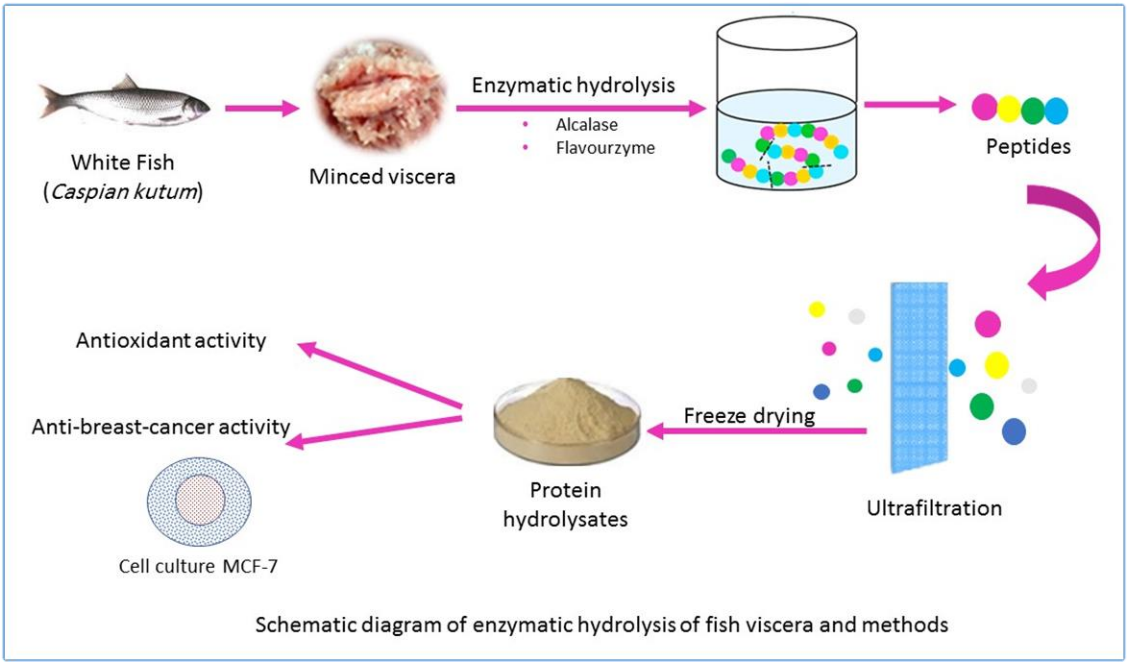
DOI:10.22059/ijbse.2020.300852.665303 مهندسی بیوسیستم ایران، دوره ۵۲، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰ (ص ۳۹۰-۳۷۹)
(علمی پژوهشی)

Enzymatic Hydrolysis of Whitefish Viscera of Caspian Sea *(Caspian kutum)* and Evaluation of Antioxidant Properties of hydrolyzed protein

Mona Azizi Khesal[1], Anousheh Sharifan[1*], Ebrahim Hoseini[1], Abdollah Ghavami[2]
1. Department of Food Science and Technology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran
2. School of Human Sciences, London Metropolitan University, London, UK
(Received: May 27, 2020- Revised: July 10, 2020- Accepted: Sep. 8, 2020)



Schematic diagram of enzymatic hydrolysis of fish viscera and methods

ABSTRACT: In this study, the extraction and purification of bioactive peptides and evaluation of antioxidant and anticancer properties of the hydrolyzed protein of whitefish viscera of Caspian Sea through enzymatic hydrolysis with alcalase and flavourzyme were investigated. Antioxidant activity of the hydrolyzed protein was evaluated by DPPH- free radical scavenging activity, ferric reducing power, and metal chelating activity of Fe^{2+}. Results showed that the hydrolyzed protein had antioxidant activity and the alcalase had the potential of production of protein powder with a higher hydrolysis degree (20.5 ±1.2) in comparison with flavourzyme. DPPH-free radical scavenging and metal chelating activities of the protein hydrolyzed by alcalase was significantly higher than that by flavourzyme ($p < 0.05$). The results of cell culture and MCF-7 cell line indicated that the concentration of 500 mg/L of the hydrolyzed protein by alcalase with molecular weight of less than 3 kDa completely inhibited the growth of breast cancer cells and its inhibitory effect was higher than Lynparza ($p < 0.05$). The results showed that obtained peptides from whitefish with strong antioxidant and anti-cancer effects have the potential to be used as a natural antioxidant in the food industry and pharmacy.

Keywords: Enzymatic hydrolysis, Whitefish, Bioactive peptide, Antioxidant properties

*** Corresponding author: a-sharifan2000@yahoo.com**

هیدرولیز آنزیمی امعا و احشا ماهی سفید دریای خزر (*Caspian kutum*) و بررسی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

مونا عزیزی خصال[۱]، انوشه شریفان *[۱]، ابراهیم حسینی[۱]، عبدالله قوامی[۲]

۱. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران.

۲. دانشکده علوم انسانی، دانشگاه متروپولیتن لندن، لندن، انگلستان.

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۳/۷- تاریخ بازنگری: ۱۳۹۹/۴/۲۰- تاریخ تصویب: ۱۳۹۹/۶/۱۸)

چکیده: مطالعه حاضر به استخراج و خالص سازی پپتیدهای زیست فعال و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشا ماهی سفید دریای خزر توسط هیدرولیز آنزیمی با آنزیم‌های آلکالاز و فلورزایم می‌پردازد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آزمون‌های قدرت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH، قدرت احیا کنندگی آهن و درصد شلاته کنندگی یون Fe^{2+} بررسی شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و آنزیم آلکالاز نسبت به آنزیم فلاورزایم قادر به تولید پودر پروتئینی با درجه هیدرولیز بالاتری (۱/۲ ± ۲۰/۵) می باشد. قدرت مهار رایکال آزاد و خاصیت شلاته‌کنندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز بطور معنی‌داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با فلورزایم بود ($p<0/05$). نتایج حاصل از کشت سلولی و رده سلولی MCF-7 نشان داد که غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پروتئین هیدرولیز شده با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون توسط آنزیم آلکالاز بطور کامل موجب مهار رشد سلول‌های سرطان سینه شده است و اثرات مهارکنندگی آن در مقایسه با داروی Lynparza بیشتر بوده است ($p<0/05$). بر اساس نتایج بدست آمده، به نظر می رسد که پپتیدهای حاصل از ماهی سفید با اثرات قوی آنتی اکسیدانی و ضد سرطانی پتانسیل استفاده به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در محصولات غذایی و دارویی را دارا می باشند.

واژه‌های کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، ماهی سفید، پپتید زیست فعال، خواص آنتی‌اکسیدانی

* نویسنده مسئول: a_sharifan2000 @ yahoo.com

مقدمه

با توجه به افزایش جمعیت جهان و با درنظرگرفتن میزان صید جهانی (در حدود ۱۰۰ میلیون تن درسال)، بدیهی است برای رفع نیازهای پروتئینی، باید از منابع دریایی به طور کاملاً هوشمندانه استفاده شود (Kristinsson & Rasco, 2000; Ovissipour *et al*., 2013). سالانه میزان بالایی از ضایعات ماهیان شامل امعا و احشا، سر، باله‌ها و دم در زمان فرآوری آبزیان حاصل می‌شود که مشکلات زیست محیطی را به دنبال خواهد داشت (Rustad *et al*., 2011). اهمیت ماهی به عنوان منبعی از پپتیدهای زیست فعال با سرعت نسبتا بالایی در حال افزایش است (Najafian & Babaji, 2012)، که با دارا بودن ترکیبات ارزشمندی مانند ویتامین‌ها، مواد معدنی، اسیدهای چرب چند غیر اشباعی و پپتیدهای زیست فعال منبعی از مواد عملگرا می‌باشد. ماهی سفید دریای خزر (*Caspian Kutum*) یکی از گونه‌های استخوانی محبوب در ایران می‌باشد و مصرف بالای آن منجر به تولید مقادیر فراوانی امعا و احشا می‌گردد که می‌تواند منبع مناسبی از پروتئین باشد و اثرات نامطلوب زیست محیطی ناشی از دفع ضایعات را به حداقل برساند (Hosseini *et al*., 2015). هیدرولیز آنزیمی به طور وسیع به منظور بهبود خواص عملکردی و تغذیه‌ای پروتئین‌های غذایی استفاده می‌شود و پپتیدهای بهتری از نظر خواص تغذیه‌ای و کارکردی ایجاد می‌کند (Kristinsson & Rasco, 2000). آنزیم‌های مختلفی مانند آلکالاز و فلورزایم برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با خواص عملکردی مناسب مورد استفاده قرار می‌گیرد که هیچ اثر سمیتی را در محصول نهایی به جای نمی‌گذارد (Elavarasan *et al*., 2014). تاکنون مطالعات بسیاری در مورد فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده گونه‌های مختلف تیلاپیا (Raghavan *et al*., 2008)، پوسته ی میگو (Kannan *et al*., 2011)، گوشت ماهی تن (Hsu *et al*., 2011)، ژلاتین پوست سالمون (Fu & Zhao, 2013) و گوشت ساردین (Khaled *et al*., 2014) انجام شده است. اکسایش لیپید یکی از فرآیندهای مخرب در بسیاری از غذاها بوده که منجر به تغییر در کیفیت غذا و ارزش تغذیه‌ای می‌شود و عمر ماندگاری را نیز به ویژه در ماهیان چرب به علت سطح بالای اسیدهای چرب چند غیراشباعی کاهش می‌دهد (Ovissipour *et al*., 2013; Chen *et al*., 2012). بنابراین آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و مصنوعی می‌توانند شروع اکسایش را به تاخیر اندازند (Khantaphant *et al*., 2011). امروزه توجه زیادی به آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی معطوف شده است. تحقیقات نشان داده است که هیدرولیزهای روتیفرها (*Brachionus plicatilis*) دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی چشمگیری است و امکان استفاده از آن به عنوان مکمل در مواد غذایی قابل بررسی می‌باشد (Khafaeizadeh *et al*., 2016). از سویی دیگر سرطان بطور فزاینده‌ای عامل مهم در بار جهانی بیماری در دهه‌های آینده خواهد بود. این بیماری سالانه سبب مرگ ۴۰۰۰۰ نفر در ایران می‌گردد و شیوع آن از رشد فزاینده‌ای برخوردار است. سرطان سینه شایعترین سرطان در زنان ۴۴-۴۰ ساله می‌باشد، که در طی دهه اخیر این نوع سرطان در ایران رشد بالایی داشته است که بسیار نگران کننده می‌باشد. شیوع سرطان سینه در کشورهای در حال توسعه در حال افزایش است و در بسیاری از نقاط دنیا به صورت شایع‌ترین بیماری بدخیم در بین زنان درآمده است (Harirchi *et al*., 2000). پتانسیل ضد سرطانی پپتیدها، عمدتا ناشی از عملکرد آنتی‌اکسیدانی، ضد تکثیری و ضد جهش آن‌ها است. پپتیدهای استخراج شده از آبزیان، با مکانیسم‌های مختلفی چون آپوپتوزیس، ضد تکثیر و سیتوتوکسیک، موجب تحریک مرگ سلولی می‌گردند. بعضی از سرطان‌ها با عمل جراحی، شیمی درمانی و رادیو تراپی قابل درمان است اما این درمان‌ها اغلب اثرات زیانباری را توسط استفاده از داروها بر روی سلول‌ها و بافت‌های سالم دارند (Hubenak *et al*., 2014). تحقیق حاضر با هدف تولید پپتیدهای زیست

فعال از ضایعات ماهی سفید دریای خزر به منظور ارزیابی خاصیت ضد اکسیدانی و ضد سرطانی بافت سینه در شرایط آزمایشگاهی صورت پذیرفت. بنابراین، با توجه به عدم وجود مطالعات کافی در این زمینه، در تحقیق حاضر هیدرولیز آنزیمی برای تولید پپتیدهای زیست فعال از امعا و احشا ماهی سفید دریای خزر بکار گرفته شده است. لذا فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آزمون‌های DPPH، آزمون قدرت احیا کنندگی یون آهن و شلاته کنندگی فلزات بررسی شد و در ادامه خواص ضد سرطانی این پپتیدها مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماهی سفید دریای خزر با وزن متوسط از بازار ساری تهیه و در کنار یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شد. سپس امعا و احشا ماهی جدا گردیده و به قطعات کوچک برش داده شد و به عنوان ماده خام اولیه تا زمان مصرف در دمای ۲۰ درجه سلسیوس نگهداری گردید. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus Licheniformis*) و فلورزایم (استخراج شده از *Aspergillus Oryzae*) از نمایندگی شرکت نووزایم دانمارک در ایران خریداری و تا زمان آزمایش در ۴ درجه سلسیوس نگهداری شدند. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT از شرکت مرک تهیه شدند.

سنجش ترکیبات شیمیایی امعا و احشا ماهی

به‌منظور سنجش ترکیبات تقریبی نمونه‌ها از روش‌های استاندارد استفاده شد (AOAC, 2000). برای اندازه‌گیری میزان رطوبت از آون ۱۰۵ درجه سلسیوس، جهت ثابت شدن وزن نمونه استفاده شد. جهت تعیین خاکستر، نمونه خشک در بوته چینی ریخته شده و در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ ساعت سوزانده شد. میزان پروتئین به روش کجلدال بدست آمد. چربی کل نیز با سوکسله استخراج شد.

تولید پروتئین هیدرولیز شده (FPH)[1]

نمونه‌های منجمد جهت انجام هیدرولیز در دمای اتاق انجماد زدایی شدند. نمونه‌ها پس از چرخ شدن به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی در دمای ۸۵ درجه سلسیوس قرار گرفتند تا آنزیم‌های داخلی امعا و احشا غیرفعال شوند. سپس ۵۰ گرم از هر نمونه به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری منتقل شد. سپس ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر (نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲) به هر ارلن مایر حاوی نمونه اضافه گردید (Guerard *et al.*, 2012). بعد از خنک شدن ارلن‌ها، آنزیم الکالاز به میزان ۱/۵ درصد (محتوی پروتئین) به یک ارلن افزوده شد و هیدرولیز به مدت ۱۸۰ دقیقه در pH ۸/۵ و دمای ۵۵ درجه سلسیوس که شرایط بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز بود، انجام شد. سپس فلورزایم به میزان ۱/۵ درصد به ارلن مایر دیگری اضافه گردید و هیدرولیز در همان دما و زمان و در pH ۷ انجام شد. به منظور توقف واکنش آنزیمی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس قرار گرفتند (جدول ۱). نمونه‌ها پس از خنک شدن در دمای محیط به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰۰×g در دمای ۴ درجه سلسیوس، سانتریفیوژ شدند و سپس مایعات رویی با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی مدل (FD-5003-BT) در دمای ۵۰- درجه سلسیوس خشک گردیدند (Ovissipour *et al.*, 2013). پودرهای تولیدی در کیسه‌های زیپ‌دار در فریزر در دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز (DH) به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد حجمی/حجمی اندازه‌گیری شد (جدول ۱). مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرو استیک اسید به کل پروتئین‌های موجود در نمونه حاصل از سانتریفیوژ پس از هیدرولیز است. بدین منظور حجم مساوی از محلول

1 . Fish Protein Hydrolysate

پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شده و پس از هم زدن در دمای ۲۰ درجه سلسیوس به مدت ۵ دقیقه (۶۷۰۰ ×g) سانتریفیوژ شدند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با روش لوری اندازه‌گیری گردید. در این روش ایجاد کمپلکس رنگی و شدت رنگ ایجاد شده بستگی به غلظت پروتئینی موجود در نمونه دارد (Lowry *et al.*, 1951). میزان درجه هیدرولیز از طریق رابطه (۱) محاسبه شد (Raghavan & Kristinsson, 2008).

(رابطه ۱)

$$\text{درجه هیدرولیز} = \frac{\text{پروتئین های محلول در نمونه – تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد}}{\text{پروتئین های کل در نمونه}} \times ۱۰۰$$

جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترا فیلتراسیون با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (MWCO) ۳ و ۳۰ کیلو دالتون انجام شد. سه فرکشن MW<3 KDa، 3kDa<MW<30KDa، MW>30kDa جدا گردید. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلترآمیکون ۳۰ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ ×g سانتریفیوژ شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۳۰ کیلودالتون مجددا با استفاده از فیلترآمیکون ۳ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰ ×g سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب، پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون، بین ۳ و۳۰ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند.

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی

۳ شاخص آنتی‌اکسیدانی مهم یعنی قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، احیا یون آهن سه ظرفیتی و فعالیت شلاته کنندگی یون آهن در پنج غلظت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر محاسبه شد. از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی BHA و BHT برای مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده گردید.

قدرت مهار رادیکال‌های آزادDPPH

قدرت مهار رادیکال‌های DPPH بر اساس روش You *et al.* (2010) انجام شد. حجم مساوی از نمونه با محلول DPPH ۰/۱۶ میلی مولار (حل شده در اتانول ۹۵ درصد) مخلوط گردید. محلول به دست آمده به مدت ۱ دقیقه تکان داده شد و سپس در دمای اتاق به مدت ۳۰ دقیقه در شرایط تاریکی نگهداری شد. در نهایت جذب همه نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر قرائت گردید. نمونه شاهد نیز به همین طریق تهیه گردید با این تفاوت که به جای نمونه از آب مقطر استفاده شد. به منظور مقایسه قدرت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHAو BHT در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر استفاده گردید. قدرت پروتئین‌های هیدرولیز شده برای مهار رادیکال DPPH با استفاده رابطه (۲) محاسبه گردید (Yen & Wu, 1999).

(رابطه ۲)

$$\text{قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH} = \frac{\text{نمونه جذب}}{\text{شاهد جذب}} \times ۱۰۰$$

قدرت احیا کنندگی یون آهن (III)

در این روش ابتدا ۱ میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار با pH ۶/۶ و ۲/۵ میلی لیتر محلول ۱ درصد حجمی/وزنی پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سلسیوس انکوبه گردید و بعد از این مدت با اضافه کردن ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۵ میلی لیتر کلرید آهن (III) ۰/۱ درصد ترکیب و ۱۰ دقیقه در دمای محیط انکوبه و سپس جذب آن با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. جهت مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیزشده، از آنتی-اکسیدان‌های سنتزی BHAو BHT در غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان یک عامل احیا کننده استفاده شد.

تعیین فعالیت شلاته‌کنندگی یون آهن

فعالیت شلاته کنندگی یون آهن (Fe^{+2}) توسط پروتئین

هیدرولیز شده ضایعات ماهی سفید دریای خزر مطابق با روش Jamdar *et al.* (2010) انجام شد. مطابق با این روش ابتدا محلول ۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر پروتئین هیدرولیز شده تهیه و ۱ میلی لیتر از آن به ۳/۷ میلی لیتر آب مقطر اضافه گردید. سپس به محلول حاصل، ۰/۱ میلی لیتر محلول ۲ میلی مولار کلرید آهن و ۰/۲ میلی لیتر محلول ۵ میلی مولار فروزین اضافه و ۲۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب محلول در طول موج ۵۶۲ نانومتر قرائت و فعالیت شلاته کردن از طریق رابطه (۳) محاسبه گردید.

(رابطه ۳)

$$\text{فعالیت شلاته کنندگی فلزات} = \frac{\text{جذب شاهد} - \text{جذب نمونه در طول موج ۵۶۲ نانومتر}}{\text{جذب شاهد}} \times ۱۰۰$$

فعالیت ضد سرطانی پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی

کشت سلولی

سلول‌های MCF-7 (NCBI code 135) (مولد سرطان سینه) از انیستیتو پاستور ایران تهیه گردید. سپس در محیط DMEM به همراه ۵ درصد سرم جنین گوساله (FCS)، پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) کشت گردید. سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس در رطوبت ۹۰ درصد و دی اکسید کربن ۵ درصد قرار گرفتند. سلول‌ها در محیط کشت DMEM و ۱۰ درصد FCS در پلیت‌ها ریخته شده و پس از ۲۴ ساعت که سلول‌ها مورفولوژی طبیعی یافتند، در معرض پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی سفید قرار گرفتند. همزمان نمونه‌ی کنترل فاقد پروتئین‌های هیدرولیز شده مانند نمونه‌های حاوی پروتئین‌های هیدرولیز شده در نظر گرفته شد (Picot *et al.*, 2006).

اثر سایتوتوکسیک پروتئین‌های هیدرولیز شده بر رده سلولی MCF-7

بررسی زنده بودن سلول‌ها توسط تست MTT (۳،۴،۵ دی متیل تیازول ۲ یل ۲،۵ دی فنیل تترازولیوم) مورد ارزیابی قرار گرفت. MTT افزوده شده به محیط کشت توسط فعالیت دهیدروژناز سلول‌های زنده به رنگ فورمازان تبدیل شد. چون محتوای دهیدروژناز سلول‌های یک نوع نسبتا ثابت است، میزان فورمازان تولید شده متناسب با تعداد سلول است. به منظور جلوگیری از انحراف pH محیط کشت سلولی در طی محلول‌سازی نمونه، محلول استوک پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی در ۰/۱ مولار PBS در pH ۷/۴ تهیه شد. سلول‌ها به تعداد ۵۰۰۰ در هر چاهک ۹۶ تایی پلیت سلولی در مدت یک شب قرار گرفت. سپس ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین‌های هیدرولیز شده برای مدت ۷۲ ساعت اضافه و اثر آن‌ها بر روی رشد سلولی توسط تست MTT بررسی گردید. سلول‌ها با محلول ۵ میلی‌گرم بر میلی لیتر MTT در PBS به مدت ۴ ساعت در ۳۷ درجه سلسیوس قرار گرفت. پس از محلول‌سازی فورمازان توسط ۲۰۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکسید (DMSO شرکت Sigma-Aldrich، آلمان) جذب نوری در ۵۹۵ نانومتر با استفاده از دستگاه الایزا ریدر (Elisa Reader Anthos 2020، آمریکا) خوانده شد (Sheu *et al.*, 2008). در این مطالعه از داروی Lynparza به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. درصد سلول‌های زنده‌ی تحت اثر پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی نسبت به سلول هایی که آنها را دریافت نکرده‌اند با استفاده از رابطه (۴) محاسبه گردید (Picot *et al.*, 2006).

(رابطه ۴)

$$\text{درصد سلول های زنده} = \frac{\text{جذب نوری سلول های تیمار شده با پروتئین هیدرولیز شده در هر چاهک}}{\text{میانگین جذب نوری سلول های کنترل}} \times ۱۰۰$$

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزار اکسل محاسبه شد و از نرم افزار آماری SPSS نسخه 18 برای آنالیز داده‌ها و

از نرم افزار اکسل برای رسم نمودارها استفاده شد.

نتایج و بحث

تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی امعا و احشا ماهی سفید دریای خزر و پروتئین هیدرولیز شده آن توسط دو آنزیم آلکالاز و فلورزایم در جدول ۲ نشان داده شده است. میزان پروتئین در نمونه هیدرولیز شده امعا و احشا به میزان قابل توجهی نسبت به ماده اولیه بالاتر بود ($p < ۰/۰۵$). میزان چربی در نمونه هیدرولیز شده نسبت به ماهی تازه کاهش یافت ($p < ۰/۰۵$). در میزان رطوبت نیز همین تغییرات مشاهده گردید. در حالیکه خاکستر پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه افزایش داشته است ($p < ۰/۰۵$).

جدول ۱- درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده امعا و احشا ماهی سفید

آنزیم	pH	دما (درجه سلسیوس)	غلظت آنزیم (٪)	زمان (دقیقه)	درجه هیدرولیز
آلکالاز	۸/۵	۵۵	۱۸۰	۱/۵	۲۰/۵ ± ۱/۲^{a}
فلورزایم	۷	۵۵	۱۸۰	۱/۵	۱۸/۵ ± ۰/۳^{b}

*حروف متفاوت اختلاف معنی دار ($p < ۰/۰۵$) را نشان می دهد. داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار است.

جدول ۲- ترکیبات شیمیایی نمونه خام و پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی سفید دریای خزر با استفاده از آنزیمهای آلکالاز و فلورزایم

نوع نمونه		پروتئین (٪)	چربی (٪)	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)
خام		**۱۵ ± ۰/۲^{c}**	**۴/۷ ± ۰/۱^{a}**	**۷۸/۸ ± ۰/۲ ^{a}**	**۲ ± ۰/۰۲ ^{b}**
هیدرولیز شده	**آلکالاز**	**۸۷/۴ ± ۰/۳^{a}**	**۱/۶ ± ۰/۰۰۱^{b}**	**۷/۵ ± ۰/۱^{b}**	**۴ ± ۰/۱^{a}**
	فلورزایم	**۸۳/۱ ± ۰/۱^{b}**	**۱/۶ ± ۰/۰۰۱^{b}**	**۷ ± ۰/۲^{b}**	**۴ ± ۰/۰۴^{a}**

*حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده اختلاف معنی دار ($p < ۰/۰۵$) برای تیمار های مختلف می‌باشد.

قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده

در شکل (۱) پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز در غلظت-های ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (۲۱/۴±۰/۸، ۲۹/۲±۰/۸، ۳۵/۶± ۰/۵، ۴۴/۴± ۱ و ۵۱/۱±۷ درصد) بیشتری نسبت به پروتئین هیدرولیز شده با فلورزایم (۱۷/۰±۲/۳، ۲۵/۰±۶/۶، ۳۹/۰±۵/۸، ۴۸/۱±۱/۵ و۶۲/۳±۱/۵ درصد) داشت ($p < ۰/۰۵$). آنتی‌اکسیدان-های سنتزی BHAو BHT با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر دارای قدرت مهار رادیکال آزاد به ترتیب ۹۲/۷ و ۹۰/۵ درصد بودند.

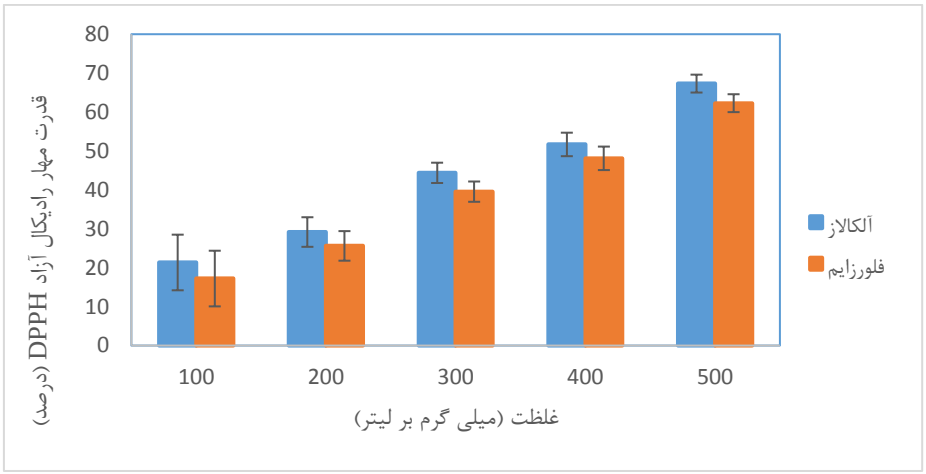
قدرت احیاکنندگی یون آهن توسط پروتئین های هیدرولیز شده

مطابق شکل (۲)، اگرچه پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم درغلظت‌های اشاره شده قدرت احیاکنندگی بیشتری (۰/۰۲±۰/۳۵، ۰/۴ ±۰/۰۵، ۰/۴ ± ۰/۰۴ ، ۰/۵ ± ۰/۰۲، ۰/۶ ± ۰/۰۲، ۰/۷ ± ۰/۰۲ درصد) از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز (۰/۰۱±۰/۳، ۰/۴ ± ۰/۰۲ ، ۰/۴ ± ۰/۰۴ ، ۰/۴۷ ± ۰/۰۱، ۰/۵۲ ± ۰/۰۲، ۰/۷ ± ۰/۰۲درصد) داشت، اما از نظر آماری اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ($p > ۰/۰۵$). همانطور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، قدرت احیاکنندگی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با افزایش غلظت بیشتر گردید ($p < ۰/۰۵$). آنتی-اکسیدان‌های سنتزی BHA وBHT با غلظت ۲۰۰ میلی گرم برلیتر دارای قدرت احیا کنندگی یون آهن به ترتیب ۰/۹و ۰/۸ درصد بودند.

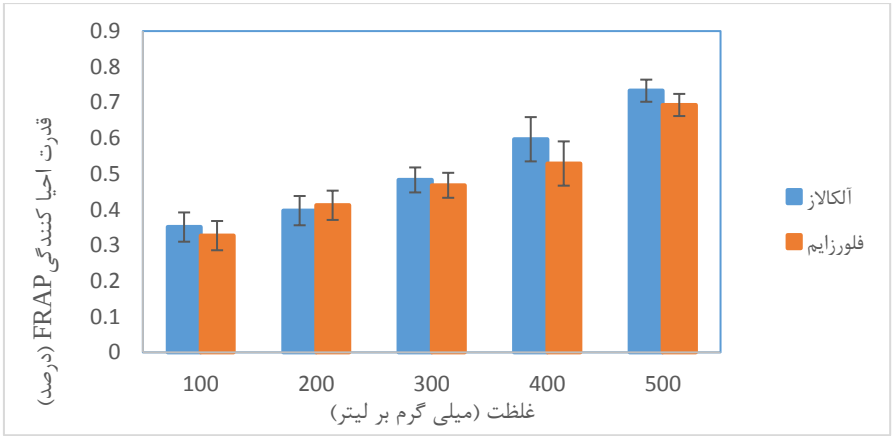
قدرت شلاته کنندگی یون آهن توسط پروتئین های هیدرولیز شده

در شکل (۳) پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز در غلظت-های مشخص، قدرت شلاته کنندگی یون آهن (۱۸/۰±۲/۴، ۲۵/۰±۵/۵، ۳۸/۰±۱/۷، ۴۶/۱±۰/۸ و۶۱/۳±۰/۹ درصد) بیشتری نسبت به پروتئین

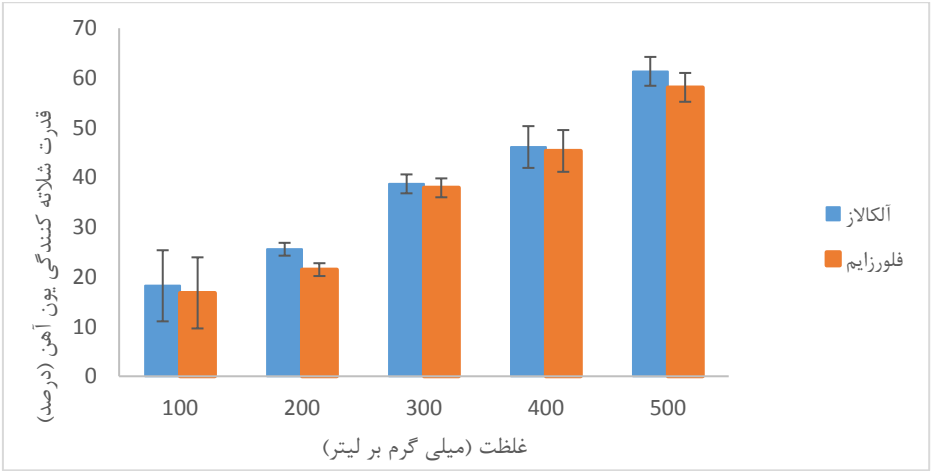
هیدرولیز شده با فلورزایم (۰/۳ ± ۱۶/۸، ۰/۶±۲۱/۵، ۰±۰/۹ ۳۷/۹، ۱ ± ۴۵/۳ و ۰/۸ ± ۵۸/۱ درصد) داشت ($p < ۰/۰۵$). آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر دارای قدرت مهار رادیکال آزاد به ترتیب ۹۰/۳ و ۸۹/۶ درصد بودند.



شکل ۱- فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزادDPPH امعا و احشا هیدرولیز شده ماهی سفید دریای خزر. داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد($p<۰/۰۵$).



شکل ۲- قدرت احیا کنندگی یون آهن امعا و احشا هیدرولیز شده ماهی سفید دریای خزر. داده ها بصورت میانگین± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد($p<۰/۰۵$).



شکل ۳- قدرت شلاته کنندگی یون آهن امعا و احشا هیدرولیز شده ماهی سفید دریای خزر. داده ها بصورت میانگین± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد($p<۰/۰۵$).

شکل ۴- درصد بقای سلولهای MCF-7 در برابر پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی سفید در غلظتهای مختلف کمتر از ۳ کیلو دالتون.

ارزیابی خواص ضدسرطانی غلظت های مختلف پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی سفید دریای خزر

مطابق شکل (۴)، درصد بقای سلول های MCF-7 با افزایش میزان غلظت پروتئین‌های هیدرولیز شده ضایعات ماهی سفید کاهش یافته است. همچنین درصد بقای این سلول‌ها در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر پروتئین هیدرولیز شده حاصل از هر دو آنزیم آلکالاز و فلورزایم به صفر رسیده است و اثرات مهارکنندگی آنها در مقایسه با داروی Lynparza به عنوان کنترل مثبت بیشتر بوده است.

با توجه به پتانسیل بالای پروتئین‌های هیدرولیز شده در ارائه خواص عملگرا، تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات منابع دریایی هم از دیدگاه اقتصادی و هم تولید محصولی با ارزش، بسیار حائز اهمیت است. ترکیبات شیمیایی مواد غذایی با فراهم کردن مواد مغذی ضروری، نقش مهمی را در سلامت بدن ایفا می کنند (Bakhshan *et al.*, 2014). تحقیقات نشان دادند که میزان پروتئین در هیدرولیز امعا و احشا تاسماهی ایرانی با استفاده از آنزیم آلکالاز، در حدود ۶۶ درصد می‌باشد که با نتایج حاصل مطابقت دارد (Ovissipour *et al.*, 2009).

درجه هیدرولیز به معنای درصدی از پیوندهای پپتیدی است که توسط آنزیم تجاری طی فرایند هیدرولیز شکسته می‌شوند. در تحقیق حاضر درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با فلورزایم بود (جدول ۱). این امر را می‌توان با توجه به قدرت آنزیم‌های تحت شرایط این آزمایش توجیه کرد. بدین معنی که آنزیم آلکالاز تحت شرایط این آزمایش قویتر از آنزیم فلورزایم عمل کرد و توانست طی ۱۸۰ دقیقه، درصد بیشتری از پیوندهای پپتیدی مولکول پروتئین را تجزیه کند.

یکی از شاخص‌های مهم جهت سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌ها، قدرت آنها برای مهار DPPH است. قدرت مهار رادیکال آزاد در دو آنتی‌اکسیدان سنتزی BHAو BHT به ترتیب ۹۲/۷و ۹۰/۵ درصد محاسبه گردید که در مقایسه با بالاترین فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز که ۶۳/۷ درصد بود، اختلاف معنی‌داری را نشان داد ($p < ۰/۰۵$) و فعالیت مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت، افزایش یافت. بنابراین، پروتئین‌های محلول امعا و احشا ماهی سفید دارای قابلیت خنثی‌سازی رادیکال آزاد و همچنین پتانسیل عمومی برای کاهش عوامل اکسید کننده با اهدای الکترون هستند. نتایج مشابهی در مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققان گزارش شد. در مطالعه‌ای، پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور نقره‌ای با آلکالاز در مدت ۱/۵ ساعت نشان داد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی

پروتئین هیدرولیز شده کپور نقره‌ای علاوه بر درجه هیدرولیز با زمان، وزن مولکولی و غلظت آنها ارتباط دارد (Dong *et al*., 2008). نتایج فعالیت شلاته کنندگی یون آهن همانند فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد به صورت صعودی بوده و قدرت آنزیم آلکالاز بالاتر از فلورزایم مشاهده گردید (شکل ۱و ۳).

یکی دیگر از شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین-های هیدرولیز شده که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، قدرت احیاء آهن است. بالاترین فعالیت احیا کنندگی یون آهن توسط پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم در غلظت ۵۰۰ میلی گرم بر لیتر به میزان ۰/۸ درصد بدست آمد که در مقایسه با سایر غلظت های هیدرولیز اختلاف معنی داری از خود نشان داد ($p < ۰/۰۵$). جهت مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده، از BHA و BHT با غلظت ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر به عنوان یک عامل احیا کننده استفاده شد که جذب نمونه مربوطه در طول موج ۷۰۰ نانومتر برابر ۰/۹ و ۰/۸ بدست آمد. بین میانگین جذب نمونه با غلظت‌های مختلف و جذب نمونه با تیمار BHAو BHT تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < ۰/۰۵$) که مشابه با نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم است که هر دو پروتئین هیدرولیز شده فعالیت احیا کنندگی را نشان دادند و پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاورزایم فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز نشان داد و نیز فعالیت‌های آنتی-اکسیدانی با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت. در این مطالعه آنزیم آلکالاز فعالتر از فلاورزایم در مهار رادیکال آزاد DPPH بوده است و در قدرت کاهندگی آنزیم فلاورزایم قویتر از آنزیم آلکالاز عمل کرد که شاید به علت تفاوت در اندازه پروتئین یا پپتیدهای مختلف باشد (Kolompong *et al*., 2008). در مطالعه دیگری نشان داده شد که برای بدست آوردن فعالیت‌های بیولوژیک بالا، ارتباطی بین فعالیت بیولوژیک، زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز و وزن مولکولی وجود دارد (Slizyte *et al*., 2016). در مطالعه-ای نیز فعالیت کاهندگی پروتئین حاصل از آنزیم فلاورزایم بیشتر از آنزیم آلکالاز بوده است (Elavarasan *et al*., 2014). در مطالعه Kim *et al*. (2011) بیان شد که فرکشن‌های پپتیدی با وزن مولکولی کمتر، انتشار و تحرک مولکولی بیشتری دارند و می‌توانند اثر متقابل بیشتری با اجزای موجود در سلول سرطانی ایجاد نمایند و در نتیجه فعالیت ضد سرطانی بیشتری داشته باشند. همچنین مطالعه Zhang *et al*. (2018) نشان داد که فرکشن‌های کمتر از ۳ کیلو دالتون پپتیدهای زیست فعال هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز اثرات ضد تکثیری قویتری بر روی رده سلولی سرطان کولون HT-29 داشتند که همسو با نتایج حاضر است (شکل ۴).

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم فعالیت آنتی‌اکسیدانی پایین‌تری نسبت به آنتی اکسیدان‌های سنتزی داشتند. باید توجه داشت که آنتی اکسیدان‌های طبیعی به دلیل قدرت پایین‌تر همیشه در مقادیر بالاتری نسبت به آنتی-اکسیدان‌های سنتزی استفاده می‌شوند. بنابراین، پروتئین‌های هیدرولیز شده با آلکالاز و فلاورزایم در غلظت‌های مناسب قادر به رقابت با آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی می‌باشند. مطابق نتایج به دست آمده از این تحقیق، اثرات مهارکننده پپتیدهای استخراج شده با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلو دالتون در آنزیم آلکالاز و فلورزایم بالاتر از سایر وزن‌های مولکولی بوده و با افزایش غلظت پپتیدهای مورد بررسی، اثرات مهارکننده آنها بر روی تیره سلولی سرطانی نیز افزایش یافته است ($p < ۰/۰۵$). نکته حائز اهمیت آنکه غلظت ۵۰۰ میلی‌گرم بر لیتر پروتئین هیدرولیز شده به طور کامل موجب مهار رشد سلول‌های سرطان سینه شده است و اثرات

مهارکنندگی آن در مقایسه با داروی Lynparza بعنوان کنترل مثبت بیشتر بوده است ($p < ۰/۰۵$) که این مسئله به منظور تولید این غلظت به عنوان داروی ضد سرطان بیش از پیش اهمیت می‌یابد. بنابراین پپتیدهای زیست فعال با وزن مولکولی کمتر از ۳ کیلودالتون حاصل از هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی سفید دریای خزر دارای اثرات آنتی‌اکسیدان و ضد سرطانی قوی بر روی تیره سلولی سرطان سینه می‌باشد. انجام مطالعات بالینی تکمیلی به منظور شناسایی دقیق اجزای موثر ترکیبات ضد سرطان موجود در پپتیدهای زیست فعال به منظور تولید داروی ضد سرطان و تجاری سازی آن در مطالعات آتی ضروری به نظر می‌رسد.

هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

REFERENCES

AOAC. (2000). Official Methods of Analysis of AOAC International(17th ed). MD, USA: Association of Official Analytical Chemistry.

Bakhshan, A., Doghikolaei, A. E. & Taheri, A. (2014). The antioxidant properties of protein hydrolysate derived from waste in the fillet process of salmon (*salmo solar*). *Journal of Comparative Pathobiology*, *11* (1), 1143-1152. (In Farsi).

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. & Yang, H. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver Carp (*Hypophtalmichtys Molitrix*). *Food Chemistry*, *107 (4)*, 1485-1493.

Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. & Shamasundar, B. A. (2014). Antioxidant and Functional Properties of Fish Protein Hydrolysates from Fresh Water Carp (*C Atla Catla*) as Influenced by the Nature of Enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, *38*(3), 1207-1214.

Fu, Y. & Zhao, X. H. (2013). In vitro responses of hFOB1. 19 cells towards Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) skin gelatin hydrolysates in cell proliferation, cycle progression and apoptosis. *Journal of Functional Foods*, *5*(1), 279-288.

Guérard, F., Guimas, L. & Binet, A. (2002). Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, *19*, 489-498.

Harirchi, I., Ebrahimi, M., Zamani, N., Jarvandi, S. & Montazeri, A. (2000). Breast cancer in Iran: a review of 903 case records. *Public Health*, *114*(2), 143-145.

Hosseini, S. F., Rezaei, M., Zandi, M. & Farahmandghavi, F. (2015). Fabrication of bio-nanocomposite films based on fish gelatin reinforced with chitosan nanoparticles. *Food Hydrocolloids*, *44*, 172-182.

Hsu, K. C., Li-Chan, E. C. & Jao, C. L. (2011). Antiproliferative activity of peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle on human breast cancer cell line MCF-7. *Food Chemistry*, *126*(2), 617-622.

Hubenak, J. R., Zhang, Q., Branch, C. D. & Kronowitz, S. J. (2014). Mechanisms of injury to normal tissue after radiotherapy: a review. *Plastic and Reconstructive Surgery*, *133*(1), 49e.

Jamdar, S. N., Rajalakshmi, V., Pednekar, M. D., Juan, F., Yardi, V. & Sharma, A. (2010). Influence of degree of hydrolysis on functional properties, antioxidant activity and ACE inhibitory activity of peanut protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *121*(1), 178-184.

Kannan, A., Hettiarachchy, N. S., Marshall, M., Raghavan, S. & Kristinsson, H. (2011). Shrimp shell peptide hydrolysates inhibit human cancer cell proliferation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *91*(10), 1920-1924.

Khafaeizadeh, K., Sakhaei, N., Doustshenas, B., Ghanemi, K. & Zolgharnein, H. (2016). Evaluation of antioxidant activity of the purified peptides from hydrolysis of rotifer (*Brachionus Plicatilis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*, *25* (2), 69-78. (In Farsi).

Khaled, H. B., Ktari, N., Ghorbel-Bellaaj, O., Jridi, M., Lassoued, I. & Nasri, M. (2014). Composition, functional properties and in vitro antioxidant activity of protein

hydrolysates prepared from sardinelle (*Sardinella aurita*) muscle. *Journal of Food Science and Technology*, *51*(4), 622-633.

Khantaphant, S. & Benjakul, S. (2008). Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *151*(4), 410-419.

Kim, S. M. (2011). Antioxidant and anticancer activities of enzymatic hydrolysates of solitary tunicate (*Styela clava*). *Food Science and Biotechnology*, *20*(4), 1075.

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K. D. & 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*(6), 1019-1026.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, *193*, 265-275.

Najafian, L. & Babji, A. S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: their production, assessment, and applications. *Peptides*, *33*(1), 178-185.

Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. & 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.

Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S. & Nemati, M. (2013). Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(7), 1718-1726.

Picot, L., Bordenave, S., Didelot, S., Fruitier-Arnaudin, I., Sannier, F., Thorkelsson, G. & Piot, J. M. (2006). Antiproliferative activity of fish protein hydrolysates on human breast cancer cell lines. *Process Biochemistry*, *41*(5), 1217-1222.

Raghavan, S. & Kristinsson, H. G. (2009). ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, *117*(4), 582-588.

Rustad, T., Storrø, I. & Slizyte, R. (2011). Possibilities for the utilization of marine by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, *46*(10), 2001-2014.

Sheu, M. J., Huang, G. J., Wu, C. H., Chen, J. S., Chang, H. Y., Chang, S. J. & Chung, J. G. (2008). Ethanol extract of *Dunaliella salina* induces cell cycle arrest and apoptosis in A549 human non-small cell lung cancer cells. Journal of *In Vivo* , *22*(3), 369-378.

Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K. & Rustad, T. (2016). Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports*, *11*, 99-109.

Yen, G. C. & Wu, J. Y. (1999). Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from *Ganoderma tsugae*. *Food Chemistry*, *65*(3), 375-379.

You, L., Regenstein, J. M. & Liu, R. H. (2010). Optimization of hydrolysis conditions for the production of antioxidant peptides from fish gelatin using response surface methodology. *Journal of Food Science*, *75*(6), C582-C587.

Zhang, M., Mu, T. H. & Sun, M. J. (2014). Purification and identification of antioxidant peptides from sweet potato protein hydrolysates by Alcalase. *Journal of Functional Foods*, *7*, 191-200.