

Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna Head

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Esmaeili Kharyeki M.¹ PhD,
Rezaei M.* PhD,
Khodabandeh S.² PhD,
Motamedzadegan A.³ PhD

How to cite this article

Esmaeili Kharyeki M, Rezaei M, Khodabandeh S, motamedzadegan A. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna Head. Journal of Fisheries Science and Technology. 2018;7(1):57-64.

*Seafood Processing Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

¹Seafood Processing Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

²Marine Biology Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University University, Noor, Iran

³Food Sciences and Technology Department, Agriculture Sciences Faculty, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran

Correspondence

Address: Seafood Processing Department, Marine Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Noor, Iran

Phone: -

Fax: -
rezaei_ma@modares.ac.ir

Article History

Received: April 19, 2016

Accepted: December 19, 2016

ePublished: March 20, 2018

ABSTRACT

Aims Skipjack tuna has the highest level of catch rate among tuna all over the world. Its head contains about 64% protein. Many Protein Hydrolysates and peptides obtained from various marine sources have a high antioxidant power. The aim of this study was to investigate the antioxidant activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna head.

Materials & Methods In this experimental study, 30 Skipjack tunas were investigated. At first, the amount of different compounds (protein, fat, ash, and moisture) was evaluated in the raw material; then, the hydrolysis process was performed by Alcalase enzyme and the hydrolysis degree of the protein hydrolysate was evaluated at different times. The antioxidant activity of the protein hydrolysate mixture was measured by DPPH radical scavenging activity, iron revival power, and ABTS radical inhibitory activity. For data analysis, the analytical tests were used.

Findings The main part of the fish head was protein and it had high levels of ash. The degree of hydrolysis increased with increasing time and was it significant at 15, 60, and 120 minutes ($p < 0.05$), but not significant at 120 and 240 minutes ($p < 0.05$). DPPH radical scavenging activity increased with increasing hydrolysis time and there was a significant difference in all samples obtained from different times ($p < 0.05$). The iron reduction capacity of the protein hydrolysate samples increased with increasing the hydrolysis time, and the highest amount was at 240 minute. The samples obtained from different times had a significant difference in iron reduction capacity ($p < 0.05$). Increasing the concentration of protein hydrolysate increased inhibitory activity ($p < 0.05$).

Conclusion Protein hydrolysate in Skipjack tuna head has a high antioxidant activity and can be used in food products to increase oxidation stability.

Keywords Protein Hydrolysate; Fish Head; Skipjack tuna; Degree of Hydrolysis; Antioxidant Activity

CITATION LINKS

[1] Physiological properties of tuna ... [2] Antioxidant and anti-inflammatory peptide ... [3] Evaluation of the biomethane potential ... [4] Functions, applications and production of protein ... [5] Antioxidant activity of bigeye ... [6] Marine proteins and peptides ... [7] Rethinking food-derived bioactive ... [8] The effect of organic acids on gelation ... [9] Fish protein hydrolysates production ... [10] A novel anticoagulant purified from ... [11] Antioxidant and antihypertensive ... [12] Angiotensin I-converting enzyme ... [13] Applications of antimicrobial ... [14] Antioxidant properties of ... [15] Purification, characterization and ... [16] Purification and determination of ... [17] Antioxidant activity of Cod ... [18] Purification and characterization ... [19] Antioxidant properties of Salmon ... [20] Food protein-derived bioactive ... [21] Official Methods of ... [22] Quality of fish protein ... [23] Protein measurement with ... [24] Antioxidative properties of ... [25] Studies on products of browning ... [26] Squid gelatin hydrolysates ... [27] Nutritional evaluation in five ... [28] Characterization of protein ... [29] Chemical characterization and ... [30] Influence of hydrolysis degree on the ... [31] Biochemical and functional ... [32] Protein hydrolysates from meriga ... [33] Fish protein hydrolysates: Production ... [34] Compositions, functional properties ... [35] Chemical and physicochemical properties ... [36] Influence of the extent of enzymatic ... [37] Optimization of enzymatic ... [38] Improvement of color and physiological ... [39] Enzymatic hydrolysis of proteins ... [40] Extraction of oil from mackerel ... [41] Antioxidant and biochemical ... [42] Production and characteristics ... [43] Production of tuna waste ... [44] Enzymic processing of marine ... [45] Enzymatic hydrolysis of by-products ... [46] Comparative study on the proteases ... [47] Functionalities and antioxidant ... [48] Antioxidative properties of peptides ... [49] Fish protein hydrolysates: Proximate ... [50] Purification of antioxidative peptides ... [51] Free amino acids and ... [52] Purification and identification ... [53] Antioxidative activity and ... [54] Antioxidant and free ... [55] Antioxidant activity ...

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی

مینا اسمعیلی‌خاریکی PhD

گروه فرآوری محصولات شیلانی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

مسعود رضایی* PhD

گروه فرآوری محصولات شیلانی، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

صابر خداینده PhD

گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس، نور، ایران

علی معتمدزادگان PhD

گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

چکیده

اهداف: ماهی هورر مسقطی بالاترین صید جهانی تون‌ماهیان را دارد. سر ماهی حاوی حدود ۶۴٪ پروتئین است. بسیاری از پروتئین‌های هیدرولیزشده و پپتیدهای حاصل از منابع مختلف دریایی قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارند. هدف پژوهش حاضر بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، ۳۰ قطعه سر ماهی هورر مسقطی تهیه شد. ابتدا درصد ترکیبات مختلف (پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت) در ماده اولیه ارزیابی شد و سپس توسط آنزیم آلكالاز، فرآیند هیدرولیز انجام گرفت و درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیزشده در زمان‌های مختلف ارزیابی شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی مخلوط پروتئین هیدرولیزشده با روش‌های فعالیت حذف رادیکال DPPH، قدرت احیای آهن و فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS مورد سنجش قرار گرفت. برای تحلیل داده‌ها از آزمون‌های آماری استنباطی استفاده شد.

یافته‌ها: بخش عمده سر ماهی حاوی پروتئین بود و خاکستر بالایی داشت. درجه هیدرولیز با افزایش زمان افزایش یافت و بین زمان‌های ۱۵، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه معنی‌دار بود ($p < 0.05$)، اما در ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه معنی‌دار نبود ($p > 0.05$). فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH با افزایش زمان هیدرولیز افزایش یافت و در تمامی نمونه‌های حاصل از زمان‌های مختلف اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$). با افزایش مدت‌زمان هیدرولیز، قدرت کاهندگی آهن نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده افزایش یافت که بالاترین مقدار در ۲۴۰ دقیقه بود. نمونه‌های حاصل از زمان‌های مختلف، تفاوت معنی‌داری در قدرت کاهندگی آهن داشتند ($p < 0.05$). با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده، فعالیت مهارکنندگی افزایش یافت ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و می‌تواند در فرآورده‌های غذایی به‌منظور افزایش پایداری اکسیداسیونی به کار رود.

کلیدواژه‌ها: پروتئین هیدرولیزشده، سر ماهی، هورر مسقطی، درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۱/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۹/۲۸

*نویسنده مسئول: rezaei_ma@modares.ac.ir

مقدمه

سالیانه حدود ۴ میلیون تن، ماهی تون در جهان صید می‌شود^[1] و ماهی هورر مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) که عمدتاً برای تولید کنسرو استفاده می‌شود، بالاترین میزان صید جهانی تون‌ماهیان را به خود اختصاص داده است. طبق گزارش سازمان خوار و بار جهانی میزان صید این گونه در سال ۲۰۱۴ بیش از ۲/۷ میلیون تن رسید که بیش از نیمی از صید این سازمان را شامل می‌شود. طی فرآیند کنسروسازی ماهیان در حدود ۴۵ تا ۵۰٪ از وزن ماده اولیه به ضایعات تبدیل می‌گردد^[2-4]. سر ماهی یکی از عمده‌ترین آنها است و حدود ۶۴٪ پروتئین (بر مبنای وزن خشک)

دارد^[5]. پروتئین‌ها ترکیبات ضروری بافت موجودات زنده هستند که در فرآیندهای فیزیولوژیک متعددی در سلول‌ها نقش دارند. در مواد غذایی نیز پروتئین‌ها یک درشت‌مغذی مهم به‌عنوان منبع انرژی و اسیدهای آمینه مطرح هستند. بسیاری از خواص فیزیولوژیک و کارکردی پروتئین‌ها با پپتیدهای زیست‌فعال موجود در ساختارشان مرتبط است. این پپتیدها معمولاً ۳ تا ۲۰ آمینواسید دارند، اما در برخی از موارد این محدوده گسترش می‌یابد. تحقیقات نشان داده‌اند که بیشتر پپتیدهای زیست‌فعال در توالی پروتئین اصلی خود غیرفعال هستند^[6]، اما پس از آزادشدن طی فرآیند هضم گوارشی یا با استفاده از روش‌های مختلف فرآوری، فعالیت فیزیولوژیک نشان می‌دهند^[2]. الگوهای مختلف پروتئولیز و هضم می‌توانند موجب تولید ترکیبات پپتیدی مختلف و تغییر در فعالیت زیستی و حتی کاهش کارایی آنها شوند^[6-8].

هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها شرایط واکنش ملایم‌تری را فراهم می‌کند، خواص کارکردی و تغذیه‌ای را بهبود بخشیده و محصول نهایی نیز قابلیت پیش‌بینی بیشتری دارد^[9]. این روش به‌عنوان کارآمدترین روش بازیافت پروتئین‌هایی با ارزش افزوده بالا از ضایعات ماهی، بدون از دست‌دادن ارزش غذایی‌شان، شناخته شده است^[2].

پروتئین هیدرولیزشده مخلوطی از قسمت‌های مختلف پپتیدی با محدوده متنوعی از وزن‌های مولکولی و خواص زیست‌فعال است^[6]. پپتیدهای زیست‌فعال ویژگی‌های کارکردی متفاوتی دارند و عملکردهای ضد میکروبی، تقویت سیستم ایمنی، مهارکنندگی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسن I، بازدارندگی رنین، عملکرد ضد انعقادی، خواص ضد سرطان، ضد تومور، ضد دیابت و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها در مطالعات متعدد بررسی شده است^[7, 10-18].

پراکسیداسیون لیپیدها یکی از نگرانی‌های اصلی در صنایع غذایی است، زیرا ترکیبات اکسیدشده‌ای که طی این فرآیند تولید می‌شوند، دلیل اصلی کاهش کیفیت مواد غذایی حاوی چربی در فرآوری و نگهداری هستند که نتیجه آن ایجاد بوی فساد، طعم نامطلوب، تغییر رنگ و بافت، تولید ترکیبات سمی و از دست‌رفتن ارزش غذایی آنها است^[6]. به‌علاوه، فرآیندهای اکسیداتیو در بدن با بیماری‌های متعددی مرتبط است. واکنش‌های وابسته به اکسیژن و تنفس‌های هواری با توجه به نقش فیزیولوژیک‌شان طی تنفس، مطلوب هستند، اما افزایش این واکنش‌ها در بدن می‌تواند موجب تولید بیش از حد شکل‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد شود. مقادیر بالای این ترکیبات باعث تخریب DNA، غشاهای سلولی، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و سایر ترکیبات سلولی می‌شود که در نهایت بیماری‌های مزمن متعددی را ایجاد می‌کند. بنابراین به‌منظور جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها در مواد غذایی و با توجه به نیاز به مصرف آنتی‌اکسیدان‌ها برای تقویت عملکرد آنتی‌اکسیدانی بدن، تولید ترکیبات آنتی‌اکسیدانی خوراکی رو به گسترش است^[19].

آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند BHA (بوتیل هیدروکسی‌تولوئن)، BHT (بوتیل هیدروکسی‌آنیزول)، TBHQ (تری‌بوتیل هیدروکینون) و پروپیل‌گالات، برای به‌تاخیراندختن اکسیداسیون لیپیدها و افزایش عمر ماندگاری محصولات غذایی استفاده می‌شوند اما به‌تازگی استفاده از برخی از این آنتی‌اکسیدان‌ها به‌عنوان افزودنی غذایی، به‌دلیل داشتن خطرهایی برای سلامت مصرف‌کننده، بسیار محدود شده است^[6, 19]. بنابراین استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی با منشا غذایی و ایمن، به‌عنوان جایگزین ضروری است^[20]. مطالعات علمی متعددی

(IKA؛ آلمان) مخلوط شدند. سپس pH مخلوط با استفاده از pH متر 3510 (UK؛ GENWAY) سنجش و به وسیله سود (NaOH یک نرمال) به ۷/۵ رسانده شد. ظروف شیشه‌ای حاوی نمونه در یک دستگاه انکوباتور متحرک (Comecta؛ اسپانیا) با سرعت حرکت ۲۰۰ دور در دقیقه و در دمای $55 \pm 1^\circ\text{C}$ قرار گرفتند. دمای مخلوط با استفاده از دماسنج اندازه‌گیری شد و هنگامی که به 55°C رسید، آنزیم آلکالاز به نسبت ۱/۵٪ (بر مبنای وزن ماده اولیه) به نمونه‌ها اضافه و هیدرولیز آغاز شد. پس از گذشت ۴ ساعت، برای قطع واکنش آنزیمی، ظروف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی 90°C قرار داده شدند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، به مدت ۳۰ دقیقه و با ۶۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ Hettich Universal 320R (آلمان) شدند. فاز مایع جدا شد و با استفاده از فیلترهای کاغذی و پمپ خلا جداسازی کامل تر ذرات جامد از فاز محلول صورت گرفت. نمونه‌ها در دو مرحله فیلتر شدند.

تعیین درجه هیدرولیز: درجه هیدرولیز براساس روش هیل و مریت^[22] با استفاده از تری کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر پروتئین هیدرولیز شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ مخلوط و سپس با دور ۸۰۰۰ دور در دقیقه در دمای 4°C به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری^[23] و با استفاده از آلومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد و خواندن جذب نمونه‌ها با اسپکتروفتومتر میکروپلیت Epoch (بیوتک؛ ایالات متحده) تعیین و درجه هیدرولیز با معادله زیر محاسبه شد:

$$\text{درجه هیدرولیز} = \frac{\text{میزان تیتر در محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰\%}}{\text{میزان تیتر در نمونه}} \times 100$$

درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های مختلف (۱۵، ۶۰، ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه) ارزیابی شد.

فعالیت آنتی اکسیدانی مخلوط پروتئین هیدرولیز شده با روش‌های مختلف زیر ارزیابی شد.

فعالیت حذف رادیکال DPPH (دیفنیل پیکریل هیدرازیل): برای بررسی فعالیت حذف رادیکال آزاد دیفنیل پیکریل هیدرازیل از روش شیمادا^[24] و همکاران با تغییرات اندک استفاده شد. براساس این روش ۵۰۰ میکرولیتر محلول DPPH (۱۶/۰ میلی مولار در اتانول ۹۶٪) با ۵۰۰ میکرولیتر نمونه مخلوط و سپس به خوبی ورتکس شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر خوانده شد. برای مقایسه، آسکوربیک اسید در غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر مورد استفاده قرار گرفت. ظرفیت حذف رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درجه مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

قدرت احیای آهن ($\text{Fe}^{2+} \leftarrow \text{Fe}^{3+}$): براساس روش ویلیری^[25] ۱۰۰ میکرولیتر نمونه رقیق شده با ۲۵۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات (۲/۰ مول؛ $\text{pH} = 6/6$) و ۲۵۰ میکرولیتر فری سیانید پتاسیم ۱٪ مخلوط شد. سپس محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای 50°C انکوباسیون شد. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۱۰٪ به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. پس از آن ۲۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی با

نشان می‌دهند که بسیاری از پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای حاصل از منابع مختلف دریایی شامل ماهی‌ها، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان یا محصولات جنبی آنها نیز توانایی آنتی اکسیدانی بالایی داشته و می‌توانند در غذاهای کارکردی، صنایع دارویی و غذا داروها استفاده شوند^[6]. پروتئین‌های هیدرولیز شده با توجه به ساختار، اندازه و توالی آمینواسیدی پپتیدهای شان، فعالیت آنتی اکسیدانی مختلفی دارند که این ویژگی‌ها تحت تاثیر منبع پروتئین و شرایط فرایند هیدرولیز قرار دارند^[7]. بنابراین به منظور استفاده بهینه از این مواد اولیه و تولید محصولاتی با ارزش برای مصرف انسانی، می‌توان از فرایند هیدرولیز آنزیمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده و پپتیدهای زیست فعال استفاده کرد.

پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی انجام شد.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، ۳۰ قطعه سر ماهی هورر مسقطی از کارخانه تولید کنسرو ماهی (آذین مهر خزر؛ بابل سر؛ ایران) تهیه و به وسیله اهر برقی صنعتی قطعه قطعه و سپس به صورت منجمد به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلانی منتقل شدند. سرهای ماهی پس از شست و شو با چرخ گوشت کاملاً چرخ شده و تا زمان استفاده در بسته‌های پلاستیکی در دمای 20°C نگهداری شدند. آنالیز درصد رطوبت، خاکستر، پروتئین و چربی به صورت زیر محاسبه شد.

درصد رطوبت: مقدار رطوبت از طریق رابطه زیر و براساس اختلاف وزن حاصل از قرارگیری نمونه به مدت ۲۴ ساعت در آون U30 (Memmert؛ آلمان) با دمای 105°C به دست آمد^[21]:

$$\text{درصد رطوبت} = \frac{\text{وزن اولیه} - \text{وزن نهایی}}{\text{وزن اولیه}} \times 100$$

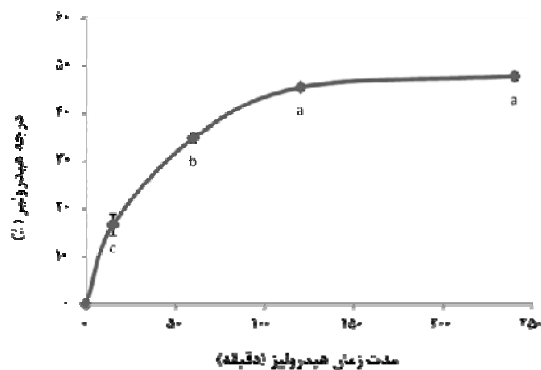
درصد خاکستر: برای تعیین میزان خاکستر، ۵ گرم از نمونه (که از قبل در آون با دمای 65°C به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفته بود)، در کوره L5/11/B170 (Nabertherm؛ آلمان) با دمای 550°C به مدت ۵ ساعت سوزانده شد و مقدار خاکستر از طریق رابطه زیر به دست آمد^[21]:

$$\text{درصد خاکستر} = \frac{\text{وزن نمونه چربی} - \text{وزن نمونه همراه با نمونه نهایی}}{\text{وزن نمونه}} \times 100$$

درصد پروتئین: میزان پروتئین نمونه با استفاده از دستگاه کدال Kjeltex 2300 (Foss؛ سوئیس) و ضریب تبدیل ۶/۲۵ محاسبه شد^[21].

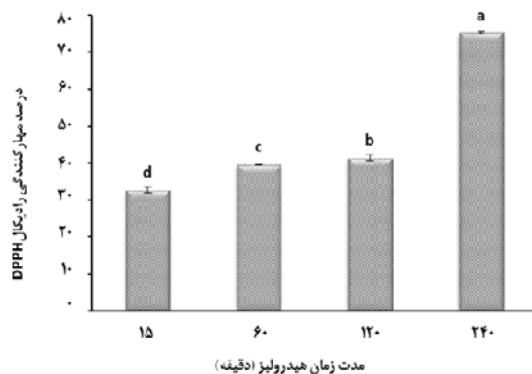
درصد چربی: میزان چربی نمونه با استفاده از دستگاه سوکسله Soxtec 2050 (Foss؛ سوئیس) سنجش شد^[21].

هیدرولیز آنزیمی: فرایند هیدرولیز آنزیمی سر ماهی تون به روش ویسی پور و همکاران^[9] با تغییرات اندک انجام شد. مقدار ۵۰ گرم از نمونه‌های چرخ شده، در ظروف شیشه‌ای درب دار ۵۰۰ میلی لیتری ریخته شدند. ظروف حاوی نمونه به منظور غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی (Memmert؛ آلمان) 90°C قرار گرفتند. پس از خنک شدن در دمای محیط، ۵۰ میلی لیتر آب مقطر به نمونه‌ها اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی RHD



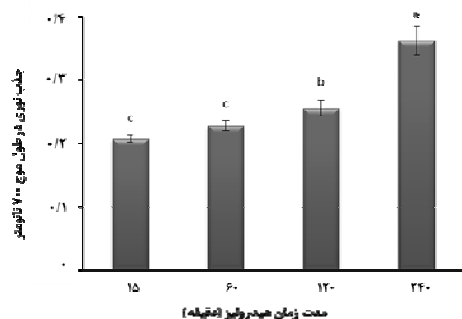
نمودار (۱) روند تغییرات درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی در زمان های مختلف

پروتئین های هیدرولیز شده حاصل از زمان های مختلف، فعالیت مهارکنندگی متفاوتی نشان دادند. فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH با افزایش مدت زمان هیدرولیز افزایش یافت و بین تمامی نمونه های حاصل از زمان های مختلف اختلاف معنی داری در مهارکردن رادیکال DPPH مشاهده شد ($p < 0.05$; نمودار ۲).



نمودار (۲) اثر مدت زمان هیدرولیز بر توانایی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی در حذف رادیکال DPPH

با افزایش مدت زمان هیدرولیز، قدرت کاهندگی آهن نمونه های پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت و بالاترین مقدار در زمان ۲۴۰ دقیقه مشاهده شد. نمونه های حاصل از زمان های مختلف اختلاف معنی داری در قدرت کاهندگی آهن نشان دادند ($p < 0.05$; نمودار ۳). با افزایش غلظت آسکوربیک اسید قدرت کاهندگی آهن آن



نمودار (۳) اثر مدت زمان هیدرولیز بر فعالیت کاهندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی

۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر کلرید فریک آبدار ۱٪ به خوبی مخلوط و پس از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نمونه ها در ۷۰۰ نانومتر خوانده شد. قدرت کاهندگی آهن در پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی تون در زمان های مختلف بررسی شد. در این روش در صورتی که پروتئین هیدرولیز شده دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشد، رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می گردد و هرچه رنگ سبز قوی تر باشد، نشان دهنده فعالیت کاهندگی بالاتر است.

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (۲ و ۳-آزینو-بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید): برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش آلمن و همکاران [26] استفاده شد. محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگهداری شد. پس از طی زمان مورد نظر، رقیق سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب 0.7 ± 0.02 در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق سازی شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای 30°C انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر جذب نمونه ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه نیز از غلظت های مختلف آسکوربیک اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با فرمول زیر محاسبه شد:

$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

برای تجزیه و تحلیل داده ها از آزمون های آماری استنباطی استفاده شد.

یافته ها

بخش عمده سر ماهی حاوی پروتئین بود و همچنین مقدار خاکستر بالایی نیز داشت. پروتئین هیدرولیز شده تولیدی، دارای خلوص بالا بود و بخش عمده آن را پروتئین تشکیل می داد؛ اگر چه به دلیل بالابودن مقدار خاکستر در ماده اولیه، محصول تولیدی نیز دارای درصد قابل توجهی خاکستر بود. میزان چربی در بافت سر ماهی قابل توجه بود ولی در پروتئین هیدرولیز شده تا حدود زیادی طی فرآیند تولید، حذف و جداسازی شد (جدول ۱).

جدول (۱) میانگین آماری ترکیبات مختلف ماده اولیه سر ماهی هورر مسقطی

درصد تقریبی	سر ماهی هورر مسقطی	پروتئین هیدرولیز شده
رطوبت	66.10 ± 1.65	7.22 ± 0.21
پروتئین	19.86 ± 0.46	81.26 ± 1.44
چربی	7.83 ± 0.40	1.88 ± 0.17
خاکستر	6.22 ± 0.90	8.84 ± 0.95

درجه هیدرولیز با افزایش مدت زمان هیدرولیز افزایش یافت، به گونه ای که پس از ۱۵ دقیقه $16.55 \pm 1.32\%$ و در پایان فرآیند هیدرولیز $47.78 \pm 0.81\%$ بود. اختلاف درجه هیدرولیز بین زمان های ۱۵، ۶۰ و ۲۴۰ دقیقه معنی دار بود ($p < 0.05$) اما بین زمان های ۱۲۰ و ۲۴۰ دقیقه با وجود روند افزایشی اختلاف معنی داری مشاهده نشد ($p > 0.05$; نمودار ۱).

ارزشمندی به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده شود. در مطالعه‌ای که از سوی کارونا/تتا و همکاران [27] انجام شد، درصد پروتئین سر ماهی هورر مسقطی ۲۰/۴۸ برآورد شده است که تقریباً مشابه با پژوهش حاضر است.

باتیسیئا و همکاران [28] مطالعه‌ای کردند که میزان پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت سر ماهی اسکابارد سیاه به ترتیب ۱۴/۹۲، ۱۰/۱۳، ۳/۵۳ و ۷۰/۳۹٪ است و بیان داشتند بالابودن درصد خاکستر نسبت به بخش‌های خوراکی همین ماهی (۱/۲-۰/۹) می‌تواند به دلیل وجود مقادیر بالای استخوان در ماده اولیه باشد. بالابودن مقدار خاکستر در سر ماهی تون در پژوهش حاضر نیز ممکن است به همین دلیل باشد.

در مطالعات متعددی ترکیب شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از منابع مختلف ارزی بررسی شد. بسیاری از محققان میزان پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده را بین ۶۰ تا ۹۰٪ کل ترکیبات گزارش داده‌اند [29-31]. میزان بالای پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی (۸۱/۲۶±۱/۴۴) می‌تواند نشان‌دهنده توانایی بالقوه این محصول برای استفاده به عنوان یک مکمل غذایی برای مصارف انسانی باشد. بالابودن مقدار پروتئین در انواع مختلف پروتئین هیدرولیز شده ماهی در نتیجه انحلال پروتئین‌ها طی فرآیند هیدرولیز و حذف ترکیبات غیرمحلول جامد به وسیله سانتریفیوژ است [32].

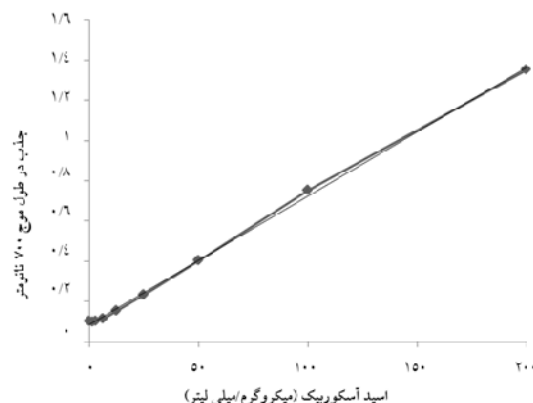
میزان چربی در پروتئین هیدرولیز سر ماهی تون نسبت به ماده اولیه کاهش قابل توجهی نشان داد که دلیل آن می‌توانست اتصال چربی به پروتئین‌های نامحلول پس از شکسته شدن پیوندهای پپتیدی طی فرآیند هیدرولیز و رسوب آنها هنگام سانتریفیوژ باشد [33]. در پژوهش‌های سایر محققان نیز میزان چربی در پروتئین‌های هیدرولیز شده کمتر از ۵٪ گزارش شده است [29-31].

مقدار رطوبت در پروتئین هیدرولیز شده به نوع ماده و روش انتخاب شده برای خشک کردن بستگی دارد. بسیاری از پژوهش‌ها مقدار رطوبت در پروتئین هیدرولیز شده ماهی را کمتر از ۱۰٪ گزارش داده‌اند [29, 32, 34, 35]. مقدار به دست آمده در پژوهش حاضر نیز با این نتایج هم خوانی دارد.

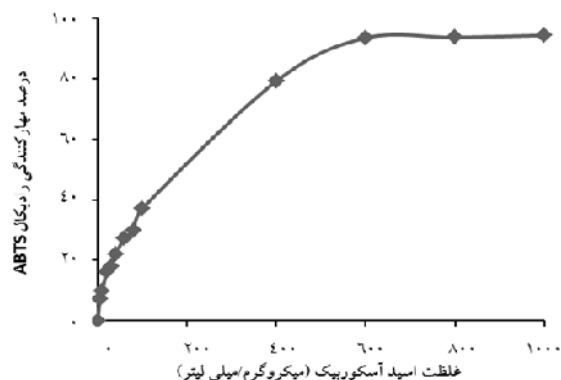
مقدار خاکستر در پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی ۸/۸۴±۰/۹۵٪ به دست آمد. میزان خاکستر در پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از گونه‌های مختلف آبزیان نیز بین ۰/۴۵ تا ۲۷٪ گزارش شده است [32, 36, 37]. تفاوت در میزان خاکستر محصول می‌تواند به تفاوت در نوع ماده اولیه و فرآیند هیدرولیز مرتبط باشد. همچنین ممکن است استفاده از اسید و باز طی فرآیند هیدرولیز به منظور تنظیم pH، یکی از دلایل بالابودن میزان خاکستر در برخی از نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده ماهی باشد [29, 30, 38].

انتخاب آنزیم نقش بسیار مهمی در تولید پروتئین هیدرولیز شده از ماهی و ضایعات آن دارد. طبق پژوهش‌های متعدد، آنزیم آلکالاز بهترین آنزیم برای استخراج پروتئین از ماهی و ضایعات آن است [30, 33, 39]. آلکالاز به طور عمده به دلیل تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز بالا در مدت زمان کم، به طور مکرر از سوی محققان مختلف استفاده شده است [40]. در پژوهش دونگ و همکاران [41] فیله ماهی کپور نقره‌ای با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز و درجه هیدرولیز در زمان‌های مختلف بررسی شد. با توجه به نتایج درجه هیدرولیز در زمان ۱۸۰ و ۳۶۰ دقیقه به ترتیب ۲۰ و ۲۳٪ گزارش شد که کمتر از میزان مشاهده شده در پژوهش حاضر بود. این اختلاف می‌تواند به دلیل تفاوت در نوع ماده اولیه، فرآیند

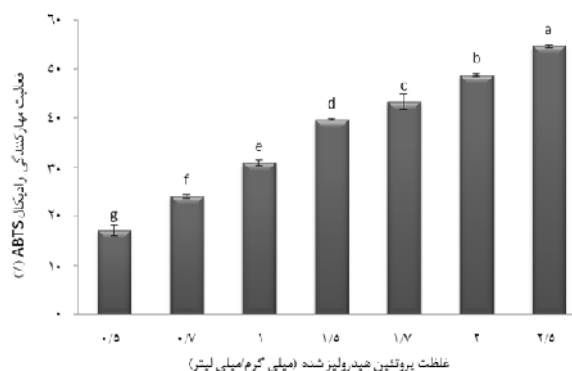
با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده و آسکوربیک اسید فعالیت مهارکنندگی به طور معنی داری افزایش یافت ($p < 0.05$ ؛ نمودارهای ۵ و ۶).



نمودار ۴) فعالیت کاهندگی یون آهن در غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید



نمودار ۵) فعالیت غلظت‌های مختلف آسکوربیک اسید در حذف رادیکال ABTS



نمودار ۶) توانایی غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی در حذف رادیکال ABTS

بحث

پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هورر مسقطی انجام شد. ترکیب شیمیایی یک ماده غذایی با توجه به میزان تامین مواد مغذی ضروری برای بدن، نقش مهمی در سلامت مصرف کننده دارد.

آنالیز تقریبی سر ماهی هورر مسقطی نشان داد سر این ماهی میزان بالایی پروتئین داشت و می‌تواند به عنوان منبع پروتئینی

هیدرولیز و شرایط واکنش برای عملکرد بهینه آنزیم باشد. طبق گزارش بسیاری از محققان دمای 55°C دمای بهینه برای فعالیت آنزیم آلکالاز است و در این پژوهش نیز همین دما استفاده شد [42، 43].

با توجه به نتایج پژوهش حاضر، افزایش درجه هیدرولیز طی ۱ ساعت اول سرعت بالایی داشته و سپس این افزایش تا پایان ۴ ساعت هیدرولیز به‌کندی صورت گرفت. در مطالعه رامکریشن و همکاران [40] نیز روند مشابهی مشاهده شد. همچنین شهیدی و همکاران [42]، جرارد و همکاران [43] و گیوگوری و همکاران [30]، فرآیند هیدرولیز را در زمان‌های ۱ تا ۵ ساعت بررسی کردند، نتایج حاصله مشابه بود. بافت ماهی ترکیب بسیار پیچیده و حاوی مقادیر بالایی بازدارنده‌های پروتئیناز است که تفسیر فرآیند هیدرولیز و روند تغییرات آن را سخت و پیچیده می‌کند [44].

لیاست و همکاران [45] بیان کردند طی هیدرولیز ماهی‌کاد با آنزیم‌های پپسین، آلکالاز و نئوتراز، سازوکار واکنش از دو فرآیند سینتتیک پیروی می‌کند. در فرآیند اول یک واکنش سریع اولیه که در آن زنجیره‌های پلی‌پپتیدی با باندهای سست‌تر گسسته می‌شوند و قطعات پروتئینی محلول به‌وجود می‌آیند و در فرآیند دوم پروتئین‌های متراکم و فشرده هضم می‌شوند، همچنین بیان کردند سازوکار واکنش آهسته در مراحل پایانی ممکن است به‌دلیل کاهش در فعالیت آنزیم، اشباع‌شدن سوبسترا یا بازدارندگی محصول باشد. کاهش در سرعت افزایش درجه هیدرولیز می‌تواند به‌دلیل کاهش در غلظت ماده اولیه نیز باشد [40].

پروتئین‌های هیدرولیز‌شده پپتیدهایی دارند که الکترون‌دهنده بوده و می‌توانند با رادیکال‌های آزاد واکنش داده و آنها را به ترکیبات پایدارتر تبدیل کنند. نتیجه این عملکرد متوقف‌کردن واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون خواهد بود [46]. پپتیدهای مختلف با اندازه و توالی‌های آمینواسیدی متفاوت، ممکن است فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی نشان دهند [47]. سازوکار عمل پپتیدها به‌عنوان آنتی‌اکسیدان به‌طور واضح مشخص نیست، اما آمینواسیدهایی مانند هیستیدین، سیستئین، والین، پرولین، فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان نقش مهمی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و پروتئین هیدرولیز‌شده ماهی دارند [48]. پپتیدها نسبت به آمینواسیدهای آزاد فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری دارند که به‌دلیل ساختار فیزیکی و شیمیایی آنها است [49]. انتخاب آنزیم پروتئولیتیک مناسب عامل بسیار مهمی برای رهاسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از پروتئین ماهی است. آنزیم‌هایی مانند آلکالاز، آلفاکیموتریپسین، پروتامکس و تریپسین به‌طور موفقیت‌آمیزی برای تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدان از منابع پروتئینی ماهی بررسی شده‌اند [28، 50، 51].

در کنار انتخاب آنزیم مناسب، شرایط فیزیکی و شیمیایی فرآیند هیدرولیز مانند دما و pH بهینه برای عملکرد مناسب آنزیم و همچنین مدت‌زمان هیدرولیز عوامل موثر در تولید پروتئین هیدرولیز‌شده با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند [49]. در پژوهش حاضر افزایش مدت‌زمان هیدرولیز منجر به افزایش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) فعالیت مهارکنندگی رادیکال آزاد شد و بالاترین میزان مهارکنندگی رادیکال DPPH در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان ۴ ساعت و بیش از ۷۰٪ به دست آمد. در پژوهش جی و همکاران [11] فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در پروتئین هیدرولیز‌شده ستون فقرات ماهی تون در غلظت‌های مختلف بررسی و بالاترین میزان مهارکنندگی در غلظت ۱/۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۶۵٪ گزارش شد.

روش سنجش قدرت کاهندگی نیز اغلب برای ارزیابی توانایی یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی در دادن الکترون یا هیدروژن استفاده می‌شود. در مطالعات متعددی بیان شده که ارتباط مستقیمی بین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهندگی یک ترکیب زیست‌فعال وجود دارد. در این روش توانایی پروتئین هیدرولیز‌شده در کاهش دادن یون Fe^{3+} به یون Fe^{2+} ارزیابی می‌شود [52]. نتایج پژوهش حاضر نشان داد که افزایش مدت‌زمان هیدرولیز به افزایش معنی‌دار ($p \leq 0.05$) قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز‌شده منجر شد که مشابه نتایج به‌دست‌آمده مطالعات بوگاتف و همکاران [52] و آلمن و همکاران [26] است. تغییر در اندازه، ساختار و مقدار آمینواسیدها و پپتیدها در اثر گذشت زمان هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی را تحت تاثیر قرار می‌دهد [51].

طبق نتایج پژوهش حاضر، پروتئین‌های هیدرولیز‌شده با درجه‌های هیدرولیز متفاوت فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال DPPH و کاهندگی یون آهن) متفاوتی نشان دادند و با افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی افزایش یافت. این نتایج مشابه نتایج گزارش شده در پژوهش نالینان و همکاران [47] است. در مقابل کلومپونگ و همکاران [53] اختلاف معنی‌داری در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز‌شده با درجه‌های هیدرولیز ۵ تا ۲۵٪ مشاهده نکردند. اختلاف در گزارش‌ها می‌تواند به‌دلیل تفاوت در ماده اولیه، نوع آنزیم پروتئاز و شرایط هیدرولیز باشد که موجب تولید پپتیدهایی با ساختار و عملکرد متفاوت می‌شود [54].

یکی دیگر از روش‌های سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی، ارزیابی قدرت مهار رادیکال ABTS است که یکی از روش‌های بسیار خوب برای بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات الکترون‌دهنده و ترکیباتی است که واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیونی را با مهار رادیکال‌های پروکسیل‌لیپید متوقف می‌کنند [47]. نتایج این پژوهش نشان داد که پروتئین هیدرولیز‌شده سر ماهی تون توانایی بالایی در مهار این رادیکال داشت. همچنین افزایش غلظت منجر به افزایش معنی‌دار درصد بازدارندگی شد ($p \leq 0.05$)، به‌گونه‌ای که بالاترین میزان فعالیت در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم مشاهده شد که با مطالعه جیویتا و همکاران [55] هم‌خوانی دارد.

توانایی یک پپتید در مهار رادیکال آزاد نه‌تنها به اندازه پپتید بلکه بیشتر به توالی آمینواسیدی پپتیدها بستگی دارد که در ارتباط با نوع آنزیم پروتئاز مورد استفاده است [26]. وجود آمینواسیدهای آب‌گریز در پپتیدها و پروتئین هیدرولیز‌شده، انحلال آنها در چربی را افزایش داده و در نتیجه فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها را افزایش خواهد داد [41].

مطالعه حاضر به‌روشنی نشان داد که سر ماهی هوور مسقطی می‌تواند به‌طور مطلوبی به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز‌شده استفاده شود. همچنین مشاهده شد آنزیم آلکالاز، کارایی بالایی در هیدرولیز داشته و به تولید پروتئین با درجه هیدرولیز بالا منجر می‌شود. علاوه بر این می‌توان گفت پروتئین هیدرولیز‌شده سر ماهی هوور مسقطی فعالیت آنتی‌اکسیدانی (مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS و کاهندگی یون آهن) بالایی دارد و می‌تواند در فرآورده‌های غذایی به‌منظور افزایش پایداری اکسیداسیونی به کار رود. پیشنهاد می‌شود مطالعات گسترده‌تری در الگوهای غذایی، حیوانی و انسانی صورت گیرد تا عملکرد این پپتیدهای آنتی‌اکسیدان در افزایش سلامت بدن و همچنین خواص حسی ماده غذایی که به آن افزوده می‌شوند، بررسی گردد.

پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی دارد و می‌تواند در فرآورده‌های غذایی به‌منظور افزایش پایداری اکسیداسیونی به کار رود.

تشکر و قدردانی: از جناب آقای مهندس جمشیدی و کارکنان محترم شرکت آذین‌مهر خزر به‌دلیل همکاری برای در اختیار قراردادن ماده اولیه استفاده‌شده در پژوهش حاضر (ماهی هورر مسقطی) کمال تشکر و قدردانی را داریم.

تاییدیه اخلاقی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع مالی: موردی توسط نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

- 1- Choi JI, Kim JH, Lee JW. Physiological properties of tuna cooking drip hydrolysates prepared with gamma irradiation. *Process Biochem.* 2011;46(9):1875-8.
- 2- Ahn ChB, Je JY, Cho YS. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Res Int.* 2012;49(1):92-8.
- 3- Eiroa M, Costa JC, Alves MM, Kennes C, Veiga MC. Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste. *Waste Manag.* 2012;32(7):1347-52.
- 4- He Sh, Franco Ch, Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res Int.* 2013;50(1):289-97.
- 5- Yang P, Ke H, Hong P, Zeng Sh, Cao W. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *Int J Food Sci Technol.* 2011;46(12):2460-6.
- 2621.2011.02768.x/abstract;jsessionid=F0E68409B010CB2EC5698B67EFD65A55.d04t01
- 6- Kim SK. *Marin proteins and peptides: Biological activities and applications.* New York: John Wiley & Sons; 2013. p. 385-435.
- 7- Shahidi F, Zhong Y. Bioactive peptides. *J AOAC Int.* 2008;91(4):914-31.
- 8- Agyei D, Danquah MK. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends Food Sci Technol.* 2012;23(2):62-9.
- 9- Ovissipour M, Benjakul S, Safari R, Motamedzadegan A. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *Int Aquat Res.* 2010;2(2):87-95.
- 10- Rajapakse N, Jung WK, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysates inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sci.* 2005;76(22):2607-19.
- 11- Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn ChB. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int.* 2009;42(9):1266-72.
- 12- Gu RZ, Li CY, Liu WY, Yi WX, Cai MY. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Res Int.* 2011;44(5):1536-40.
- 13- Rajanbabu V, Chen JY. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides.* 2011;32(2):415-20.
- 14- Zhong S, Ma Ch, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chem.* 2011;126(4):1636-42.
- 15- Wang M, Nie Y, Peng Y, He F, Yang J, Wu Ch, et al. Purification, characterization and antitumor activities of a new protein from *Syngnathus acus*, an official marine fish. *Mar Drugs.* 2012;10(1):35-50.
- 16- Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food Chem Toxicol.* 2013;52(1):113-20.
- 17- Farvin KHS, Andersen LL, Nielsen HH, Jacobsen Ch, Jakobsen G, Johansson I, et al. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem.* 2014;149:326-34.
- 18- Jiang H, Tong T, Sun J, Xu Y, Zhao Zh, Liao D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysates. *Food Chem.* 2014;154(1):158-63.
- 19- Girgih AT, Udenigwe ChC, Hasan FM, Gill TA, Aluko RE. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo Salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Res Int.* 2013;52(1):315-22.
- 20- Udenigwe CC, Aluko RE. Food protein-derived bioactive peptides: Production, processing, and potential health benefits. *J Food Sci.* 2012;77(1):11-24.
- 21- Association of official analytical chemists. *Official Methods of Analysis.* 15th Edition. Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists; 1990.
- 22- Hoyle NT, Merritt JH. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci.* 1994;59(1):76-9.
- 23- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193(1):265-75.
- 24- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem.* 1992;40(6):945-8.
- 25- Oyaizu M. Studies on products of browning reaction--antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr.* 1986;44(6):307-15.
- 26- Alemán A, Pérez-Santín E, Bordenave-Juchereau S, Arnaudin I, Gómez-Guillén MC, Montero P. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Res Int.* 2011;44:1044-51.
- 27- Karunarathna KAAU, Attygalle MVE. Nutritional evaluation in five species of tuna. *Vidyodaya J Sci.* 2012;15(1):7-16.
- 28- Batista I, Ramos C, Coutinho J, Bandarra NM, Nunes ML. Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish (*Aphanopus carbo*) by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. *Process Biochem.* 2010;45(1):18-24.
- 29- Dong Y, Sheng G, Fu J, Wen K. Chemical characterization and antianaemia activity of fish protein hydrolysate from *Saurida elongate*. *J Sci Food Agric.* 2005;85:2033-9.

- 43- Guerard F, Guimas L, Binet A. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B: Enzym.* 2002;19-20:489-98.
- 44- Gildberg A. Enzymic processing of marine raw materials. *Process Biochem.* 1993;28(1):1-15.
- 45- Liaset B, Lied E, Espe M. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. *J Sci Food Agric.* 2000;80(5):581-9.
- 46- Khantaphant S, Benjakul S. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2008;151(4):410-9.
- 47- Nalinanon S, Benjakul S, Kishimura H, Shahidi F. Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chem.* 2011;124(4):1354-62.
- 48- Hsu KCh, Lu GH, Jao ChL. Antioxidative properties of peptides prepared from tuna cooking juice hydrolysates with orientase (*Bacillus subtilis*). *Food Res Int.* 2009;42(5-6):647-52.
- 49- Chalamaiah M, Dinesh kumar B, Hemalatha R, Jyothirmayi T. Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Food Chem.* 2012;135(4):3020-38.
- 50- Hsu KCh. Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chem.* 2010;122(1):42-8.
- 51- Wu HCh, Chen HM, Shiau ChY. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of Mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res Int.* 2003;36(9-10):949-57.
- 52- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-product proteins. *Food Chem.* 2010;118(3):559-65.
- 53- Klompong V, Benjakul S, Kantachote D, Shahidi F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* 2007;102:1317-27.
- 54- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem.* 2009;114:1198-205.
- 55- Jeevitha K, Mohana PK, Khora SS. Antioxidant activity of fish protein Hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *Int J Drug Dev Res.* 2014;6(4):137-45.
- 30- Bbogouri GA, Linder M, Fanni J, Parmentier M. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproduct hydrolysates. *J Food Sci.* 2004;69:615-22.
- 31- Sathivel S, Bechtel PJ, Babbitt J, Smiley S, Crapo C, Reppond KD, et al. Biochemical and functional properties of Herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *J Food Sci.* 2003;68(7):2196-200.
- 32- Chalamaiah M, Narsing Rao DG, Rao DG, Jyothirmayi T. Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chem.* 2010;120(1):652-7.
- 33- Kristinsson HG, Rasco BA. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2000;40(1):43-81.
- 34- Thiansilakul Y, Benjakul S, Shahidi F. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chem.* 2007;103(4):1385-94.
- 35- Foh MBK, Kamara MT, Amadou I, Foh BM, Wenshui X. Chemical and physicochemical properties of Tilapia (*Oreochromis niloticus*) fish protein hydrolysates and concentrate. *Int J Biol Chem.* 2011;5(1):21-36.
- 36- Wasswa J, Tang J, Gu X, Yuan X. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chem.* 2007;104(4):1698-704.
- 37- Bhaskar N, Benila T, Radha C, Lalitha RG. Optimization of enzymatic Hydrolysis of visceral waste proteins of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysates using a commercial protease. *Bioresour Technol.* 2008;99(2):335-43.
- 38- Choi JI, Kim HJ, Kim JH, Song BS, Chun BS, Ahn DH, et al. Improvement of color and physiological properties of tuna-processing by product, by gamma irradiation. *Radiation Phys Chem.* 2009;78(7-8):601-3.
- 39- Guérard F, Dufossé L, De La Broise D, Binet A. Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using Alcalase. *J Mol Catal B: Enzym.* 2001;11(4-6):1051-9.
- 40- Ramakrishnan VV, Ghaly AE, Brooks MS, Budge SM. Extraction of oil from mackerel fish processing waste using Alcalase Enzyme. *Enzym Eng.* 2013;2(2):1000115.
- 41- Dong S, Zeng M, Wang DF, Liu Z, Zhao Y, Yang H. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chem.* 2008;107(4):1485-93.
- 42- Shahidi F, Han XQ, Synowiecki J. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem.* 1995;53(3):285-93.