند ($P < 0/05$). بیشترین میزان حلالیت و ظرفیت نگهداری آب مربوط به پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون بود ($P < 0/05$). در بین وزن‌های مولکولی مختلف، حداکثر شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون در پپتیدهایی با وزن مولکولی بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون اندازه‌گیری شد ($P < 0/05$). کاراترین پپتیدها از نظر شاخص فعالیت کف‌زایی و پایداری کف و همچنین ظرفیت جذب روغن، پپتیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون بودند ($P < 0/05$). نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS) پپتیدها نشان داد پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون دارای بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی هستند ($P < 0/05$). از یافته‌های این پژوهش می‌توان نتیجه گرفت خواص پپتیدهای زیست‌فعال شدیداً تحت تأثیر وزن مولکولی تغییر می‌کند و هر کدام از پپتیدها در یک وزن مولکولی خاص دارای بیشترین خاصیت و کارایی هستند.

واژه‌های کلیدی: ضایعات میگو، پپتیدهای زیست‌فعال، وزن مولکولی، فعالیت ضد باکتریایی

مقدمه

از جمله راه‌های تولید محصولات با ارزش افزوده از ضایعات آبزیان، تولید پپتیدهای زیست‌فعال از آنهاست. با استفاده از آنزیم‌های تجاری میکروبی، گیاهی و حیوانی می‌توان ضایعات آبزیان را آبکافت و پپتیدهای مذکور را تولید کرد (Reyhani Poul *et al.*, 2018). پپتیدهای زیست‌فعال که ۲ تا ۲۰ اسیدآمینه دارند، در ساختار پروتئین اصلی غیرفعال هستند (Park *et al.*, 2001) و پس از مصرف توسط انسان اثرات ضد فشار خون، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدان، کاهندگی کلسترول بر بدن اعمال می‌کنند (Sun *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2010). این پپتیدها در صنعت غذا به‌عنوان آنتی‌اکسیدان، امولسیفایر و کفزا مطرح هستند (Reyhani Poul and Jafarpour, 2017; Taheri *et al.*, 2013). میزان مطلوبیت خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پپتیدها در تعیین نوع کارایی آنها در صنایع پزشکی و غذایی مؤثر است. عوامل مختلفی مانند نوع سوپسترا، نوع آنزیم (Reyhani Poul *et al.*, 2018; Elavarasan *et al.*, 2014)، شرایط واکنش آبکافت (دما، زمان، pH) بر خواص مذکور تأثیرگذار هستند. عامل دیگری که می‌تواند بر خواص پپتیدهای زیست‌فعال مؤثر واقع گردد، وزن مولکولی آنهاست. با توجه به صادرات حجم بالایی از میگوی صیدشده و پرورشی به کشورهای مختلف، مراکزی در شمال و جنوب کشور این سخت‌پوست را فرآوری و بسته‌بندی می‌کنند که در نتیجه (فعالیت آنها) مقادیر زیادی از ضایعات محتوی پروتئین تولید می‌شود. این ضایعات از طریق تکنیک آبکافت قابل تبدیل به محصولاتی با ارزش افزوده بالا مانند پروتئین‌های آبکافتی (پپتیدهای زیست-

فعال) و سیلاژ هستند. تحقیق حاضر قصد دارد در مرحله اول ضایعات میگوی وانامی را با استفاده از روش آنزیمی آبکافت و پپتیدهایی در سه وزن مختلف تولید کند. سپس رابطه وزن مولکولی پپتیدهای زیست‌فعال را با خواص ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و عملکردی آنها بررسی کند.

مواد و روش‌ها

ضایعات میگوی وانامی از یکی از کارگاه‌های فرآوری و بسته‌بندی این آبزی در استان گلستان تهیه و در مجاورت زنجیره سرد پس از گذشت حدود سه ساعت به پایلوت فرآوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل شد. آنزیم مورد استفاده در تحقیق حاضر، آنزیم میکروبی نئوتراز (نووژایم، دانمارک) با میزان فعالیت ۰/۸ واحد آنسون به ازای یک میلی‌لیتر آنزیم بود. به منظور ارزیابی فعالیت ضد میکروبی پپتیدها از باکتری‌های *باسیلوس سرئوس*، *اشریشیا کولای* و *استافیلوکوکوس اورئوس* (سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران، تهران) استفاده شد. محیط کشت آگار مغذی (Nutrient agar) و آبگوشت مغذی (Nutrient broth) از شرکت بیولب هندوستان تهیه گردیدند.

تولید پپتیدهای زیست‌فعال و تفکیک آنها برحسب وزن مولکولی

تولید پپتیدهای زیست‌فعال از سوپسترای سر و پوسته میگوی وانامی با استفاده از آنزیم نئوتراز به میزان ۳۰ واحد آنسون (در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴) انجام گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009). جداسازی پپتیدها (بر اساس وزن مولکولی) با استفاده از

- فعالیت ضد باکتریایی پپتیدها (مهارکنندگی) فعالیت مهارکنندگی پپتیدها به روش ریزرقت مورد ارزیابی قرار گرفت. ابتدا ۶۰۰ میکرولیتر کشت باکتریایی در لوله آزمایش وارد شد. سپس ۱۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت مغذی استریل و ۱۲۰۰ میکرولیتر محلول حاوی پپتیدهای زیست فعال استریل که با فیلتر سرنگی ۰/۲ میکرومتری فیلتر شده بود، به لوله آزمایش اضافه گردید. در مرحله بعد لوله آزمایش در شرایط استریل در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۲۰ ساعت انکوبه شد و کدورت چاهک‌ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر ثبت گردید. با مقایسه جذب و پال‌های تیمار و شاهد (حاوی آب مقطر استریل)، اثر ضد میکروبی محلول حاوی پپتید زیست فعال از رابطه ۱ محاسبه گردید. در این رابطه As، جذب نمونه هدف و Ac جذب شاهد است (Wald et al., 2017).

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{فعالیت مهارکنندگی} = [1 - (As/Ac)] \times 100$$

مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک انکوبه و متعاقب جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر قرائت گردید. سرانجام قدرت پپتیدهای زیست فعال برای مهار رادیکال DPPH با استفاده از رابطه ۲ محاسبه و به صورت IC₅₀ گزارش شد (Yen and Wu, 1999).

$$\text{رابطه ۲} \quad 100 \times (\text{جذب شاهد} / \text{جذب نمونه}) = \text{قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH}$$

اولترافیلتراسیون با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی ۳ و ۱۰ کیلودالتون و سانتریفیوژ (Sigma 2-16kl) نمونه‌ها با دور ۷۵۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵ درجه سلسیوس انجام شد (Yaghoubzadeh et al., 2021).

بررسی فعالیت ضد باکتریایی پپتیدها

- آماده‌سازی کشت‌های میکروبی

باکتری‌های باسیلوس سرئوس، اشریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس از کشت ذخیره به پلیت‌های آگار مغذی منتقل و سپس به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس انکوبه شدند. سپس سلول‌های باکتریایی به محیط آبگوشت مغذی انتقال داده شده و مجدداً به مدت ۲۰ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری شدند تا باکتری‌ها وارد فاز رشد لگاریتمی شوند. از این سلول‌های میکروبی در آزمایش‌های تعیین فعالیت ضد میکروبی پپتیدها استفاده گردید (Wald et al., 2017).

سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال - قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH)

پپتیدهای زیست فعال با غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در آب حل شدند. سپس ۱/۵ میلی‌لیتر از پپتیدهای محلول به ۱/۵ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار رادیکال DPPH در اتانول ۹۹/۵۰ اضافه گردیدند. محلول حاصل با سرعت بالا هموژن شد و به

بعد ۲۰ میکرولیتر نمونه (پپتیدهای زیست فعال با غلظت‌های ۲، ۴ و ۶ میلی گرم در میلی لیتر) با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق ABTS ترکیب و ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. فعالیت مهار رادیکال ABTS بر اساس رابطه ۳ تعیین و به صورت IC₅₀ گزارش گردید (Alemán *et al.*, 2011).

رابطه ۳) $100 \times \frac{\text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه}} = \text{قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS (درصد)}$

سپس ۱۵ دقیقه با دور ۷۵۰۰ g سانتریفوژ گردید. پروتئین محلول در سوپرناتانت از روش بیورت و پروتئین موجود در نمونه بعد از حل شدن آن در سود ۰/۵ نرمال تعیین شد (Reyhani Poul *et al.*, 2018). حلالیت پپتیدهای زیست فعال با استفاده از رابطه ۴ به دست آمد.

رابطه ۴) $100 \times \frac{\text{پروتئین کل نمونه}}{\text{میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت}} = \text{حلالیت (درصد)}$

از هموژن کردن برداشته و با ۵ میلی لیتر محلول سدیم دوسیل سولفات ۰/۱ درصد مخلوط شد. جذب این محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون پپتیدها با استفاده از روابط ۵ و ۶ محاسبه شدند (Pearce and Kinsella, 1978).

$$\text{EAI (m}^2/\text{g)} = 2 \times 2.303 \times A_{500} / 0.25 \times \text{Protein weight (g)}$$

رابطه ۵

$$\text{ESI (min)} = A_{10} \times \Delta t / \Delta A$$

رابطه ۶

- فعالیت مهار رادیکال ۲،۲-آزینو- بیس- ۳- اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS) ابتدا محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای اتاق (محیط تاریک) نگهداری شد. سپس محلول تا رسیدن به میزان جذب 0.07 ± 0.02 در طول موج ۷۳۴ نانومتر با آب مقطر رقیق شد. در مرحله

بررسی خواص عملکردی پپتیدهای زیست فعال

- حلالیت

برای تعیین حلالیت، ۲۰۰ میلی گرم پپتید با ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه مخلوط شد. با استفاده از اسید و سود ۰/۲ نرمال، pH محلول به ۲، ۴، ۶، ۸، ۱۰ و ۱۲ رسانده شد. این مخلوط ۳۰ دقیقه در دمای اتاق هم زده و

- شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی

برای محاسبه این شاخص‌ها، ابتدا ۱۰ میلی لیتر روغن گیاهی به ۳۰ میلی لیتر محلول یک درصد پپتیدهای زیست فعال اضافه و مخلوط حاصل با هموژنایزر به مدت یک دقیقه با چرخش ۲۰۵۰۰ دور در دقیقه به صورت کامل هموژن شد و یک امولسیون به دست آمد. سپس به کمک سمپلر حجم ۵۰ میکرولیتر از ته ظرف حاوی امولسیون در دو زمان صفر و ۱۰ دقیقه بعد

دور در دقیقه در دمای اتاق و همراه با ترکیب شدن با هوا، به مدت دو دقیقه هموژن شد. نمونه به سرعت به سیلندره‌های ۳۰۰ میلی‌لیتری منتقل و حجم مخلوط پس از ۳۰ ثانیه قرائت شد (Taheri et al., 2013). درصد ظرفیت کف‌کنندگی از رابطه ۷ محاسبه گردید.

رابطه ۷) $100 \times \frac{\text{حجم نمونه قبل از هم زدن}}{\text{حجم نمونه قبل از هم زدن} - \text{حجم نمونه بعد از هم زدن}}$ = فعالیت کف‌زایی (درصد)

شاخص پایداری کف به صورت درصد بیان و از طریق رابطه ۸ محاسبه گردید.

$100 \times \frac{\text{حجم نمونه قبل از هم زدن}}{\text{حجم نمونه قبل از هم زدن} - \text{حجم نمونه بعد از قرارگیری در دمای } 20}$ = پایداری کف (درصد)

گرم پپتید) از اختلاف حجم سوپرناتانت و حجم اولیه آب محاسبه شد (Reyhani Poul et al., 2018).

- تجزیه و تحلیل آماری
در پژوهش حاضر (در قالب طرح کاملاً تصادفی) از آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) و آزمون دانکن (در سطح اطمینان ۹۵ درصد) برای تجزیه و تحلیل داده‌ها استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS (نسخه ۲۲) برای آنالیز داده‌ها و نرم‌افزار EXCEL جهت رسم جدول‌ها و شکل‌ها استفاده گردید.

یافته‌ها

فعالیت ضد باکتریایی پپتیدهای زیست‌فعال در جدول (۱) فعالیت مهارکنندگی پپتیدهای متفاوت از نظر وزن مولکولی ارائه شده است. پپتیدهایی با وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلوالتون به صورت معنی‌داری

در رابطه ۵ و ۶، A_{500} جذب نمونه در زمان صفر، A_{10} جذب نمونه در زمان ۱۰ دقیقه، Δt برابر ۱۰ دقیقه و ΔA برابر اختلاف بین A_{500} و A_{10} است.

- شاخص فعالیت کف‌کنندگی و پایداری کف

مقدار ۲۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد پپتیدهای زیست‌فعال با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۳۵۰۰

نمونه هم زده‌شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سلسیوس قرار داده و حجم نمونه یادداشت شد.

رابطه ۸)

- ظرفیت جذب روغن

به ۰/۵ گرم پپتید، ۱۰ میلی‌لیتر روغن ذرت اضافه شد. مخلوط به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه گردید و هر ۱۰ دقیقه، ۳۰ ثانیه هم زده شد و مدت ۲۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰ g سانتریفوژ و سپس سوپرناتانت وزن گردید. جذب چربی به صورت میلی‌لیتر چربی در گرم پپتید گزارش شد. چسبندگی روغن به لوله آزمایش از قبل حساب شد (Shahidi et al., 1995).

- ظرفیت نگهداری آب

مقدار ۰/۲ گرم پپتید با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و در دمای ۲۲ درجه به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با خم کردن لوله آزمایش (زاویه ۴۵ درجه) به مدت ۱۰ دقیقه تخلیه شد. ظرفیت نگهداری آب (میلی‌لیتر آب نگهداری‌شده در

($P < 0/05$) نسبت به سایر وزن‌ها فعالیت مهارکنندگی بیشتری در برابر سه باکتری شاخص دارند. پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون نسبت به پپتیدهایی با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون دارای فعالیت مهارکنندگی بیشتری بودند؛ گرچه این دو پپتید در برابر باسیلوس سرئوس قدرت مهارکنندگی تقریباً برابری نشان دادند ($P > 0/05$).

جدول (۱) - فعالیت مهارکنندگی (میانگین \pm انحراف معیار) رشد پپتیدهای زیست‌فعال در وزن‌های مولکولی مختلف

خاصیت مهاری (درصد)			وزن مولکولی پپتید
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	
۴/۸۸ \pm ۰/۵۹ ^c	۹/۲۶ \pm ۱/۶۸ ^b	۱۸/۵۳ \pm ۲/۸۶ ^c	کمتر از ۳ کیلودالتون
۲۸/۷۵ \pm ۱/۱۴ ^a	۴۰/۱۲ \pm ۲/۹۶ ^a	۵۵/۲۱ \pm ۳/۰۵ ^a	۳ تا ۱۰ کیلودالتون
۱۵/۴۷ \pm ۱/۸۲ ^b	۱۰/۳۳ \pm ۳/۴۵ ^b	۳۴/۹۲ \pm ۱/۶۴ ^b	بیش از ۱۰ کیلودالتون

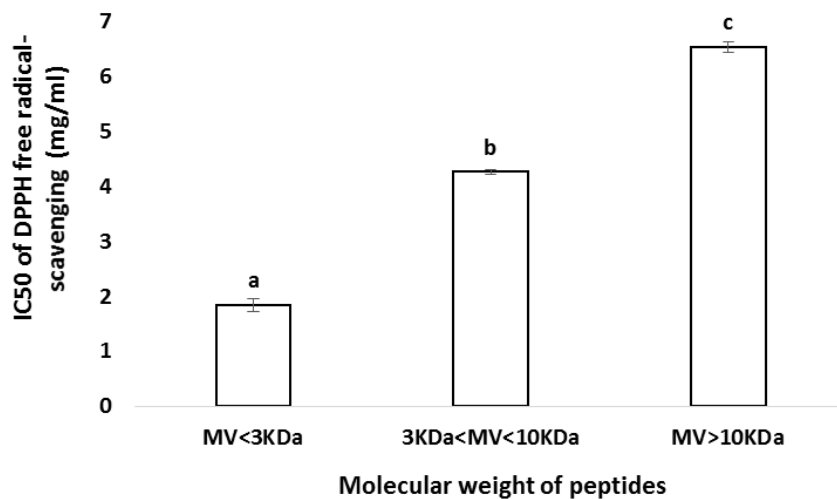
a, b, c: حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($P < 0/05$).

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال

- فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH

همچنین پپتیدهایی با وزن مولکولی بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون ($4/26 \pm 0/05$) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) نسبت به پپتیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون ($6/53 \pm 0/09$) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در زمینه مهار رادیکال‌های آزاد DPPH فعال‌تر هستند ($P < 0/05$).

نمودار (۱) فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH پپتیدهای زیست‌فعال را نشان می‌دهد. مطابق این نمودار کمترین IC_{50} (بیشترین فعالیت مهار) مربوط به پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون ($1/84 \pm 0/11$) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) است ($P < 0/05$).



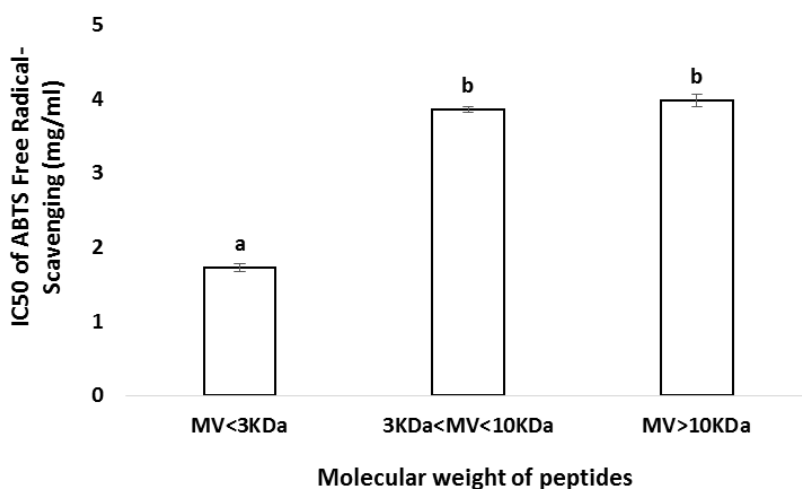
نمودار (۱) - IC_{50} مهار رادیکال‌های آزاد DPPH پپتیدهای زیست‌فعال با وزن‌های مولکولی مختلف

a, b, c: حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($P < 0/05$).

میلی لیتر) IC_{50} هستند ($P < 0/05$). پپتیدهایی با وزن بین ۳ تا ۱۰ و بیش از ۱۰ کیلودالتون از نظر فعالیت مهار رادیکال ABTS اختلاف معنی داری ندارند ($P > 0/05$).

- فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS

در نمودار (۲) غلظتی از پپتیدها که برای مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد ABTS لازم است، ارائه شده است. مطابق این یافته‌ها، پپتیدهای با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون دارای کمترین ($1/72 \pm 0/05$ میلی گرم بر



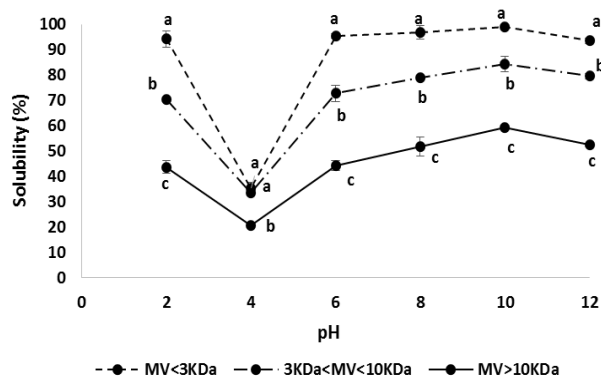
نمودار (۲) - IC_{50} مهار رادیکال‌های آزاد ABTS پپتیدهای زیست‌فعال با وزن‌های مولکولی مختلف
a,b: حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی دار بین داده‌ها است ($P < 0/05$).

مذکور مربوط به پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون است ($P < 0/05$). در $pH=4$ پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون و پپتیدهایی با وزن بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون با یکدیگر اختلاف معنی داری نداشتند ($P > 0/05$). در تمام pHها حداقل میزان حلالیت در پپتیدهایی با وزن بیشتر از ۱۰ کیلودالتون ثبت شد ($P < 0/05$).

خواص عملکردی پپتیدهای زیست‌فعال

- حلالیت

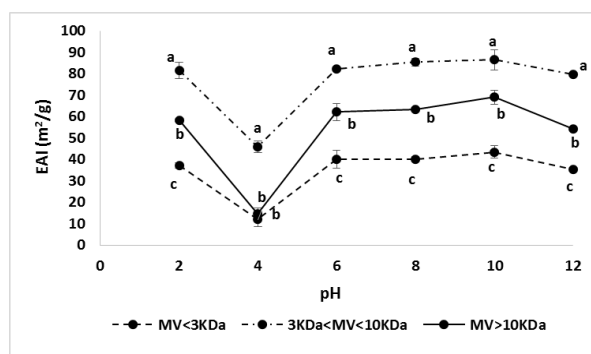
نمودار (۳)، حلالیت پپتیدهای متفاوت (از نظر وزن مولکولی) را در pHهای مختلف نشان می‌دهد. مطابق این نمودار در تمام pHهای مورد بررسی به غیر از ۴، هر سه نوع پپتید از نظر میزان حلالیت با یکدیگر اختلاف معنی داری دارند و بیشترین میزان شاخص



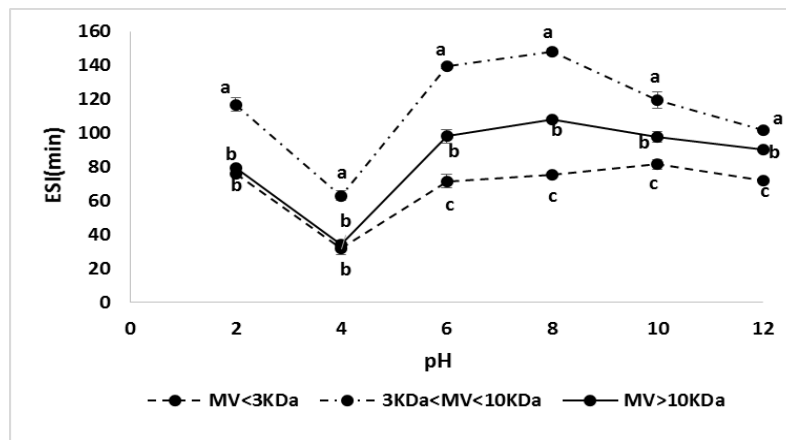
نمودار (۳) - حلالیت پپتیدهای زیست فعال با وزن‌های مولکولی مختلف نمودار (۳) - حلالیت پپتیدهای زیست فعال با وزن‌های مولکولی مختلف
 حروف متفاوت در هر pH نشانگر اختلاف معنی دار است (P < 0/05).
 a, b, c

در نمودار (۵) شاخص پایداری امولسیون پپتیدها در pHهای مورد بررسی نشان داد شده است. مطابق این نمودار، پپتیدهایی با وزن بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون در تمامی pHها دارای بیشترین پایداری امولسیونی بودند (P < 0/05) و پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون در رتبه دوم قرار گرفتند. گرچه این پپتیدها در pHهای ۲ و ۴ اختلاف معنی داری با پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون نداشتند (P > 0/05).

شاخص فعالیت امولسیفیری و پایداری امولسیونی نمودار (۴) شاخص فعالیت امولسیفیری پپتیدها را در pHهای مختلف نشان می‌دهد. مطابق این نمودار، به غیر از ۴، در سایر pHها، هر سه نوع پپتید از نظر فعالیت امولسیفیری با یکدیگر اختلاف معنی داری (P < 0/05) دارند و بیشترین میزان در پپتیدهایی با وزن بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون اندازه گیری شد. در pH=۴ پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون با پپتیدهای بیش از ۱۰ کیلودالتون اختلاف معنی داری ندارند (P > 0/05).



نمودار (۴) - شاخص فعالیت امولسیفیری پپتیدهای زیست فعال با وزن‌های مولکولی مختلف نمودار (۴) - شاخص فعالیت امولسیفیری پپتیدهای زیست فعال با وزن‌های مولکولی مختلف
 حروف متفاوت در هر pH نشانگر اختلاف معنی دار (P < 0/05) است.
 a, b, c

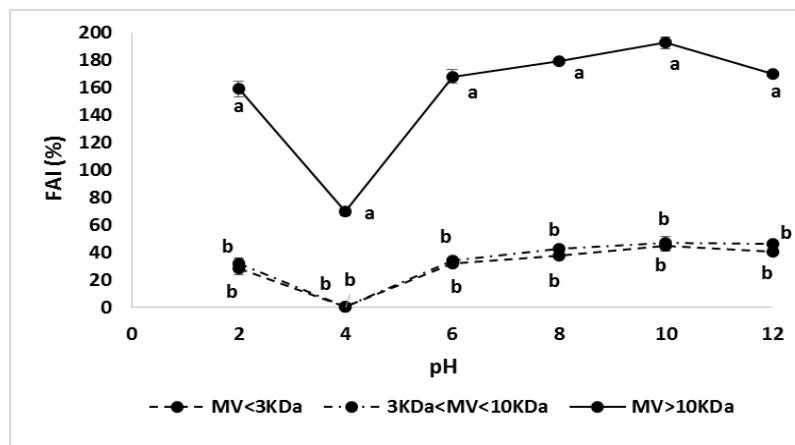


نمودار (۵) - شاخص پایداری امولسیون پپتیدهای زیست فعال با وزنهای مولکولی مختلف نمودار (۵): حروف متفاوت در هر pH نشانگر اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) است.

شاخص فعالیت کفزایی و پایداری کف

پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ و بین ۳ تا ۱۰ کیلودالتون از نظر شاخص مذکور اختلاف معنی داری ندارند و نمودارهای آنها بر هم منطبق است ($P > 0/05$).

نمودار (۶) شاخص فعالیت کفزایی پپتیدها را نشان می دهد. مطابق این نمودار، در تمام pHها، بالاترین میزان شاخص کفزایی مربوط به پپتیدهایی با وزن مولکولی بیش از ۱۰ کیلودالتون است ($P < 0/05$).

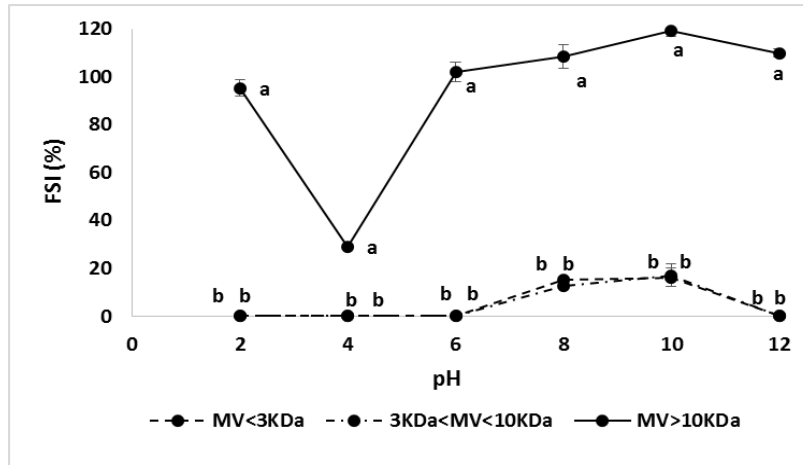


نمودار (۶) - شاخص فعالیت کفزایی پپتیدهای زیست فعال با وزنهای مولکولی مختلف نمودار (۶): حروف متفاوت در هر pH نشانگر اختلاف معنی دار ($P < 0/05$) بین داده ها است.

پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون در تمام pHهای مورد بررسی دارای بیشترین ($P < 0/05$) پایداری است. پپتیدهایی با وزن کمتر از ۳ و بین ۳ تا

در نمودار (۷) شاخص پایداری کف پپتیدها در pHهای مختلف نشان داده شده است. همانطور که در این نمودار مشاهده می شود، کف تولید شده توسط

۱۰ کیلودالتون از نظر پایداری کف اختلاف معنی داری نداشتند ($P > 0.05$). به علاوه، کف تولید شده توسط این دو نوع پپتید در pH های ۲، ۴، ۶ و ۱۲ فاقد (معادل صفر) پایداری بود.

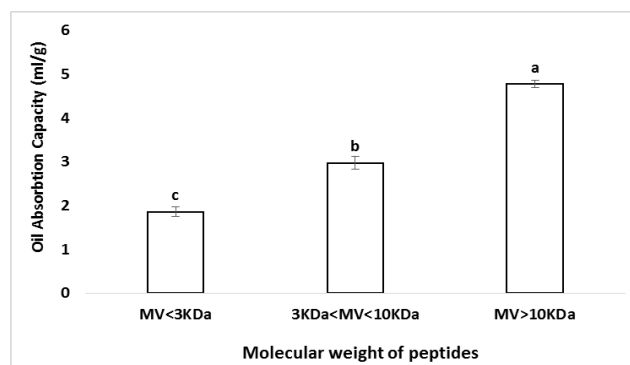


نمودار (۷) - شاخص پایداری کف پپتیدهای زیست فعال با وزنهای مولکولی مختلف. حروف متفاوت در هر pH نشانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین داده ها است. a, b

پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون ثبت شد (۸) مطابق نمودار (۸)، با افزایش وزن مولکولی پپتیدها، ظرفیت جذب روغن آن-ها نیز افزایش یافته است (رابطه خطی).

- ظرفیت جذب روغن

نمودار (۸) میزان ظرفیت جذب روغن پپتیدهای زیست فعال را نشان می دهد. پپتیدهای متفاوتی از نظر وزن مولکولی، ظرفیت جذب روغن متفاوتی داشتند ($P < 0.05$). بیشترین میزان ظرفیت جذب روغن در

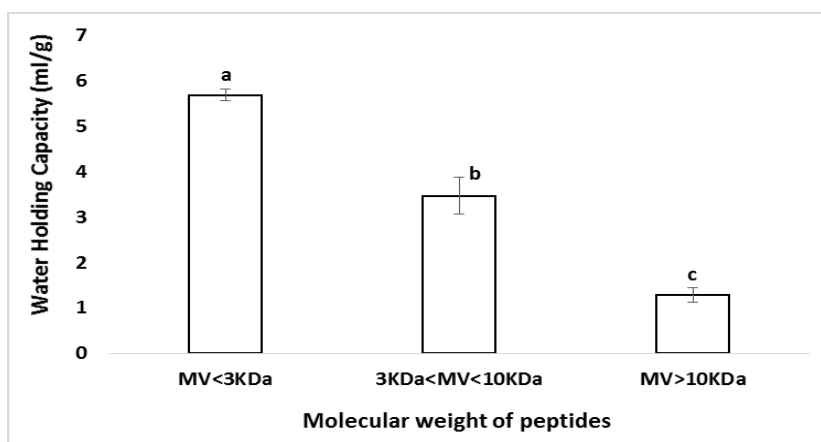


نمودار (۸) - ظرفیت جذب روغن پپتیدهای زیست فعال با وزنهای مولکولی مختلف. حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی دار ($P < 0.05$) بین داده ها است. a, b, c

- ظرفیت نگهداری آب

معنی‌داری ($P < 0/05$) داشتند و بیشترین میزان این شاخص در پپتیدهایی با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون ($5/69 \pm 0/12$ میلی‌لیتر بر گرم) ثبت شد.

در نمودار (۹) ظرفیت نگهداری آب پپتیدهای زیست‌فعال نشان شده است. مطابق این نمودار، با افزایش وزن مولکولی پپتیدها، این ظرفیت کاهش یافته است ($P < 0/05$). ظرفیت نگهداری آب پپتیدها تفاوت



نمودار (۹) - ظرفیت نگهداری آب پپتیدهای زیست‌فعال با وزن‌های مولکولی مختلف (a, b, c: حروف متفاوت نشانگر اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها است ($P < 0/05$)).

بحث و نتیجه‌گیری

تولیدشده از پوست سگ‌ماهی دریایی (*Squalus acanthias*) با استفاده از آنزیم‌های حیوانی (پپسین، تریپسین و کیموتریپسین) قادر به مهار رشد *اشریشیا کولای*، *لاکتوکوکوس لاکتیس* و *باسیلوس سوبتیلیس* نبودند (Rajendran, 2012)؛ اما پپتیدهای تولیدشده از عضله ماهی (*Barbus callensis*) توانستند رشد باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس*، *لیستریا مونوسیتوژنز*، *باسیلوس سوبتیلیس*، *اشریشیا کولای*، *سودوموناس آئروژینوزا*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سالمونلا انتریکا* را مهار کنند (Sila et al., 2014).

پپتیدهای زیست‌فعال دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی هستند و این موضوع در تحقیقات مختلف

در تحقیق حاضر پپتیدهای زیست‌فعال دارای فعالیت مهار رشد قابل توجهی بودند. مکانیسم کلی پپتیدهای زیست‌فعال جهت مهار باکتری‌ها مربوط به ایجاد منافذ در غشا و نهایتاً تخریب سلول است (Amisshah, 2012). بسته به شرایط آزمایش (pH، دما و ...)، نوع منبع پپتید، وزن مولکولی پپتید، پروفیل اسیدهای آمینه، بار شبکه پپتید، نوع آنزیم مورد استفاده جهت تولید پپتید، نوع باکتری مورد آزمایش و غیره، پپتیدها ممکن است خاصیت مهار رشد را بر باکتری‌ها اعمال کنند و یا اینکه در این زمینه کارا نباشند (Shahidi and Zhong, 2008; Ramos-Villarroe, 2010). برای مثال پپتیدهای

مهم‌ترین خاصیت عملکردی پپتیدهای زیست‌فعال که به صورت مستقیم و غیرمستقیم سایر خواص آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد، حلالیت است (Reyhani Poul *et al.*, 2018). همچنین این خاصیت تا حد بسیار زیادی کارایی پپتیدها را در صنایع غذایی تضمین و تأیید می‌کند. در تحقیق حاضر کاراترین پپتیدها از نظر شاخص مذکور، پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون بودند. به گونه‌ای که میزان حلالیت آن‌ها از حدود ۳۵ درصد در $pH=4$ تا ۹۹ درصد در $pH=10$ متغیر بود. وزن مولکولی پپتیدها و نسبت اسیدهای آمینه هیدروفیل و هیدروفوب در زنجیره، دو عامل اصلی و مؤثر بر میزان شاخص حلالیت هستند. با افزایش وزن مولکولی پپتیدها، حلالیت آن‌ها کاهش می‌یابد (Linder *et al.*, 1996; Chobert *et al.*, 1988; Mahmoud, 1994). علت سقوط (حداقل) حلالیت هر سه نوع پپتید متفاوت از نظر وزن مولکولی در $pH=4$ ، قرار داشتن این pH در محدوده نقطه ایزوالکتریک پروتئین‌های میگو است. در این نقطه مجموع بار مثبت و منفی رشته‌های پپتیدی باهم برابر بوده و پپتید توانایی نگهداری آب را ندارد و رسوب می‌کند که این امر موجب کاهش حلالیت در این pH شده است (Chobert *et al.*, 1988; Linder *et al.*, 1996).

در پژوهش پیش رو، وزن مولکولی از عوامل مؤثر بر خواص امولسیون پپتیدهای زیست‌فعال بود. به گونه‌ای که پپتیدهایی با وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلودالتون بالاترین شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیون را به خود اختصاص دادند. پپتیدهای زیست‌فعال مطلوب از نظر خواص امولسیفایری، پپتیدهایی هستند که بتوانند یک لایه کاملاً متراکم

ثابت شده است. نوع آنزیم مصرفی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال (Reyhani Poul *et al.*, 2018; Elavarasan *et al.*, 2014)، درجه آبکافت (Reyhani *et al.*, 2017)، زمان فرایند آبکافت (Poul and Jafarpour, 2017)، نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای واکنش (Shabanpour *et al.*, 2017) از جمله عواملی هستند که می‌توانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال را تحت تأثیر قرار دهند. همان‌طور که در تحقیق حاضر مشخص شد، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال تحت تأثیر وزن مولکولی نیز تغییر می‌کند و پپتیدهایی با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون در این زمینه کارتر بودند. در واقع از بین سه وزن مورد بررسی، پپتیدهایی با کمترین وزن مولکولی (کوتاه‌ترین زنجیره) بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی را داشتند. نتایج مطالعه‌ای که به بررسی فاکتور زمان بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال پرداخته است (Yeganeh *et al.*, 2021) نشان داد که با افزایش زمان فرایند آبکافت، غلظت پپتیدهایی که جهت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد مورد نیاز هستند، کاهش می‌یابد. این تحقیق به صورت غیرمستقیم، یافته پژوهش حاضر را تأیید می‌کند. همچنین سایر پژوهش‌های انجام‌شده در این زمینه نیز به همین صورت با یافته تحقیق حاضر مطابقت دارند (Kusumaningtyas *et al.*, 2019; Nalinanon *et al.*, 2011; Esmaeili Kharyeki *et al.*, 2018)؛ اما در تحقیقی که خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی حاصل از ضایعات ماهی کپور معمولی مورد ارزیابی قرار گرفت، بر خلاف پژوهش حاضر پپتیدهایی با وزن مولکولی ۳ تا ۱۰ کیلودالتون دارای IC_{50} کمتری بودند.

می‌رسد حلالیت نقش مهمی در این ویژگی دارد؛ چرا که حرکت و جذب شدن سریع به سطح مشترک یک شاخص است (Chobert *et al.*, 1988). دلیل حداقل بودن شاخص فعالیت امولسیفایری در $\text{pH}=4$ کاهش حلالیت (نقطه ایزوالکتریک) و متعاقب آن عدم توانایی رشته‌های پپتیدی برای حرکت سریع (به دلیل کاهش حلالیت) به سمت سطح مشترک دو فاز می‌باشد. علاوه بر آن بار شبکه پپتید در این pH به حداقل خود رسیده است.

در تحقیق حاضر، بیشترین ظرفیت کف‌زایی و پایداری کف مربوط به پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون بود. تشکیل کف تحت تاثیر عواملی مانند انتقال، نفوذ و سازمان‌دهی مجدد مولکول‌ها در سطح مشترک هوا و آب است (Wilde and Clark, 1996). از بین پپتیدهای تولیدشده، پپتیدی دارای قدرت کف‌زایی بالاست که بتواند سریع‌تر به سطح مشترک آب و هوا مهاجرت کند و در نتیجه کاهش کشش سطحی، ساختارش از حالت پیچ و تاب خارج و مجدداً بازآرایی شود. در روند جذب (مهاجرت) پروتئین به سطح مشترک آب-هوا، عواملی مانند اندازه، ساختار و گروه‌های آب‌گریز مولکول پروتئینی، منبع پروتئین و روش آبکافت دخیل هستند (Taheri *et al.*, 2013). یکی از مواردی که در پایداری کف مؤثر است، پروفیل اسیدهای آمینه پپتیدهای زیست‌فعال است. وجود دو اسیدآمینه هیدروکسی‌پرولین (Hydroxyproline) و هیدروکسی‌لایزین (Hydroxylysine) در پپتیدهای زیست‌فعال موجب افزایش شمار پیوندهای هیدروژنی و متعاقب تراکم بار پروتئین می‌شوند. به این طریق این دو اسیدهای آمینه کف را پایدار می‌کنند (Giménez *et al.*

به هم پیوسته در سطح مشترک به وجود آوردند، به گونه‌ای که گروه‌های قطبی (اسیدهای آمینه) با فاز آبی و زنجیره‌های هیدروکربن (گروه غیر قطبی) با فاز روغن برهمکنش نمایند (Razavi Shirazi, 2000). عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مولکول پروتئین، توالی و ترکیب اسیدهای آمینه و ویژگی آمفیفیلیک در مولکول پروتئین، سرعت هموزن-کردن مخلوط، منبع پروتئین، دما، نوع روغن مصرفی برای آزمایش و محتوی آب مخلوط، ویژگی‌های امولسیون پپتیدهای زیست‌فعال را تحت تاثیر قرار می‌دهند. pH از طریق تأثیری که روی حلالیت و سطوح هیدروفوبی مولکول پروتئین دارد، می‌تواند در این زمینه مؤثر باشد (Kristinsson and Rasco, 2000; Linder *et al.*, 1996). یکی از فاکتورهای مهم که می‌تواند در میزان ویژگی امولسیفایری پروتئین آبکافتی تأثیرگذار باشد، وزن مولکولی پپتیدهای تولیدشده است (Mutilangi *et al.*, 1996). پپتیدهایی با وزن مولکولی کم، خواص آمفیفیلیک (Amphiphilic) کافی برای ارائه ویژگی امولسیفایری مناسب را ندارند (Chobert *et al.*, 1988). ویژگی‌های امولسیفایری پپتیدهای زیست‌فعال با کنترل دقیق حد آبکافت، بهبود می‌یابد. چرا که آبکافت گسترده (با کاهش بیش از حد وزن و طول زنجیره پپتیدی) به شدت ویژگی امولسیفایری را کاهش می‌دهد (Mahmoud, 1994). اگرچه پپتیدهای کوچک بسیار پایدارند و سریعاً منتشر شده و به سطح مشترک جذب می‌شوند اما اثر کمتری در کاهش کشش سطحی بین سطوح مشترک دارند؛ زیرا آن‌ها مانند مولکول‌های پروتئین با وزن مولکولی بالا نمی‌توانند خم شوند و تغییر جهت دهند (Turgeon *et al.*, 1991). به نظر

مولکولی، پروفیل اسیدهای آمینه پپتیدها نیز بر ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب آن‌ها تأثیر قابل‌توجهی دارد. هر چه غلظت اسیدهای آمینه‌ها هیدروکسی پرولین، آسپارتیک اسید، گلوتامیک اسید، لایزین و آرژنین در یک پپتید بیشتر باشد، آن پپتید میلی‌لیتر روغن بیشتری جذب خواهد کرد (Šližytė et al., 2009). همچنین هرچه تعداد (غلظت) گروه‌های قطبی مانند COOH (کربوکسیل) و NH₂ (آمین) در یک پپتید بیشتر باشد، آن پروتئین قابلیت نگهداری مقدار بیشتری از آب را داراست (Kristinsson and Rasco, 2000).

مطابق نتایج تحقیق انجام‌شده، وزن مولکولی پپتیدهای زیست‌فعال تا حد بسیار زیادی فعالیت ضد باکتریایی، آنتی‌اکسیدانی و خواص عملکردی آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. به گونه‌ای که پپتیدهای مختلف از نظر وزن مولکولی، خواص متفاوتی از خود بروز می‌دهند. از آنجا که در هر کدام از خواص (ضد باکتریایی، آنتی-اکسیدانی و عملکردی)، پپتیدهایی با یک وزن مولکولی خاص بالاترین کارایی را داشتند؛ جهت استفاده از پپتیدها برای هر هدف مشخص در صنایع غذایی باید به این مهم توجه گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

(al., 2009). بنابراین در پپتیدهایی که غلظت این دو اسیدآمینه بالاست، پایداری کف مطلوبی انتظار می‌رود. به‌طورکلی ویژگی‌های کف‌زایی و پایداری کف غالباً تحت تأثیر ساختار پپتید، ترکیب اسیدهای آمینه، بار شبکه و مولکول پروتئین و همچنین پراکنش این بار هستند (Adler-Nissen, 1986). شاخص کف‌زایی و پایداری کف سه پپتید در pH=4 به شدت کاهش یافته است. دلیل این امر کاهش حلالیت پپتیدها (نقطه ایزوالکتریک) در این pH است (Pearson, 1983).

ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب پپتیدهای زیست‌فعال، دو خاصیت عملکردی دیگری هستند که در تحقیق حاضر مورد بررسی قرار گرفتند. در مطالعه حاضر اثر وزن مولکولی بر این خاصیت پپتیدها، عکس بود؛ به این صورت که با افزایش وزن مولکولی، ظرفیت جذب روغن پپتیدها افزایش و ظرفیت نگهداری آب آن‌ها کاهش یافت. در پژوهش‌هایی که اثر درجه آبکافت بر ظرفیت جذب روغن پپتیدهای زیست‌فعال بررسی شد (Wasswa et al., 2007; Reyhani Poul and Jafarpour, 2017) گزارش گردید که با افزایش درجه آبکافت، ظرفیت جذب روغن کاهش و ظرفیت نگهداری آب افزایش پیدا می‌کند. در پژوهش حاضر نیز بیشترین ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب به‌ترتیب در پپتیدهایی با وزن بیش از ۱۰ کیلودالتون و پپتیدهایی با وزن کمتر از ۳ کیلودالتون ثبت شد. علاوه بر وزن

منابع

- Adler-Nissen, J. (1986). Enzymatic hydrolysis of food proteins. London: Elsevier Applied Science. 57–109.
- Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudin, I., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. Food Research International, 44(4): 1044-1051.

- Amissah, J. (2012). Bioactive properties of salmon skin protein hydrolysates. (Doctoral dissertation, McGill University Libraries).
- Ahmadi, A., Yeganeh, S. and Smaili, M. (2020). Investigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Journal of Fisheries*, 73 (4): 593-606. [In Persian]
- Chobert, J.M., Bertrand-Harb, C. and Nicolas, M.G. (1988). Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5), 883-892.
- Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and 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.
- Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M.C. and Montero, M.P. (2009). Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3), 585-592.
- Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L. and He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1): 336-342.
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. (2000). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(3): 657-666.
- Kusumaningtyas, E., Nurilmala, M., & Sibarani, D. (2019). Antioxidant and antifungal activities of collagen hydrolysates from skin of milkfish (*Chanos chanos*) hydrolyzed using various bacillus proteases. In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, IOP Publishing, Vol. 278, No. 1, p. 012040.
- Mahmoud, M.I. (1994). Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products. *Food Technology*, 48(10): 89-95.
- Mutilangi, W.A.M., Panyam, D. and Kilara, A. (1996). Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 61(2): 270-275.
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F. (2011). Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4): 1354-1362.
- Linder, M., Fanni, J. and Parmentier, M. (1996). Functional properties of veal bone hydrolysates. *Journal of Food Science*, 61(4), 712-716.
- 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(1): 238-242.
- Pearce, K.N. and Kinsella, J.E. (1978). Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3): 716-723.
- Pearson, A.M. (1983). Soy proteins. In: B.J.F. Hudson (Ed.), *Developments in Food Proteins-2*, Essex, England: Applied Science Publishers. pp. 67-108.
- Park, P.J., Jung, W.K., Nam, K.S., Shahidi, F. and Kim, S.K. (2001). Purification and characterization of antioxidative peptides from protein hydrolysate of lecithin-free egg yolk. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78(6): 651-656.
- Ramos-Villarreal, A.Y., Soliva-Fortuny, R. and Martín-Belloso, O. (2010). Natural antimicrobials for food processing. *Animal Science Reviews*, 211.
- Rajendran, S. (2012). Biologically active protein hydrolysates from dog fish (*Squalus acanthias*) skin. Doctoral Dissertation, McGill University.
- Reyhani Poul, S. and Jafarpour, A. (2017). Effects of degree of hydrolysis on functional properties and antioxidants activity of hydrolysate from head and frame of common carp (*Cyprinus carpio*) fish. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 68 (14): 113-124. [In Persian]
- Reyhani Poul, S., Jafarpour, A. and Safari, R. (2018). Study of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. 14 (1): 162-176. [In Persian]
- Shahidi, F., Han, X. Q. and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3): 285-293.
- Sun, J., He, H. and Xie, B. J. (2004). Novel antioxidant peptides from fermented mushroom *Ganoderma lucidum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(21): 6646-6652.

- Shahidi, F. and Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*, 91(4), 914-931.
- Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M. and Rustad, T. (2009). Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6): 668-677.
- Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., et al. (2014). Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1): 183-188.
- Shabanpour, B., Kordjazi, M., Nazari, Kh. and Smaeili, M. (2017). Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides. *Iranian Journal of Food Science and Technology*, 62(14): 31-45. [In Persian]
- Esmaeili Kharyeki, M., Rezaei, M., Khodabandeh, S. and Motamedzadegan, A. (2018). Antioxidant activity of protein hydrolysate in skipjack tuna head. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 7(1): 57-64. [In Persian]
- Turgeon, S.L., Gauthier, S.F. and Paquin, P. (1991). Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 39(4): 673-676.
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari, H. and Fogliano, V. (2013). Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 12(1): 154-169.
- Wilde, P.J. and Clark, D.C. (1996). The competitive displacement of β -lactoglobulin by Tween 20 from oil-water and air-water interfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 155(1): 48-54.
- Wasswa, J., Tang, J., Gu, X.H. and Yuan, X.Q. (2007). Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104(4): 1698-1704.
- Wald, M., Schwarz, K., Rehbein, H., Bußmann, B. and Beermann, C. (2016). Detection of antibacterial activity of an enzymatic hydrolysate generated by processing rainbow trout by-products with trout pepsin. *Food Chemistry*, 205: 221-228.
- Yen, G.C. and Wu, J.Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, 65(3): 375-37.
- Yeganeh, S., Esmaeili, M. and Ahmadi, H. (2021). Effect of hydrolysis time on the antioxidant activity of Common carp (*Cyprinus carpio*) head protein hydrolysate. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 29 (6): 29-42. [In Persian]
- Yaghoubzadeh, Z., Kaboosi, H., Peyravii, F., Safari, R. and Fattahi, E. (2021). Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate. *Iranian Scientific Fisheries Journal*, 28 (2), 117-129. [In Persian]