

# ارزیابی خواص کاربردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تخم قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

مهسا رجب زاده<sup>1</sup>، پرستو پورعاشوری<sup>2\*</sup>، بهاره شعبانپور<sup>3</sup>، علیرضا عالیشاهی<sup>4</sup>

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- 2- استادیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- 3- استاد، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران
- 4- دانشیار، گروه فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

تاریخ پذیرش: 1396/04/03

تاریخ دریافت: 1396/01/25

## چکیده

در این تحقیق پروتئین تخم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و پپسین هیدرولیز گردید. ترکیبات تقریبی، خواص آنتی‌اکسیدانی و کاربردی نمونه‌ها مورد آزمون قرار گرفتند. بهینه درصد آنزیم 2 درصد و زمان تیمار با آنزیم‌ها 120 دقیقه تعیین گردید. درجه هیدرولیز نمونه‌ها به ترتیب 44/08 و 27/62 درصد برای آلکالاز و پپسین بودند. هر دو نمونه پودر هیدرولیز شده تخم قزل‌آلا حاوی مقدار بالای پروتئین (68/51% پپسین و 71/09% آلکالاز) بودند. پپسین پودری سفید با روشنایی بیشتر ( $L^*=89/50$ ) و آلکالاز پودری متمایل به زرد-قهوه‌ای ( $L^*=52/85$ ،  $a^*=30/10$ ،  $b^*=26/25$ ) داشت. پودرهای تولیدی در غلظت‌های مختلف ویژگی آنتی‌اکسیدانی بسیار خوبی نشان دادند. پودرهای تولیدی در برخی غلظت‌ها دارای خواص تشکیل کف و امولسیون‌کنندگی خوبی بودند. نتایج حاصل پروتئین هیدرولیز شده تخم قزل‌آلا را به عنوان منبع خوبی با خواص آنتی‌اکسیدانی مناسب و قابل استفاده در مواد غذایی و صنایع وابسته پیشنهاد می‌کند.

**واژه‌های کلیدی:** تخم ماهی قزل‌آلا، درجه هیدرولیز، خواص آنتی‌اکسیدانی، هیدرولیز آنزیمی

## 1- مقدمه

غذاهای دریایی منبع پروتئینی مهمی در رژیم غذایی انسانها هستند، که تقریباً 20% از مصرف پروتئین جانوری را به خود اختصاص می‌دهند (1). صنعت شیلات یکی از منابع اقتصادی مهم در بسیاری از کشورها است. پروتئین ماهی منبع مهم از مواد مغذی برای بسیاری از مردم، به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. طبق تخمین در سراسر جهان، یک میلیارد نفر برای امرار معاش خود به تولید، فرآوری و تجارت ماهی وابسته‌اند (2). حجم بزرگی از ضایعات حاصل از فرآوری گونه‌های دریایی و گونه‌های کم مصرف به عنوان دورریز محسوب می‌گردند و هیچ تلاشی برای بازیابی ترکیبات ضروری و پپتیدهای زیست فعال آنها صورت نمی‌گیرد. هیدرولیز آنزیمی روشی است که امروزه به طور گسترده برای استخراج پروتئین‌های هیدرولیز شده از دامنه وسیعی از پروتئین‌های غذایی استفاده می‌شود (3-5). در صنعت فرآوری ماهی بیش از 60٪ محصولات جانبی و ضایعات شامل سر، پوست، باله، امعاء و احشاء، تخم و... تولید می‌شود و تنها 40 درصد محصولات تولیدی برای انسان قابل مصرف است (3). این مقادیر زیاد ضایعات محصولات شیلات در برخی مناطق سبب آلودگی می‌شود و دفع این مواد باعث ایجاد مشکلات جدی در کشورهای در حال توسعه و توسعه یافته می‌گردد. این ضایعات حاوی مقادیر مطلوبی از مواد غنی از پروتئین است که به طور معمول برای تولید محصولات با ارزش افزوده قابل استفاده هستند و به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی هستند و می‌توانند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند (6). تخم ماهی<sup>1</sup> محصولی بسیار با ارزش می‌باشد و در بسیاری از نقاط دنیا مصرف می‌گردد. خاویار استحصال از ماهیان خاویاری شناخته شده‌ترین شکل از محصولات تولیدی از تخم ماهیان است. بخش بزرگی از تخم ماهیان در کشورهای آسیایی مورد مصرف قرار نمی‌گیرد و به عنوان دورریز می

باشند. تخم ماهی با داشتن 11 درصد آلومین، 75 درصد اووگلوبولین و 13 درصد کلاژن منبع خوبی برای تولید پپتیدهای زیست فعال از طریق هیدرولیز آنزیمی می‌باشد (7). در سالهای اخیر پروتئین‌های هیدرولیز شده از منابع جانوری و گیاهی مختلف مانند کازئین شیر، سویا، پروتئین زرده تخم مرغ و پروتئین‌های میوفیبریل خوک شناسایی شده‌اند که دارای توانایی آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (5). علاوه بر این موارد، فرآورده‌ها و ضایعات دریایی نیز به عنوان منبع خوبی از پپتیدهای دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی به اثبات رسیده‌اند. ژلاتین استخراجی از پوست ماهی آلاسکا پولاک و کفشک ماهی زرد باله، هیدرولیز پوست اسکویید از منابعی هستند که مطالعات روی آنها انجام شده است (8،9). فرآیند هیدرولیز آنزیمی روش موثری برای تعدیل منابع پروتئینی کم مصرف به فرآورده‌های با ارزش است و می‌تواند خواص کاربردی و فعالیت‌های زیستی پروتئین‌ها را بدون تاثیر بر ارزش غذایی بهبود بخشد (10، 11). هیدرولیز آنزیمی منابع پروتئینی راهی کارآمد برای بازیابی پپتیدهای زیست فعال بالقوه هستند. پروتئین‌های هیدرولیز شده منابع دریایی کاربردهای بالقوه تغذیه ای و دارویی از خود نشان داده‌اند (12). طیف وسیعی از آنزیمهای تجاری برای هیدرولیز ماهی و سایر پروتئین‌های خوراکی با موفقیت مورد آزمایش قرار گرفته‌اند. آنزیم‌های پروتئولیتیک مانند پپسین، تریپسین و آلکالاز برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده زیست فعال از منابع دریایی با موفقیت مورد آزمایش قرار گرفته‌اند (7، 14). آلکالاز پروتئاز میکروبی قلیایی است که از باکتری باسیلوس لیچنیفورمیس<sup>2</sup> تولید می‌شود (7). با گسترش تکنولوژی‌های آنزیمی، بازیابی پروتئین‌ها و تولید ترکیبات غذایی ارزشمند و محصولات صنعتی امکان‌پذیر شده است (13). قرل‌آلای رنگین کمان ماهی پرورشی تجاری است که به طور وسیع در داخل کشور تکثیر و پرورش داده می‌شود (15). اغلب اجزای تشکیل دهنده این آبی، به ویژه تخم آن به دلیل طعم و مزه مطلوب و فواید

تخم ماهی و اعمال شرایط مورد نیاز برای عمل هریک از آنزیم‌ها (pH=2 پپسین و pH=8 آلکالاز)، ابتدا غلظت بهینه مشخص شد. دو آنزیم آلکالاز و پپسین در سطوح 0/5، 1، 1/5 و 2 درصد در زمان 120 دقیقه در دمای بهینه 37 درجه سانتی‌گراد به نمونه‌های کنسانتره تخم ماهی افزوده شدند. بعد از تعیین غلظت بهینه، هر یک از آنزیم‌ها در زمان‌های 60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه در دمای مشخص برای کنسانتره تخم ماهی مورد استفاده قرار گرفتند. درجه هیدرولیز در هر مرحله اندازه‌گیری گردید (7).

### 2-3 تولید پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان

پیش از هیدرولیز آنزیمی، مخلوط همگن در دمای 85 درجه سانتی‌گراد به مدت 20 دقیقه پیش‌انکوباسیون شده تا فعالیت آنزیم‌های درونی متوقف گردد. سپس 5 گرم ماده خشک با 150 میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید. فرآیند هیدرولیز با اضافه کردن آنزیم‌های آلکالاز و پپسین به طور جداگانه با غلظت 2 درصد و زمان 120 دقیقه برای هر آنزیم و دما (آلکالاز و پپسین به ترتیب 55 و 37 درجه سانتی‌گراد) و pH (pH=2 پپسین و pH=8 آلکالاز) انجام گردید. بعد از انجام هیدرولیز آنزیمی، برای غیرفعال‌سازی آنزیم‌ها محلول حاصل به مدت 20 دقیقه در دمای 95-85 درجه سانتی‌گراد درون آون قرار داده شد. سپس محلول حاصل سانتریفوژ (13000 دور، 30 دقیقه، 4 درجه سانتی‌گراد) گردید و سوپرناتانت بدست آمده توسط خشک‌کن تصعیدی، خشک گردید (7).

### 2-4 اندازه‌گیری میزان درجه هیدرولیز (DH)

میزان هیدرولیز به کمک تری کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد (21). مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید 10% به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور 750

تغذیه‌ای بالا مورد پسند مردم قرار می‌گیرد. اما پرورش‌دهندگان این گونه ماهی در زمان تکثیر، ماهیان پیش مولدی دارند که تخم‌های بدست آمده از آنها به دلیل پایین بودن بازده لقاح و باروری دورریخته می‌شوند و در مواردی با تخم‌های رسیده مازاد مواجه هستند (16). تاکنون مطالعات محدودی بر روی هیدرولیز تخم ماهیان مختلف انجام شده است (7، 12، 17، 18). با توجه به مطالعات انجام شده تاکنون مطالعه‌ای بر روی هیدرولیز آنزیمی تخم ماهی قزل‌آلا صورت نگرفته و اطلاعاتی در این زمینه وجود ندارد. در این تحقیق خواص کاربردی و آنتی‌اکسیدانی هیدرولیز آنزیمی پروتئین تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با تیمارهای آنزیمی مختلف مورد بررسی قرار گرفته است.

### 2- مواد و روش‌ها

#### 2-1 آماده‌سازی نمونه‌های تخم ماهی

تخم‌دان‌های کامل از ماهیان قزل‌آلای رنگین کمان از مرکز تکثیر و پرورش ساری تهیه گردیدند. تخم همگن شده ماهی قزل‌آلا در آون با دمای 48 درجه سانتی‌گراد طی مدت زمان 8 الی 10 ساعت خشک شده و سپس توسط آسیاب پودر گردید (17). پودر تخم خشک شده با ایزوپروپانول با نسبت 3:1 وزنی - حجمی در دمای محیط به مدت 2 ساعت هموژن گردید تا چربی آن گرفته شود. ماده شناور از طریق کاغذ صافی جداسازی و رسوب آن برای جداسازی الکل با خشک‌کن تحت خلاء در دمای 45 درجه سانتی‌گراد به مدت 8 ساعت خشک گردید. سپس ماده خشک شده را با کمک آسیاب پودر کرده به این ترتیب کنسانتره پروتئینی تخم ماهی بدست می‌آید (7).

#### 2-2 بهینه‌سازی زمان و غلظت مورد نیاز برای هر آنزیم

بعد از آماده‌سازی کنسانتره پروتئینی تخم ماهی و تعیین پروتئین آن، ابتدا غلظت و زمان بهینه برای عمل هر آنزیم تعیین گردید. برای اضافه کردن آنزیم به کنسانتره پروتئین

مخلوط کرده، سپس به مدت 20 دقیقه در دمای 50 درجه سانتی گراد نگهداری گردید. سپس به نمونه 1 میلی لیتر تری کلرواستیک اسید 10% اضافه شد و در 3000 دور به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ گردید (Eppendorf centrifuge (2.5810 R, Germany) میلی لیتر از محلول فوق را با 2 میلی لیتر آب مقطر و 0/4 میلی لیتر 0/1% FeCl<sub>2</sub> مخلوط کرده، سپس جذب نمونه ها (Biochrom, Libras 12, England) در طول موج 700 nm خوانده شد (21).

**2-8 ظرفیت امولسیون کنندگی و پایداری امولسیون**  
10 میلی لیتر روغن را با 30 میلی لیتر محلول هیدرولیز شده با غلظت های مختلف 0/1، 0/5، 1 و 3 درصد مخلوط کرده، سپس در دور 20000 به مدت یک دقیقه هموژن گردید (ULTRA-TURRAX homogenizer (T25 Digital 50. IKA-Werke Stuttgart Staufen, Germany) میکرولیتر از محلول هموژن شده را در دو زمان صفر و 10 دقیقه با 5 میلی لیتر SDS 0/1% مخلوط کرده، سپس میزان جذب نمونه در طول موج 500 نانومتر خوانده می شود (22).

**2-9 ظرفیت کف کنندگی و پایداری کف**  
20 میلی لیتر از محلول هیدرولیز شده با غلظت های مختلف 0/1، 0/5، 1 و 3 درصد تهیه گردید. سپس در دور 16000 به مدت یک دقیقه هموژن گردید. حجم کل کف تولیدی در زمان های صفر، 0.5، 5، 10، 40 و 60 دقیقه اندازه گیری می شود (22).

**2-10 تجزیه و تحلیل داده ها**  
در این تحقیق از نرم افزار SPSS (SPSS version 16.0, Chicago IL. USA) برای آنالیز آماری استفاده گردید. آزمایشات در قالب طرح کاملاً تصادفی مورد آزمون قرار گرفته و از آزمون توکی برای مقایسه میانگین و از سطح احتمال (P<0.05) استفاده گردید. تمامی آزمونها در سه تکرار انجام شد.

میکرولیتر از نمونه با 750 میکرولیتر از تری کلرواستیک اسید 10% مخلوط گردید. در ادامه با دور 6700 در دمای 10 درجه سانتی گراد به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با استفاده از روش استاندارد اندازه گیری و درجه هیدرولیز از طریق رابطه (1) محاسبه گردید:

رابطه (1)  $100 > (\text{پروتئین کل در نمونه}) / (\text{میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرواستیک اسید 10\%}) = \text{درجه هیدرولیز\%}$

**2-5 تعیین درصد ترکیبات تقریبی**  
میزان چربی، پروتئین، خاکستر و pH طبق روش (20) اندازه گیری شد.

**2-6 اندازه گیری رنگ**  
رنگ نمونه ها با استفاده از دستگاه رنگ سنج Lovibond CAM-System 500 Imaging Colorimeter (Tintometer Ltd., Amesbury, UK) تعیین شد. شاخص های L\*، a\* و b\* برای هر تکرار با میانگین پنج نقطه ثبت شدند. شاخص L\* نشان دهنده سیاهی (0) تا سفیدی (100)، شاخص a\* نشان دهنده قرمزی (+) یا سبزی (-) و شاخص b\* نشان دهنده زردی (+) یا آبی (-) است (17).

**2-7 اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی**  
**2-7-1 آزمون قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH**  
1/5 میلی لیتر از محلول هیدرولیز شده 40% را با 1/5 میلی لیتر از معرف DPPH 0/15% (در اتانول 95%) مخلوط کرده، سپس به مدت 30 دقیقه در دمای اتاق انکوبه کرده و پس از آن با کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر (Biochrom, Libra 517 nm, England) جذب نمونه ها در طول موج 517 nm خوانده می شود (21).

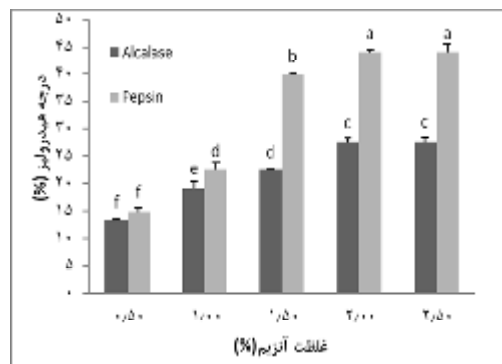
رابطه (1)  $\text{Radical} (\%) = \left(1 - \frac{A_{517 \text{ of sample}}}{A_{517 \text{ of control}}}\right) \times 100$

**2-7-2 آزمون قدرت کاهندگی**  
2 میلی لیتر از محلول هیدرولیز شده با 1 میلی لیتر بافر فسفات 0/2 مولار (pH = 6/6) و 1 میلی لیتر پتاسیم فری سیانید 1%

### 3- نتایج و بحث

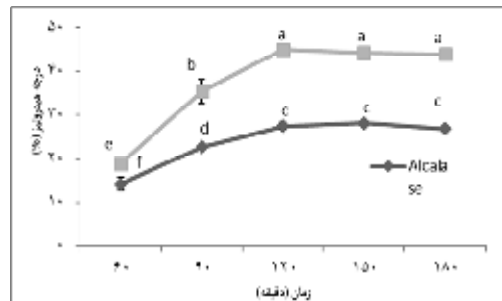
#### 3-1 اثر نوع و نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر درجه هیدرولیز

نسبت آنزیم به سوبسترا مورد استفاده در شکل 1 نشان داده شده است. آنزیم‌های آلکالاز و پپسین در غلظت‌های مختلف (2/5، 2، 1/5، 1، 0/5 درصد) برای انتخاب غلظت بهینه به سوبسترا استفاده شدند. غلظت بهینه هر دو آنزیم 2% انتخاب شد و درجه هیدرولیز برای پپسین و آلکالاز به ترتیب 27/62% و 44/08% بود. در غلظت آنزیم بیشتر، هیدرولیز بیشتر مشاهده نگردید. درجه هیدرولیز با غلظت بهینه دو آنزیم در زمانهای مختلف (60، 90، 120، 150 و 180 دقیقه) مورد بررسی قرار گرفت (شکل 2).



شکل (1) درجه هیدرولیز با نسبت‌های مختلف آنزیم به سوبسترا.

حروف متفاوت روی هر ستون در هر آنزیم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد. انحراف معیار بر روی هر نمودار نشان داده شده است.



شکل (2) منحنی درجه هیدرولیز در زمانهای مختلف با 2 درصد آنزیم آلکالاز و پپسین.

حروف متفاوت در زمان‌های مختلف در هر آنزیم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد. انحراف معیار بر روی هر نمودار نشان داده شده است.

درجه هیدرولیز پس از 120 دقیقه، با افزایش زمان تفاوت معنی‌داری نداشت. این امر احتمالاً به دلیل محدودیت سوبسترای در دسترس برای هیدرولیز بود و آنزیم پپسین توانایی بیشتری در شکستن پپتیدهای کوتاه زنجیره در مقایسه با آنزیم آلکالاز داشت (18). درجه هیدرولیز بین دو آنزیم پروتئاز تفاوت معنی‌داری داشت و نمونه‌های تیمار شده با پپسین درجه هیدرولیز بالاتری نسبت به آلکالاز داشتند. بالا بودن درجه هیدرولیز بالاتر با پپسین احتمالاً نشانگر فعالیت پروتئولیتیک بالاتر آن است. برخی از محققان پروتئازهای قلیایی را فعالتر از پروتئازهای اسیدی یا خنثی عنوان کرده‌اند (7، 13). غلظت و زمان بهینه برای هیدرولیز تخم ماهی کپور با آنزیم‌های پپسین و تریپسین و آلکالاز را 1/5 درصد و 180 دقیقه گزارش کردند. افزایش غلظت آنزیم به سوبسترا از 0/5 به 2 نشان داد که، با وجود غلظت بیشتر آنزیم احتمال شکست پیوندهای پپتیدی بیشتری وجود دارد و درجه هیدرولیز افزایش داشت. این نتایج مطابق سایر مطالعات روی هیدرولیز تخم ماهی کپور معمولی و گوشت ماهی بود (7، 21).

#### 3-2 ترکیبات تقریبی پروتئین هیدرولیز شده

نتایج ترکیبات تقریبی تخم هیدرولیز شده ماهی قزل‌آلا با آنزیم‌های پپسین و آلکالاز در جدول 1 نشان داده شده است. میزان پروتئین و چربی تخم هیدرولیز شده قزل‌آلا تحت تاثیر آنزیم‌ها تفاوت معنی‌دار نشان داد ( $P < 0/05$ ). مقدار پروتئین در تخم هیدرولیز شده با آلکالاز بیشتر از نمونه‌های هیدرولیز شده با پپسین بود. میزان چربی تخم هیدرولیز شده با پپسین (5/55%) بیشتر از نمونه‌های تیمار شده با آلکالاز بود (3/55%). برخی محققان محتوای کم چربی نمونه‌های هیدرولیز شده پروتئین ماهی ناشی از حذف چربی از بخش پروتئین نامحلول بیان کردند (12). طبق این آزمایشات خاکستر و رطوبت تخم هیدرولیز شده با هر دو آنزیم تفاوت معنی‌داری باهم نداشتند ( $P > 0/05$ ).

جدول (1) ترکیبات تقریبی پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین

پارامتر (درصد)	پپسین	آلکالاز
پروتئین	68/51 ± 0/64 <sup>b</sup>	71/09 ± 0/14 <sup>a</sup>
چربی	5/55 ± 0/63 <sup>a</sup>	3/55 ± 0/05 <sup>b</sup>
خاکستر	15/80 ± 0/04 <sup>a</sup>	14/47 ± 0/42 <sup>a</sup>
رطوبت	9/97 ± 0/27 <sup>a</sup>	9/65 ± 1/75 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> در هر ردیف میانگین های با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی دار هستند (P<0/05).

نمونه ها به دلیل وجود غلظت بالای مواد معدنی در تخم ماهی گزارش شده است (7، 23).

### 3-3 ارزیابی رنگ پروتئین هیدرولیز شده

نتایج بررسی شاخص رنگ تخم هیدرولیز شده ماهی قزل آلا ی رنگین کمان با دو آنزیم آلکالاز و پپسین در جدول 2 نشان داده شده است. رنگ پودرهای تولیدی از دیدگاه کاربردی به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسانی اهمیت دارد. رنگ های مختلف پروتئین هیدرولیز شده ماهیان به ترکیب مواد اولیه و شرایط هیدرولیز بستگی دارد (22). از این رو ارزیابی رنگ نمونه ها نشان داد که پودرهای تولیدی با آنزیم پپسین پودرهای سفید با روشنایی بالاتر، در مقایسه با آنزیم آلکالاز تولید نمود. شاخص های روشنایی، قرمزی و زردی باهم تفاوت معنی دار داشتند. روشنایی پودر تخم هیدرولیز شده با آنزیم پپسین بالاتر و شاخص قرمزی و زردی تخم هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز بیشتر بود (24).

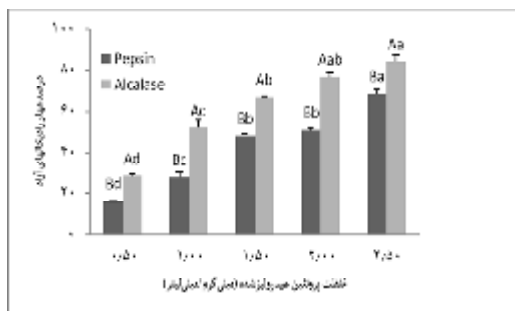
بالا بودن میزان پروتئین در نمونه های هیدرولیز شده بیان کننده کاربرد بالقوه این نمونه ها به عنوان مکمل های پروتئین برای تغذیه انسان است. مقدار پروتئین تخم هیدرولیز شده channa و labeo به ترتیب 24/15 و 12/45 گزارش شده که کمتر از مقدار پروتئین در نمونه های این مطالعه بود (17). تخم هیدرولیز شده کپور معمولی دارای محتوای بالایی از پروتئین بود (7). مطالعات محدودی محتوای چربی بالاتر از سطح 5٪ برای پروتئین هیدرولیز شده ماهی بیان کردند. مطالعات نشان داده اند که پروتئین هیدرولیز شده بخشهای مختلف ماهیان دارای رطوبت کمتر از 10٪ داشتند. مقدار خاکستر تحت تاثیر نوع آنزیم مورد استفاده در طی هیدرولیز آنزیمی است (13). در مطالعه چالامیاه و همکاران (2013) روی هیدرولیز تخم ماهی کپور مقدار خاکستر بیشتری را در مقایسه با تخم قزل آلا گزارش کردند. مقدار بالای خاکستر در

جدول (2) مقادیر شاخص های رنگ پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین

پارامتر	L*	a*	b*
پپسین	89/50 ± 0/50 <sup>a</sup>	2/25 ± 0/25 <sup>b</sup>	11/40 ± 0/02 <sup>b</sup>
آلکالاز	52/85 ± 0/50 <sup>b</sup>	10/30 ± 0/3 <sup>a</sup>	26/25 ± 0/75 <sup>a</sup>

<sup>a,b</sup> در هر ستون میانگین های با حروف نامشابه دارای اختلاف معنی دار هستند (P<0/05).

29). رادیکال‌های DPPH در مواجهه با ماده الکترون دهنده، مانند آنتی‌اکسیدان، مهار شده و میزان جذب با تغییر رنگ، کاهش می‌یابد و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به نوع پروتئاز بستگی دارد (30، 31). طبق نتایج پروتئین هیدرولیز شده تخم قزل‌آلا از ظرفیت مهار رادیکالی بالایی برخوردار بود (شکل 3). میزان فعالیت این شاخص بین دو نمونه تولیدی با آنزیم آلکالاز و پپسین تفاوت معنی‌داری داشت، که احتمالاً به دلیل تفاوت در توالی و ترکیب اسید آمینه و اندازه پپتیدهای تولیدی در نتیجه درجه هیدرولیزهای مختلف می‌باشد (7، 32). این نتایج نشان می‌دهد که پروتئین هیدرولیز شده تخم قزل‌آلا احتمالاً دارای اسیدهای آمینه یا پپتیدهایی با خاصیت الکترون‌دهندگی است و با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند و واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکال را متوقف می‌کند (21، 33).



شکل (3) ارزیابی فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH

پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل‌آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین.

a-e حروف متفاوت روی هر ستون در هر آنزیم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد. A-B حروف متفاوت در بین دو آنزیم نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد. انحراف معیار بر روی هر نمودار نشان داده شده است.

با افزایش درجه هیدرولیز، از قدرت مهارکنندگی DPPH کاسته شد ( $p < 0.05$ ). نمونه‌های آلکالاز در تمامی غلظت‌ها DPPH بیشتری را نسبت به نمونه‌های پپسین داشتند. این تفاوت می‌تواند به دلیل تفاوت در طول زنجیره، ترکیب اسید آمینه، زنجیره‌های جانبی اسیدهای آمینه و آبگریزی آنها باشد (18، 19، 21). این یافته‌ها همسو با نتایج سایر محققان بود

پروتئین هیدرولیز شده گوشت اسکاد با آنزیم فلاورزایم رنگ زرد متمایل به قهوه‌ای داشت که مشابه نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در این تحقیق بود (22). برخی از محققان زردی نمونه‌های هیدرولیز شده را به علت حفظ چربی و رنگدانه‌های محلول در چربی نسبت دادند (24). طیف رنگی شاه‌ماهی و ضایعات هیدرولیز شده این ماهی با استفاده از آنزیم آلکالاز، متنوع بود (25). هیدرولیز گناد شاه‌ماهی نسبت به سایر قسمت‌ها تیره‌تر ( $L^* = 74/6$ ) بود و بیشترین شاخص زردی ( $b^* = 18$ ) را نشان داد. در حالی که رنگ گوشت هیدرولیز شده این ماهی دارای روشنایی بیشتر ( $L^* = 89/4$ ) و زردی کمتری بود ( $b^* = 0/8$ ). مطالعه روی پروتئین هیدرولیز شده شاه‌ماهی نشان داد که در طی نگهداری شاخص  $L^*$  کاهش و زردی افزایش یافت. این محققان این افزایش را به علت ایجاد رنگدانه‌های قهوه‌ای در نتیجه اکسید شدن رنگدانه طی واکنش میلارد دانستند که باعث افزایش زردی در نمونه‌های هیدرولیز شده گردید (22). مقدار زردی بالایی تخم هیدرولیز شده مریگا با آنزیم آلکالاز گزارش شد. این محققان میزان زردی تخم هیدرولیز شده دو گونه ماهی دیگر را نیز تحت تاثیر آنزیم آلکالاز بالاتر مشاهده کردند (13). به طور کلی، تغییرات رنگ محصولات هیدرولیز به ترکیب ماده خام و شرایط هیدرولیز بستگی دارد (22).

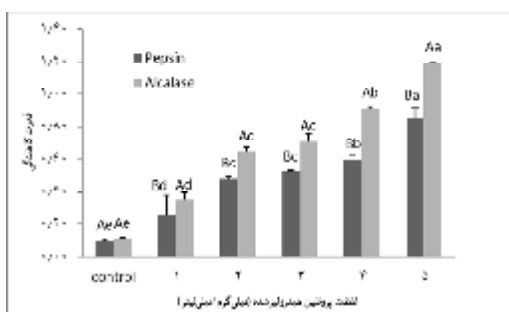
### 3-4 ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

اندازه‌گیری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های هیدرولیز شده با کمک روش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH مورد بررسی قرار گرفت. مطالعات متعدد نشان داده‌اند که پروتئین‌های ماهی پس از هیدرولیز آنزیمی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی می‌باشند (7، 26، 27). اثر آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی بر روی مهار رادیکال DPPH اساساً به دلیل ظرفیت الکترون‌دهندگی آنهاست (28).

هیدروکسی تولون بوتیل، پروپیل گالات و ... استفاده می-شود، ولی می توان ترکیبات ارزش افزوده با خواص آنتی اکسیدانی تولید نمود و از این ترکیبات در سیستم های غذایی استفاده نمود (35).

### 3-5 قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده

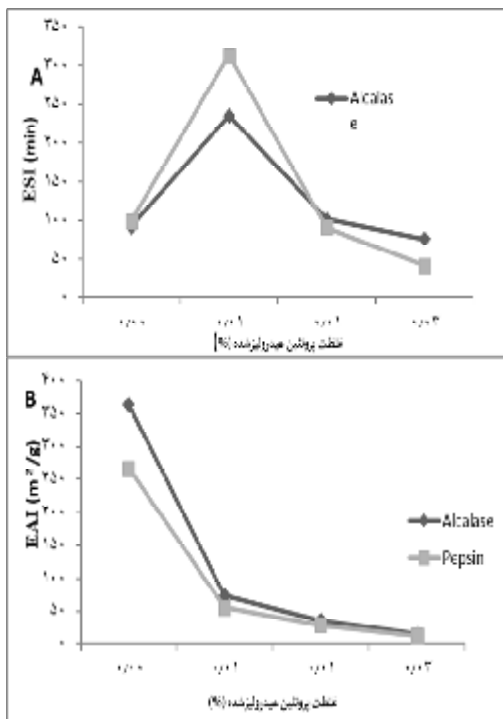
قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده تخم قزل آلا در شکل 4 نشان داده شده است. افزایش میزان جذب نشان دهنده افزایش قدرت کاهندگی است (19,22). تشکیل کمپلکس Fe<sup>2+</sup> را با تشکیل ترکیبات رنگی در 700 nm اندازه گیری می شود (18). با افزایش درجه هیدرولیز، قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم های آلکالاز و پپسین کاهش یافت و نمونه های هیدرولیز شده با آلکالاز از ظرفیت کاهندگی بالاتری در مقایسه با پپسین برخوردار بودند (p<0.05). این نتایج مشابه یافته های سایر پژوهشگران بود (21). در مطالعه آنها هیدرولیز شده آلکالاز با درجه هیدرولیز پایین تر در مقایسه با هیدرولیز شده فلاورزیم قدرت کاهندگی بیشتری داشتند. طبق نتایج قدرت کاهندگی نمونه های هیدرولیز شده احتمالاً به درجه هیدرولیز و نوع آنزیم بستگی دارد (7، 21).



شکل (4) قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین در غلظت های مختلف. حروف متفاوت روی هر ستون در هر آنزیم نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد. A-B حروف متفاوت در بین دو آنزیم نشان دهنده تفاوت معنی دار می باشد. انحراف معیار بر روی هر نمودار نشان داده شده است.

(18، 21). در مطالعات روی تخم ماهی اسکپ جک نیز نمونه های با درجه هیدرولیز پایین تر فعالیت DPPH بیشتری را نسبت به نمونه های با درجه هیدرولیز بالاتر نشان دادند. فعالیت آنزیمی بیشتر سبب تشکیل پپتیدهای کوتاه زنجیر می گردد که آبگریزی بیشتری دارند و این پپتیدها قدرت مهارکنندگی DPPH کمتری دارند. پپتیدهای حاصل از درجه هیدرولیز بالا نمی توانند بدرستی با رادیکال های پروکسیل آبگریز واکنش دهند. علاوه بر ویژگی های پپتیدها، نوع پروتئاز و شرایط هیدرولیز نیز بر خاصیت آنتی اکسیدانی تاثیر دارد (29). با افزایش غلظت ماده مقدار قدرت مهارکنندگی DPPH افزایش یافت. این یافته ها همسو با نتایج سایر محققان بود. آنها نیز افزایش این مقدار را با افزایش غلظت نمونه گزارش کردند (7، 19، 30). فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH ( از 16/01 تا 84/05 %) در این مطالعه مشابه سایر گزارشات از پروتئین های هیدرولیز شده تخم ماهی کپور، تخم ماهی *channa striatus* و *Lates calcarifer* و تخم اسکپ جک می باشد (7، 17، 18). فعالیت مهارکنندگی رادیکال های آزاد توسط پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی کپور معمولی را به دلیل توالی اسیدهای آمینه تشکیل دهنده و اندازه پپتیدهای ناشی از درجه هیدرولیز مختلف می تواند باشد. اسید آمینه هایی مانند هیستیدین، متیونین، سیستئین و فنیل آلانین احتمالاً در این فعالیت نقش دارند (7، 31). پپتیدهای موجود در نمونه های هیدرولیز شده را مسئول واکنش با رادیکال های آزاد و اتمام واکنش های زنجیره رادیکالی دانستند. سایرین گزارش کردند که علاوه بر پروتئین هیدرولیز شده گوشت ماهی، پروتئین سایر بخشهای بدن ماهی مانند ستون فقرات ماهی تن دارای خاصیت آنتی اکسیدان می باشد. پروتئین هیدرولیز شده ماهی-های مختلف با توجه به خاصیت آنتی اکسیدانی آنها به عنوان ماده عملکردی برای کاربردهای تغذیه ای، دارویی، آرایشی و بهداشتی مورد استفاده قرار می گیرند (34). به منظور جلوگیری از اکسیداسیون چربی در محصولات غذایی و صنایع دارویی، بسیاری از آنتی اکسیدانهای مصنوعی مانند





شکل (5) فعالیت امولسیون (A) EAI و شاخص پایداری امولسیون (B) ESI پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل‌آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین در غلظت‌های مختلف.

خواص امولسیون کنندگی تحت تاثیر نوع آنزیم است (21). پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر یا پپتیدهای آبرگیز در پایداری امولسیون بیشتر نقش دارند و به راحتی از سطح جدا نمی‌شوند و هیدرولیز بیشتر نمونه سبب کاهش خواص امولسیون کنندگی می‌گردد. از سوی دیگر مطالعات بیشتر بر روی توالی اسید آمینه در سطح مشترک حدواسط روغن و آب نشان داده که ویژگی آمفی‌فلیک بیشتر از اندازه پپتیدها و انعطاف پذیری ساختار پروتئین بر ویژگی‌های امولسیون کنندگی تاثیر دارند (21). میزان شاخص ESI تحت تاثیر تغییر غلظت بود و با افزایش غلظت از 0/5 درصد میزان پایداری امولسیون کاهش یافت. احتمالاً لایه نازک پروتئینی سبب پایداری ذرات روغن می‌شود و افزایش غلظت پروتئین از حد مشخصی سبب تداخل در قرار گرفتن پروتئین در واحد سطح می‌گردد (4).

بررسی اثر غلظت‌های مختلف نمونه‌ها نشان داد که قدرت کاهندگی تحت تاثیر غلظت می‌باشد. با افزایش غلظت قدرت کاهندگی افزایش یافت و در غلظت‌های 4 و 5 میلی‌گرم/ میلی‌لیتر هیدرولازهای پپسین قدرت کاهندگی کمتری نسبت به آلکالاز نشان دادند. مطالعات مختلف نشان دادند که قدرت کاهندگی تحت تاثیر وجود پپتیدها یا اسیدهای آمینه با توانایی الکترون دهنده است که با رادیکال‌های آزاد واکنش می‌دهند. درجه هیدرولیز و نوع آنزیم نقش تعیین کننده‌ای در این شاخص دارد (21، 28، 36). طبق نتایج این مطالعه قدرت کاهندگی تخم هیدرولیز شده ماهی به نوع پروتئاز بستگی دارد و در راستای سایر مطالعات انجام شده در این زمینه است (37).

### 3-6 بررسی شاخصهای امولسیون کنندگی و پایداری

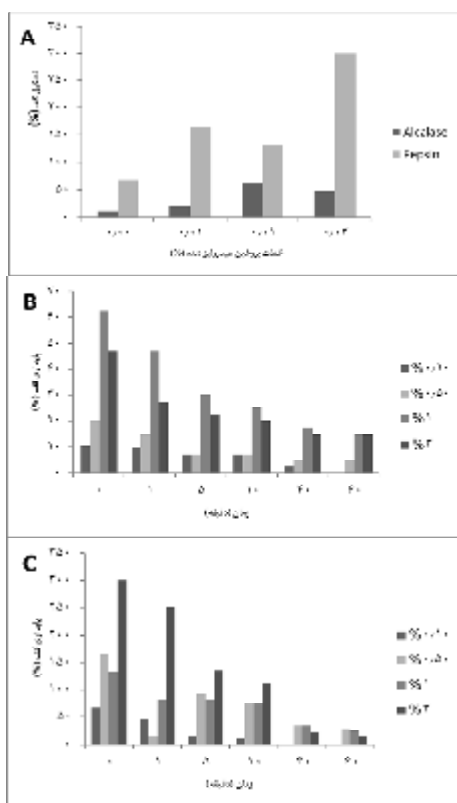
#### امولسیون پروتئین هیدرولیز شده

شاخص فعالیت امولسیون (EAI)<sup>1</sup> و شاخص پایداری امولسیون (ESI)<sup>2</sup> تخم هیدرولیز شده قزل‌آلا با آنزیم‌های مختلف در غلظت‌های مختلف در شکل 5 نشان شده است. غلظت و نوع آنزیم در میزان هر دو شاخص تاثیر معنی‌دار داشتند ( $P < 0/05$ ). با افزایش غلظت از 0/1 به 3% میزان EAI کاهش یافت. EAI نشان‌دهنده توانایی پروتئین در تشکیل پایداری امولسیون است (22). نمونه‌های تولیدی با هر دو نوع آنزیم در غلظت‌های پایین توانایی بیشتری در تشکیل و پایداری امولسیون داشتند. در غلظت‌های بالاتر احتمالاً به دلیل تجمع پروتئین‌ها و پپتیدها در سطح آب/روغن پایداری امولسیون‌ها مختل می‌گردد (22، 4). نتایج مشابهی برای پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی اسکاد گزارش شد (22).

1 - Emulsifying activity index

2 - Emulsion stability index

در نمونه‌های هیدرولیز شده با پپسین بالاتر بود. این مقدار می‌تواند در توانایی تولید کف اثر داشته باشد. نمونه‌های دارای درجه هیدرولیز بالاتر احتمالاً دارای پپتیدهای با اندازه کوچکتری بوده و این پپتیدها با سرعت بیشتری می‌توانند در سطح بین هوا و آب مهاجرت نمایند (18). در نمونه‌های آلکالاز و پپسین به ترتیب در غلظت‌های 1% و 3% ظرفیت تشکیل کف بیشتر بود. این تفاوت به دلیل تفاوت درجه هیدرولیز بین این دو دسته می‌باشد. در نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز با افزایش غلظت، ظرفیت تشکیل کف کاهش یافت. افزایش غلظت در پپتیدهای با اندازه بزرگتر سبب تجمع بیشتری می‌گردد و احتمال انتقال پپتیدها در سطح ذرات را کاهش داده و احتمال تولید کف نیز کاهش خواهد یافت؛ این یافته داده‌های مربوط به EAI را تأیید می‌کند که با افزایش غلظت این شاخص کاهش یافت (18).



شکل (6) ویژگی‌های تشکیل کف پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی

قزل‌آلا تولید شده با آلکالاز و پپسین در غلظت‌های مختلف.

A, توانایی تشکیل کف؛ پایداری کف نمونه‌های تولیدی با آلکالاز B؛ پایداری

کف نمونه‌های تولیدی با پپسین C.

در مطالعه بر روی پروتئین هیدرولیز شده تخم کپور، پپسین با درجه هیدرولیز بالا، در pH های مختلف ظرفیت و پایداری امولسیون بالاتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم تریپسین و آلکالاز نشان داد (7). طبق نتایج نمونه‌های تولیدی هر دو آنزیم آلکالاز و پپسین در غلظت 0/5 درصد بالاترین میزان امولسیون‌کنندگی را نشان دادند. هیدرولیز تخم ماهی اسکپ جک با درجه هیدرولیز بالا در غلظت پایین، EAI بالاتری داشت (18). برخی محققان رابطه مستقیمی بین طول پپتید و خواص امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بیان کردند (10). بالا بودن پایداری امولسیون در غلظت‌های پایین (0/1 و 0/5%) در نمونه‌های پپسین می‌تواند به دلیل ویژگی‌های پپتیدهای تولیدی باشد. احتمالاً پپتیدهای با خواص آمفی‌فلیک در غلظت‌های پایین برای مهاجرت در سطوح آب و روغن موفق‌تر بوده و در نتیجه ESI بیشتر بود. این نتیجه همسو با نتایج سایر محققان است که جدا از اندازه پپتید، ویژگی‌های آبگریزی یا آبدوستی را در سطوح بین ذرات در امولسیون موثر می‌دانند (18). طبق برخی از مطالعات هرچه درجه هیدرولیز بیشتر باشد پایداری امولسیون بالاتر است (7, 38).

### 3-7 ویژگی‌های تشکیل کف پروتئین هیدرولیز شده

توانایی تشکیل کف<sup>1</sup> و پایداری کف<sup>2</sup> پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی قزل‌آلای رنگین کمان با دو آنزیم آلکالاز و پپسین پس از 60 دقیقه در شکل 6 نشان داده شده است. طبق نتایج، نوع آنزیم و زمان بر روی ویژگی‌های تشکیل کف تأثیرگذار می‌باشد. پایداری کف با گذشت زمان در تمامی نمونه‌ها کاهش یافت. نمونه‌های آلکالاز در طی زمان پایداری کف بیشتری نسبت به نمونه‌های پپسین داشتند. نمونه‌های هیدرولیز شده با پپسین تشکیل کف بالاتری نسبت به آلکالاز داشتند (300% و 47/5% به ترتیب) ( $P < 0.05$ ). درجه هیدرولیز

1 - Foam ability

2 - Foam stability

پودر هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز دارای ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بالا و پایداری کف بالایی طی زمان داشت و نمونه‌های پپسین از ظرفیت تولید کف بالایی برخوردار بود. هر دو نمونه پودر تولیدی در غلظت پایین دارای خواص امولسیون‌کنندگی مطلوبی بودند و می‌توانند به عنوان امولسیفایر در امولسیون‌های غذایی مورد استفاده قرار گرفته و در عین حال خواص آنتی‌اکسیدانی مطلوبی نیز داشته باشند. بررسی‌های اولیه نشان‌دهنده مناسب بودن این منبع برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال برای مصارف انسانی جهت استفاده در مواد غذایی و غذا داروها در تولید غذاهای فراسودمند است و مطالعات بیشتر برای جداسازی و غنی‌سازی مواد غذایی نیاز است.

#### 5- منابع

1. Raghavan, S., Kristinsson, H. G., Thorkelsson, G. and Johannsson, R. 2011. Antioxidative properties of fish protein hydrolysates. In: Hand book of seafood quality, safety and health application. (Editors: C. Alsavar, F. Shahidi, K. Miyashita, U. Wanasundara) Black well Publishing, PP. 494-507.
2. Oosterveer, P. 2008. Governing global fish provisioning, Ownership and management of marine resources. *Ocean and Coastal Management*, 51: 797-805.
3. Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H. G. and Marshall, M.R. 2011. Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124: 640-645.
4. Mazorra-Manzano, M.A., Pacheco-Aguilar, R. and Ramírez-Suárez, J.C. 2012. Endogenous proteases in pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle as a processing aid in functional fish protein hydrolysate production. *Food and Bioprocess Technology*, 5: 130.
5. Soares de Castro, R.J., and Sato, H.H. 2014. Comparison and synergistic effects of intact proteins and their hydrolysates on the functional properties and antioxidant activities in a simultaneous process of enzymatic hydrolysis. *Food Bioproduct and Process*, 92: 80-88

با افزایش غلظت در نمونه‌های پپسین پایداری کف بیشتری داشتند. این نتایج مشابه یافته‌های (22، 39) بود. این محققان افزایش پایداری کف با افزایش غلظت را به علت تشکیل کف سخت‌تری عنوان کردند. نمونه‌های تولیدی با آلکالاز دارای درجه هیدرولیز پایین‌تری نسبت به پپسین و دارای پپتیدهای بزرگتر بود. طی 60 دقیقه پایداری کف نمونه‌های آلکالاز (62/5 - 15%) بیشتر از پپسین (300% - 15%) بود. این یافته‌ها همسو با نتایج اینتراسیریسوات و همکاران (2012) و چالامیه و همکاران (2015) (7، 18) بود. پپتیدهای با زنجیره بلندتر در هیدرولیز می‌تواند فیلم‌های انعطاف‌پذیر، ضخیم‌تر و قوی‌تری در اطراف حباب‌های هوا را تشکیل داده و از پایداری کف بالاتری برخوردار باشد (7). در مطالعه بر روی هیدرولیز پروتئین تخم ماهی کپور هیدرولیز با تریپسین کف پایداری (100-141%) پس از 30 دقیقه نسبت به پپسین و آلکالاز داشت (7). مطالعه دیگری نشان داد که نمونه‌های با درجه هیدرولیز پایین‌تر، زنجیره‌هایی با طول بیشتر داشت و در نتیجه کف پایداری بیشتری داشت. از دیدگاه آنها پروتئین در این سیستم باید بتواند به سرعت در سطح بین هوا- آب حرکت کرده و باز شده و مجدداً در سطح چیده شود. به طور کلی، تشکیل کف و ویژگی‌های امولسیون پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین اولیه تغییر می‌کند (18). از سوی دیگر پپتیدهای تولیدی در هیدرولیز ممکن است دارای اندازه مختلف و پپتیدهایی با بارهای مختلف باشند (25، 40). ظرفیت بالای کف می‌تواند در صنعت مواد غذایی برای کاربردهای مختلف مفید باشد (7).

#### 4- نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده در این مطالعه نشان دادند که تخم ماهی قزل‌آلا منبع پروتئینی خوبی جهت تولید پپتیدهای زیست‌فعال با کمک هیدرولیز آنزیمی است. بررسی ترکیب شیمیایی نمونه‌های هیدرولیز شده نشان‌دادند که تخم هیدرولیز شده ماهی به عنوان منبع خوبی از اسیدهای آمینه ضروری است.

2015. Angiotensin-I converting enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *International Journal of Molecular Science*, 16 (12): 28870–28885.
15. Adeli, A. and Baghaei F. 2013. Production and supply of rainbow trout in Iran and the world. *Fish and Marine Science*, 5(3): 335-341.
16. Mirsadghi, H. Alishahi, A. Shabanpuor, b. and Safari, R. 2015. Salt and water temperature curing effect on rainbow trout fish eggs qualitative changes (*Oncorhynchus mykiss*) during cold storage. *Journal of Fisheries Science and Technology*, 4:, 93-104.
17. Narsing Rao, G., Balaswamy, K., Satyanarayana, A.k. and Prabhakara Rao, P. 2012. Physico-chemical, amino acid composition, functional and antioxidant properties of roe protein concentrates obtained from (*Channa striatus* and *Lates calcarifer*). *Food Chemistry*, 132: 1171-1176.
18. Intarasirisawat, R., Benjakul, S., and Visessanguan, W. 2012. Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135,: 3039–3048.
19. Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Hemalatha, R. and Dinesh Kumar, B. 2013. Chemical composition, molecular mass distribution and antioxidant capacity of rohu (*Labeo ohita*) roe (egg) protein hydrolysates prepared by gastrointestinal proteases. *Food Research International*, 52: 221–229.
20. AOAC. 1995. Official methods of analysis. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
21. Klompong, V., Benjakul, S., Kantachota, 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: 1317–1327 .
22. Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F. 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103: 1385–1394 .
23. Yin, H., Pu, J., Wan, Y., Xiang, B., Bechtel, P.J. and Sathivel, S. 2010. Rheological and functional properties of Catfish skin protein
6. Hsu, K. 2010. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122: 42–48.
7. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Ramesh Kumar, R. and Dinesh Kumar, B. 2015. Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg (roe). *Nutrition*, doi,10.1016/j.nut.2014.08.006
8. Ktari, N., Fakhfakh, N., Balti, R., Ben Khaled, H., Nasri, M. and Bougatef, A. 2013. effect of degree of hydrolysis and protease type on the antioxidant activity of protein hydrolysates from cuttlefish (*sepia officinalis*) by-products. *Journal of Aquatic Food Products and Technology*, 22 (5): 436-448.
9. Neves, A.C., Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J. 2016. Angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase-IV inhibitory, and antioxidant activities of a blue mussel (*Mytilus edulis*) meat protein extract and its hydrolysates. *Journal of Aquatic Food Product and Technology*, 25 (8): 1221-1233.
10. Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates, Production, biochemical and functional properties. *Critical reviews. Food Science and Nutrition*, 40(1): 43-81.
11. Klompong, V., Benjakul, S. Kantachote, D., Hayes, K.D. and Shahidi, F. 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 43:1019–1026 .
12. Chalamaiah, M., Dinesh kumar, B., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates, Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications, A review. *Food Chemistry*, 135: 3020-3038.
13. Chalamaiah, M., Narsing Rao, G., Rao, D. G. and Jyothirmayi, T. 2010. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, 120: 652–657.
14. Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A. and Saari, N.

- hydrolysates. Food Bioprocess and Technology, doi:10.1007/s11947-016-1841-8
33. Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Slama-Ben, R.B., Mehiri, M., Hajji, M. and Nasri, M. 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. Process Biochemistry, 49: 963–972.
34. Nazeer, R.A., Deeptha, R., Jaiganesh, R., Sampathkumar, N.S. and Naqash, S.Y. 2011. Radical scavenging activity of Seela (*Sphyræna barracuda*) and Ribbon fish (*Lepturacanthus savala*) backbone protein hydrolysates. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 17:209–216.
35. Kim, S. and Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: A review. Journal of Functional Food, 2: 1–9.
36. Je, J.Y., Lee, K.H., Lee, M.H. and Ahn, C.B. 2009. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. Food Research International, 42: 1266–1272.
37. Wiriayaphan, C., Chitsomboon, B. and Yongsawadigul, J. 2012. Antioxidant activity of protein hydrolysates derived from threadfin bream surimi byproducts. Food Chemistry, 132: 104–111.
38. Zhao, Q., Xiong, H., Selomulya, C., Dong Chen, X., Zhong, H., Wang, S., Sun, W. and Zhou, Q. 2012. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. Food Chemistry, 134: 1360–1367.
39. Lawal, O.S. 2004. Functionality of African locust bean (*Parkia biglobosa*) protein isolate: effects of pH, ionic strength and various protein concentrations. Food Chemistry, 86: 345–355.
40. Pacheco-Aguilar, R., Mazorra-Manzano, M.A. and Ramirez-Suarez, J.C. 2008. Functional properties of fish protein hydrolysates from Pacific whiting (*Merluccius productus*) muscle produced by a commercial protease. Food Chemistry, 109:782–789.
- hydrolysates. Journal of Food Science, 75: E11-E17
24. Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W. and Bechtel, P.J. 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates. Journal of Food Science, 70: 401–406.
25. Sathivel, S., Bechtel, P.J., Babbitt, J., Smiley, S., Crapo, C., Reppond, K.D. and Prinyawiwatkul, W. 2003. Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. Journal of Food Science, 68: 2196–2200.
26. Lu, H., Luo, Y. and Feng, L. 2014. Effects of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales on rancidity stability and gel properties of fish products. Food and Bioprocess Technology, 7: 2178-218.
27. Hur, S.J., Choi, J.S. and Jin, S.K. 2016. Effect of Freeze-Dried Mechanically Deboned Spent Laying Hen Hydrolysates on the Quality Characteristics of Boiled Fish Paste. Food and Bioprocess Technology, 9: 1169-1176.
28. Wu, H., Chen, H. and Shiau, C. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949–957.
29. Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N.M. and Nunes, M.L. 2010. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbard fish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry, 45: 18–24.
30. Jun, S.Y., Park, P.J., Jung, W. K. and Kim, S.K. 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology, 219: 20–26.
31. Lu, H., Luo, Y. and Feng, L. 2014. Effects of hydrolysates from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) Scales on rancidity stability and gel properties of fish products. Food and Bioprocess Technology, 7: 2178-2188 .
32. Ketnawa, S. and Liceaga, A.M. 2016. Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein