

(OPEN ACCESS)

Producing of their Antioxidant Peptides from Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) by Enzymatic Hydrolysis and Investigation of Amino Acid Profile

Elahe Sharifi Torksolouyeh¹, Ali Taheri^{*2}, Mirmahdi Zahedi³

1. Ph.D. Student in Seafood Processing, Dept. of Fisheries, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
E-mail: sharifi.elahel370@gmail.com
2. Corresponding Author, Associate Prof. of Seafood Processing, Dept. of Fisheries, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
E-mail: taherienator@gmail.com
3. Associate Prof. of Analytical Chemistry, Dept. of Marine Chemistry, Chabahar Maritime University, Chabahar, Iran.
E-mail: idm.m.zahedi@gmail.com

Article Info

Article type:

Full Length Research Paper

Article history:

Received: 12.01.2024

Revised: 01.12.2025

Accepted: 01.14.2025

Keywords:

Alcalase,
Antioxidant properties,
Enzymatic hydrolysis,
Food ProPNL,
Lumpfish

ABSTRACT

Oxidative stress, caused by the overproduction of free radicals, is a major factor in many chronic diseases, including premature aging, cancer, and cardiovascular disorders. Antioxidants play a crucial role in absorbing and neutralizing free radicals, thereby reducing their harmful effects on the body. In recent years, bioactive peptides extracted from marine protein sources have attracted much attention due to their strong antioxidant properties and natural safety. Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*), commonly used in Europe to reduce sea lice parasites in salmon co-culture, becomes waste after harvesting. This study aimed to optimize the utilization of this protein source for the production of lumpfish protein hydrolysate and antioxidant peptides. Lumpfish meat was subjected to enzymatic hydrolysis with three different treatments: Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and a combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL). The degree of hydrolysis, antioxidant properties (DPPH and ABTS radical scavenging), and amino acid profile of the samples were measured and compared. After 180 minutes, the final degree of hydrolysis in all treatments reached approximately 47-48%, with no significant difference among the treatments. All enzymatic treatments successfully produced peptides with strong antioxidant properties. At a concentration of 10 mg/mL, the FO+FL combination showed the highest DPPH radical scavenging activity (79.83%) with a significant difference, followed by FO (68.94%) and Alcalase (67.78%). At the highest concentration (4 mg/mL), all treatments showed very high ABTS radical scavenging activity (89-91%), and there was no significant difference in the IC₅₀ values among the three treatments. The enzymatic treatments resulted in different total amino acid yields, with the total amino acids in the Alcalase treatment being 680.73 mg/g, followed by FO with 640.22 mg/g and FO+FL with 599.66 mg/g. Alcalase consistently produced the highest concentrations of amino acids, especially glutamic acid (95.05 mg/g), glycine (76.65 mg/g), aspartic acid (59.43 mg/g), and lysine (51.44 mg/g). The results showed that the combination of endopeptidases (with random hydrolysis of peptide bonds)

and exopeptidases (with hydrolysis of the end points of the protein chain) can increase the production of peptides with optimal biological activity. These peptides have the potential to replace synthetic antioxidants in the food and pharmaceutical industries and can contribute to reducing biological waste and producing nutraceuticals.

Cite this article: Sharifi Torksolouyeh, Elahe, Taheri, Ali, Zahedi, Mirmahdi. 2026. Producing of their Antioxidant Peptides from Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) by Enzymatic Hydrolysis and Investigation of Amino Acid Profile. *Journal of Utilization and Cultivation of Aquatics*, 14 (4), 133-152.



© The Author(s).

Doi: 10.22069/japu.2025.23137.1922

Publisher: Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از گوشت ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) به روش آبکافت آنزیمی و بررسی پروفیل اسیدهای آمینه

الهه شریفی ترکسلویه^۱، علی طاهری^{۲*}، میرمهدی زاهدی^۳

۱. دانشجوی دکتری فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه: sharifi.elah1370@gmail.com
۲. نویسنده مسئول، دانشیار فرآوری محصولات شیلاتی، گروه شیلات، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه: taherienator@gmail.com
۳. دانشیار شیمی تجزیه، گروه شیمی دریا، دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار، چابهار، ایران. رایانامه: idm.m.zahedi@gmail.com

اطلاعات مقاله	چکیده
<p>نوع مقاله:</p> <p>مقاله کامل علمی- پژوهشی</p> <p>تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۹/۱۱</p> <p>تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۳</p> <p>تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۰/۲۵</p> <p>واژه‌های کلیدی:</p> <p>آبکافت آنزیمی،</p> <p>آلکالاز،</p> <p>خواص آنتی‌اکسیدانی،</p> <p>ماهی لومپ،</p> <p>Food ProPNL</p>	<p>استرس اکسیداتیو، ناشی از تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد، عامل اصلی بسیاری از بیماری‌های مزمن از جمله پیری زودرس، سرطان و اختلالات قلبی عروقی است. آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند و از این طریق اثرات مضر آن‌ها بر بدن را کاهش می‌دهند. در سال‌های اخیر پپتیدهای زیست‌فعال استخراج شده از منابع پروتئینی دریایی، به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی قوی و ایمنی طبیعی، توجه بسیاری را به خود جلب کرده‌اند. ماهی لومپ (<i>Cyclopterus lumpus</i>) که در اروپا عموماً برای کاهش انگل‌های شپش دریایی در کشت توام ماهی سالمون استفاده می‌شود، پس از برداشت به ضایعات تبدیل می‌شود. این پژوهش با هدف بهره‌برداری بهینه از این ماهی برای تولید پروتئین آبکافت ماهی لومپ و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی مورد بررسی قرار گرفت. گوشت ماهی لومپ تحت آبکافت آنزیمی با سه تیمار مختلف شامل آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) قرار گرفت. درجه آبکافت، خواص آنتی‌اکسیدانی حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTs و پروفایل اسیدهای آمینه نمونه‌ها اندازه‌گیری و مقایسه شد. پس از ۱۸۰ دقیقه مقدار نهایی درجه آبکافت در تمامی تیمارها به حدود ۴۸-۴۷ درصد رسید و اختلاف معنی‌داری بین تیمارها دیده نشد. تمامی تیمارهای آنزیمی موفق به تولید پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی شدند. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر تیمار ترکیبی FO+FL با اختلاف معنی‌دار بالاترین مهار رادیکال DPPH (۷۹/۸۳ درصد) را نشان داد و FO (۶۷/۹۴ درصد) و آلکالاز (۶۷/۷۸ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. میزان مهار رادیکال ABTs در بالاترین غلظت (۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر)، تمام تیمارها فعالیت مهارکنندگی</p>

بسیار بالایی (۸۹-۹۱ درصد) نشان دادند و میزان IC_{50} در سه تیمار اختلاف معناداری نداشت. تیمارهای آنزیمی منجر به بازده‌های متفاوت اسید آمینه کل شدند، به طوری که مجموع اسیدهای آمینه در تیمار آلکالاز $680/73$ میلی گرم بر گرم بود، به دنبال آن FO با مقدار $640/22$ و FO+FL با مقدار $599/66$ میلی گرم بر گرم قرار گرفتند. آلکالاز به طور مداوم بالاترین غلظت‌های اسیدهای آمینه را تولید کرد، به ویژه گلوتامیک اسید ($95/05$ میلی گرم در گرم)، گلیسین ($76/65$ میلی گرم در گرم)، آسپارتیک اسید ($59/43$ میلی گرم در گرم)، و لیزین ($51/44$ میلی گرم در گرم). نتایج نشان داد که ترکیب آنزیم‌های اندوپپتیداز (با آبکافت تصادفی پیوندهای پپتیدی) و آگزوپپتیداز (با آبکافت نقاط انتهایی زنجیره پروتئینی) می‌تواند تولید پپتیدهایی با فعالیت زیستی بهینه را افزایش دهد. این پپتیدها پتانسیل جایگزینی آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع غذایی و دارویی را دارند و می‌توانند به کاهش ضایعات زیستی و تولید غذا داروها کمک کنند.

استناد: شریفی ترکسلویه، الهه، طاهری، علی، زاهدی، میرمهدی (۱۴۰۴). تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی از گوشت ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) به روش آبکافت آنزیمی و بررسی پروفیل اسیدهای آمینه. نشریه بهره‌برداری و پرورش آبزیان، ۱۴ (۴)، ۱۵۲-۱۳۳.

Doi: 10.22069/japu.2025.23137.1922



© نویسندگان.

ناشر: دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

مقدمه

عملکردهای فیزیولوژیکی موجودات زنده به طور اجتناب‌ناپذیر با سنتز رادیکال‌های آزاد مرتبط است (۱). علاوه بر این، با افزایش سرعت زندگی در قرن معاصر، بدن انسان در معرض محرک‌های مضر متعددی قرار می‌گیرد که حاصل سبک‌های زندگی ناسالم، استرس روانی بیش از حد و تغذیه ناکافی است (۲). این محرک‌های مضر ممکن است منجر به تولید بیش از حد رادیکال‌های آزاد گونه‌های اکسیژن فعال یا ROS شوند که در نهایت در بدن انباشته می‌شوند. عدم تعادل رادیکال‌های آزاد در بدن باعث آغاز استرس اکسیداتیو می‌شود (۳). تولید بیش از حد گونه‌های اکسیژن فعال (ROS) و رادیکال‌های آزاد می‌تواند تعادل ظریف اکسیداسیون/احیا سلولی را مختل کرده و شرایط استرس اکسیداتیو را به وجود آورد. پیامدهای مضر این مهم شامل اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع، دناتوراسیون پروتئین و اسید نوکلئیک، اتصال عرضی ماکرومولکول‌ها و آسیب کلی به سلول‌ها است (۴). بسیاری از بیماری‌های مزمن انسانی، از جمله پیری، تومورها، اختلالات قلبی-عروقی و آرتریت، با حضور بیش از حد رادیکال‌های آزاد در بدن مرتبط هستند (۵). پژوهش‌ها نشان داده‌اند که استفاده از مکمل‌های آنتی‌اکسیدانی می‌تواند در حفظ تعادل بین اثرات مضر رادیکال‌های آزاد و مکانیزم‌های دفاع اکسیداتیو بدن مؤثر باشد (۶). آنتی‌اکسیدان‌ها نقش مهمی در خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد ایفا می‌کنند و از این طریق اثرات مضر آن‌ها بر بدن را کاهش می‌دهند (۷). استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در مواد غذایی به دلیل نگرانی‌های مربوط به خطرات احتمالی برای سلامتی و همچنین هزینه‌های بالا دارای محدودیت‌های بسیاری است (۷ و ۸). پژوهش‌های اخیر نشان داده‌اند که برخی از پپتیدهای زیست‌فعال می‌توانند به‌طور

مؤثری رادیکال‌های آزاد و پراکسیدان‌ها را در بدن مهار کنند. هم‌چنین طبق پژوهش‌های صورت گرفته آنتی‌اکسیدان‌های پپتیدی به‌عنوان ترکیبات ایمن در نظر گرفته می‌شوند (۹).

پپتیدها به ترکیباتی گفته می‌شود که از دو یا چند آمینو اسید آلفا تشکیل شده‌اند که توسط پیوندهای پپتیدی به روش‌های مختلف به هم متصل شده‌اند. پپتیدهای زیست‌فعال، قطعات خاصی از پروتئین‌ها هستند که بر عملکردهای بدن اثر مثبت داشته و در فرآیندهای متابولیک نقش اساسی دارند (۱۰). در سال‌های اخیر، پپتیدهای زیست‌فعال به دلیل قدرت بالا، جذب کارآمد و به‌طور طبیعی ایمن بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند (۱۱). پپتیدهای کاربردی متعددی شناسایی شده‌اند که فواید قابل توجهی برای سلامتی دارند، از جمله خواص ضدفشار خون، ضد میکروب، آنتی‌اکسیدانی، ضدسرطان و تعدیل‌کننده سیستم ایمنی بدن (۱۲، ۱۳، ۱۴). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال می‌تواند با حضور انواع آمینو اسیدها، از جمله پرولین (Pro)، گلوتامیک اسید (Glu)، تیروزین (Tyr)، فنیل‌آلانین (Phe)، آرژینین (Arg) و هیستیدین (His) بهبود یابد (۱۵).

ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus* L.) گونه‌ای نسبتاً جدید در حوزه آبی‌پروری دریایی است که پرورش آن در دهه گذشته افزایش قابل توجهی داشته و به یکی از بخش‌های به‌سرعت در حال گسترش آبی‌پروری در اروپا تبدیل شده است (۱۶). برخلاف اکثر گونه‌های آبی‌پروری، ماهی لومپ برای مصرف انسانی پرورش داده نمی‌شود، بلکه برای کاهش شپش دریایی (*Lepeophtheirus salmonis*) به‌کار می‌رود. شپش‌های دریایی تهدید جدی برای مزارع پرورش ماهی سالمون محسوب می‌شوند زیرا گسترش آن‌ها باعث آسیب اقتصادی قابل توجهی می‌شود. این انگل‌ها در برابر اکثر عوامل شیمیایی ضدانگلی

آزاد هضم می‌کنند. این آنزیم‌ها در دما و شرایط pH بهینه خود، اغلب خاص، غیرخاص یا هر دو هستند (۲۲). این آنزیم‌ها به دو دسته اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز تقسیم می‌شوند. اندوپپتیداز با آبکافت تصادفی پیوندهای پپتیدی، مولکول پروتئین را تخریب می‌کند، در حالی‌که اگزوپپتیداز پیوندهای پپتیدی را در نقاط انتهایی شکسته و اسیدهای آمینه را از سمت N یا C آزاد می‌کند. در طی فرآیند آبکافت، اگزوپپتیدازها پروتئین را پس از هضم جزئی توسط اندوپپتیدازها به‌طور کامل تجزیه می‌کنند. بنابراین، پروتئازهای مختلف، انواع متفاوتی از پپتیدها را از یک زیرلایه پروتئینی یکسان تولید می‌کنند. علاوه بر این، درجه آبکافت پروتئین بر تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی تأثیر می‌گذارد، زیرا درجه آبکافت به شدت بر اندازه و محتوای اسیدهای آمینه پپتیدهای آزاد شده تأثیر می‌گذارد، که می‌تواند فعالیت زیستی آن‌ها را تعدیل کند (۲۱). تعدادی پژوهش در مورد استخراج کلاژن از ماهی لومپ منتشر شده است (۲۳ و ۲۴). بعد از مطالعات صورت گرفته، مشخص شد پژوهش‌های محدودی وجود دارد که بر آبکافت پروتئین ماهی لومپ و بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی این منبع ارزشمند تمرکز داشته باشند. بنابر مطالب عنوان شده، در این مطالعه نخست پروتئین آبکافت ماهی لومپ با استفاده از سه تیمار آنزیمی مختلف شامل آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) صورت گرفت و سپس درجه آبکافت، خواص آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولیدشده و پروفایل اسیدهای آمینه محصولات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه از مواد شیمیایی با درجه آزمایشگاهی استفاده شده است. اسید استیک، سدیم

مقاومت نشان داده‌اند که این امر علاقه به استفاده از ماهیان رفتگر به‌عنوان یک جایگزین پایدار روش‌های شیمیایی متداول را افزایش داده است. لارو ماهی لومپ معمولاً در سن شش‌ماهگی و با وزن اولیه حدود ۲۵ گرم به قفس‌های سالمون منتقل می‌شود (۱۷). با افزایش اندازه و رسیدن به بلوغ جنسی، کارایی آن‌ها در خوردن انگل‌ها، به ویژه شپش‌ها کاهش می‌یابد. این کاهش کارایی استفاده مجدد از ماهی لومپ به‌عنوان ماهی رفتگر یا تمیزکننده را غیرعملی می‌کند (۱۸). پس از کشتار جمعیت سالمون داخل قفس، ماهی لومپ یا به‌عنوان ضایعات دور ریخته شده یا برای تولید سیلاژ استفاده می‌شود. سیلاژ تولیدشده برای فرمولاسیون خوراک دام مناسب است اما به‌طور کلی، تمام منابع کاربردی باید از اصل "اول غذا" پیروی کنند، در این اصل منابع موجود باید برای بالاترین ارزش ممکن استفاده شوند (۱۹). استفاده مجدد از زیست‌توده باقی‌مانده جدا شده از اکوسیستم دریایی به‌عنوان منبعی از پروتئین‌ها، روغن‌ها و ترکیبات دیگر با ویژگی‌های تغذیه‌ای یا کاربردی می‌تواند ضایعات را کاهش داده و مزایای مهمی را برای بخش‌های صنعتی مختلف و جامعه به‌همراه داشته باشد (۲۰).

برای آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال، روش آبکافت آنزیمی نسبت به استخراج با حلال، تخمیر و تیمار شیمیایی پروتئین‌های غذایی ترجیح داده می‌شود، زیرا در محصولات نهایی حلال‌های آلی باقی‌مانده یا مواد شیمیایی سمی آزاد نمی‌کند (۲۱). ویژگی آنزیم به اندازه شرایط بهینه دیگر مانند زمان آبکافت، دما، نسبت آنزیم به سوبسترا و pH برای فعالیت آن در تولید پپتیدهای زیست‌فعال اهمیت دارد. پروتئازهای مختلف با شکستن پیوندهای پپتیدی، پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچک‌تر و اسیدهای آمینه

سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه قرار گرفتند و سپس با سرعت $12000 \times g$ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شدند. مایع رویی هر نمونه جدا و برای مراحل بعد در دمای $20^\circ C$ درجه سانتی‌گراد ذخیره شدند.

اندازه‌گیری درجه آبکافت (DH): درجه آبکافت نمونه‌ها با استفاده از روش آدلر-نیسن (۱۹۷۹) تعیین شد. به‌طور خلاصه، 0.5 میلی‌لیتر از هر نمونه با 4 میلی‌لیتر محلول 1 درصد سدیم دودسیل سولفات (SDS) مخلوط شد. از این مخلوط، 25 میکرولیتر جدا و به یک لوله اضافه شد. محلول 1 درصد SDS به‌عنوان نمونه کنترل استفاده شد. به هر نمونه و کنترل 200 میکرولیتر محلول بافر فسفات (0.2 مولار با pH 7.2) اضافه و سپس 200 میکرولیتر محلول تازه TNBS اضافه شد. نمونه‌ها در دمای $50^\circ C$ درجه سانتی‌گراد به مدت 60 دقیقه در یک انکوباتور شیکردار با سرعت 150 دور در دقیقه قرار گرفتند. واکنش با اضافه کردن 400 میکرولیتر محلول HCl (0.1 مولار) خاتمه یافت. پس از 30 دقیقه، جذب هر نمونه در 420 نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis اندازه‌گیری شد. یک منحنی استاندارد با استفاده از غلظت‌های لوسین در بازه 0.5 تا 7.5 میلی‌مولار ایجاد و درجه آبکافت با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۲۵).

$$h = \frac{A_{420} - b}{m} \quad (1)$$

که در آن، A_{420} جذب در طول موج 420 نانومتر، b عرض از مبدأ در منحنی کالیبراسیون، m شیب منحنی کالیبراسیون.

$$DH = \frac{h}{h_{total}} \times 100 \quad (2)$$

که در آن، h مقدار آبکافت (محاسبه‌شده از رابطه اول)، h_{total} غلظت پروتئین کل، DH درجه آبکافت (بر حسب درصد).

هیدروکسید و اسید کلریدریک از شرکت Merck سوئد تأمین شدند (Merck Life Sciences, Sweden). $2,2$ -دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل (DPPH)، $2,2$ -آزینوبیس (۳-اتیل‌بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTs)، ترلوکس، $2,4,6$ -تری‌نیتروبنزن سولفونیک اسید (TNBs) و سدیم دودسیل سولفات (SDS) از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا تهیه شدند. آنزیم‌های Food Pro PNL، آلکالاز و فلاورزایم از شرکت Nofima نروژ تأمین شدند.

فرآیند آبکافت آنزیمی: گوشت ماهی لومپ چرخ شده با بافر فسفات 0.1 مولار، pH 7 با نسبت $1:2$ ترکیب شد و دمای سوسپانسیون به $55^\circ C$ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. سپس سه روش تیمار آنزیمی مختلف اعمال شد: سپس ترکیب‌های مختلف آنزیمی به این صورت اعمال گردید: در تیمار اول ابتدا آنزیم Food ProPNL (اندوپپتیداز) اضافه و بعد از 90 دقیقه، فلاورزایم (اگزوپپتیداز) اضافه شد. در تیمار دوم Food ProPNL که یک آنزیم اندوپپتیداز است اضافه گردید و در تیمار آخر آنزیم آلکالاز (ترکیبی از اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز) به مخلوط اضافه شد. هر کدام به میزان 5 درصد از کل پروتئین نمونه به‌کار رفته‌اند. فرآیند آبکافت تحت هم‌زدن مداوم در یک انکوباتور به مدت 3 ساعت انجام شد. پس از اتمام واکنش، با حرارت دادن مخلوط در دمای $85^\circ C$ درجه سانتی‌گراد به مدت 15 دقیقه آنزیم‌های موجود در نمونه غیرفعال شدند. سپس مخلوط حاصل با سرعت $12000 \times g$ به مدت 20 دقیقه سانتریفیوژ شد و پس از آن، مایع رویی فیلتر و با کمک دستگاه خشک‌کن انجمادی خشک گردید و برای تحلیل‌های بعدی در دمای $20^\circ C$ درجه سانتی‌گراد ذخیره شد. در طول فرآیند آبکافت، نمونه‌برداری برای تعیین درجه آبکافت در فواصل زمانی 20 ، 40 ، 60 ، 90 ، 120 و 180 دقیقه صورت گرفت. طبق روال قبل برای غیرفعال‌سازی آنزیم، این نمونه‌ها در دمای $85^\circ C$ درجه

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): ظرفیت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های آبکافت با استفاده از روش اصلاح‌شده از روش شیمادا و همکاران (۱۹۹۲) ارزیابی شد. در این آزمون، نمونه‌های آبکافت شده با غلظت‌های مختلف با یک محلول DPPH ۰/۱ میلی‌مولار تهیه‌شده در اتانول ۹۵٪ به نسبت ۱:۱ مخلوط شدند. مخلوط‌ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند، سپس جذب در ۵۱۷ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis 60UV-vis، Agilent Technologies، سانتا کلارا، آمریکا) اندازه‌گیری شد. به‌جای نمونه آبکافت شده، از آب مقطر به‌عنوان کنترل استفاده شد. یک منحنی استاندارد با استفاده از ترولوکس در غلظت‌های ۰/۲۵ تا ۰/۵ میلی‌مولار ایجاد شد. مقدار جذب پایین‌تر به ظرفیت بالاتر مهار رادیکال آزاد اشاره دارد، که با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۲۶).

$$DPPH = \frac{Blank\ Absorbance - Sample\ Absorbance}{Blank\ Absorbance} \times 100 \quad (۳)$$

$$IC50\% = \frac{50-b}{m} \quad (۴)$$

فعالیت مهار رادیکال آزاد ۲،۲-آزینو-بیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) (ABTS): فعالیت مهار رادیکال آزاد ABTS پپتیدها با پیروی از روش ارائه‌شده توسط اوبن و همکاران (۲۰۰۵) ارزیابی شد. به‌طور خلاصه، محلول ABTS با حل کردن ۷ میلی‌مولار از ABTS در آب مقطر، همراه با ۲/۴۵ میلی‌مولار پتاسیم پرسولفات ($K_2S_2O_8$) تهیه شد. مخلوط واکنش در تاریکی و در دمای اتاق به مدت ۱۲ تا ۱۶ ساعت نگه‌داری شد تا کاتیون رادیکال ($ABTS^{+}$) تولید شود. محلول رادیکال حاصل با

اتانول رقیق شد تا جذب آن به مقدار 0.02 ± 0.07 در طول موج ۷۳۴ نانومتر برسد. برای آزمون، ۹۵۰ میکرولیتر از محلول رادیکال ABTS با ۵۰ میکرولیتر از محلول نمونه ترکیب شد و جذب در ۷۳۴ نانومتر پس از ۶ دقیقه در دمای اتاق با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقدار جذب پایین‌تر به ظرفیت بالاتر مهار رادیکال آزاد اشاره دارد، که با استفاده از رابطه‌های زیر محاسبه شد (۲۷).

$$ABTS = \frac{Blank\ Absorbance - Sample\ Absorbance}{Blank\ Absorbance} \times 100 \quad (۵)$$

$$IC50\% = \frac{50-b}{m} \quad (۶)$$

اندازه‌گیری پروفیل اسید آمینه پپتیدهای حاصل از آبکافت آنزیمی ماهی لومپ: ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های آبکافت با روش توصیف‌شده توسط اوزکان و سنیووا (۲۰۰۶)، با برخی اصلاحات، تحلیل شد. نمونه‌های پپتید لیوفیلیزه‌شده (۵۰ میلی‌گرم) با ۸ میلی‌لیتر HCl (۶ نرمال) مخلوط شده و در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت تحت آبکافت اسیدی قرار گرفتند. پس از آبکافت، نمونه‌ها با اسید استیک ۰/۲ مولار رقیق شده و به‌طور خودکار به یک سیستم LC/MS HPLC (Agilent 1100) والدبرون، آلمان) تزریق شدند و در تکرارها با استانداردهای آمینواسید مقایسه شدند (۲۸).

آنالیز داده‌ها: تفاوت معنی‌داری داده‌ها از طریق تحلیل واریانس یک‌طرفه (One Way ANOVA) بر روی نتایج بررسی شد. برای مقایسه میانگین مقادیر، از آزمون چنددامنه دانکن استفاده شد. معنی‌داری داده‌ها در سطح $P < 0.05$ به‌دست آمد. تحلیل‌های آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS و رسم نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Origin صورت گرفت.

نتایج و بحث

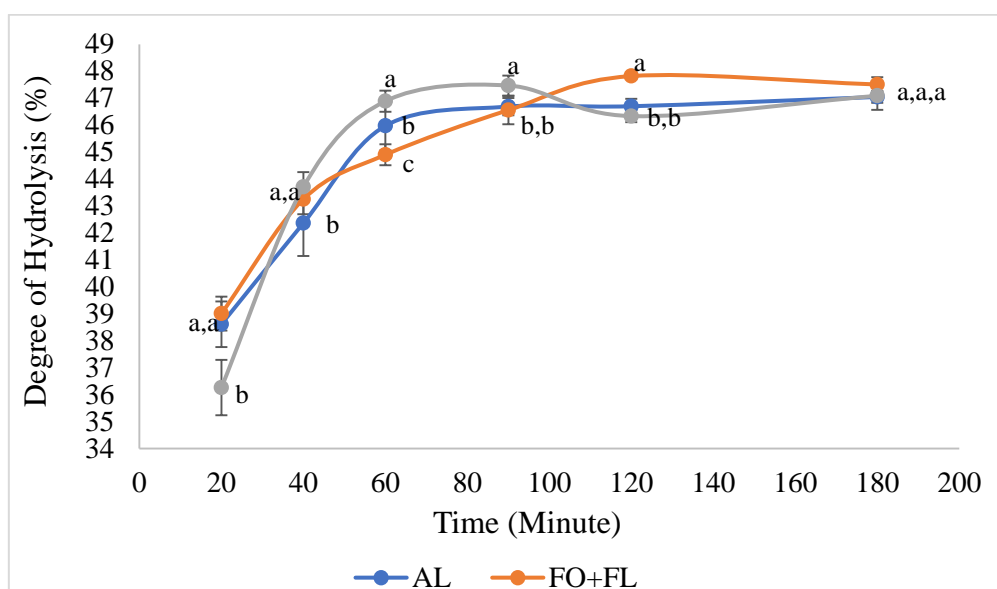
تأثیر آنزیم‌های مختلف بر درجه آبکافت پروتئین: درجه آبکافت، که نشان‌دهنده شکستن پیوندهای پپتیدی است، در فواصل زمانی منظم ۲۰، ۴۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه در طول فرآیند آبکافت اندازه‌گیری شد (شکل ۱). نتایج نشان داد که تمامی تیمارها روندی مشابه را دنبال کردند، ابتدا درجه آبکافت در ۳۰ دقیقه اولیه به سرعت افزایش یافت و سپس به یک حالت ثابت رسید. این آبکافت سریع اولیه احتمالاً به دلیل دسترسی زیاد به محل‌های اتصال بستر و فعالیت کاتالیتیکی آنزیم‌ها در شرایط بهینه pH و دما بوده است (۲۹). همان‌طور که آبکافت پیشرفت می‌کند، تعداد مکان‌های شکافتی قابل دسترس کاهش می‌یابد و منجر به ایجاد یک ثبات در درجه آبکافت می‌شود (۲۰، ۳۰).

آلکالاز در مراحل اولیه آبکافت، درجه آبکافت بالاتری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. این امر مورد انتظار است زیرا آلکالاز یک پروتئاز شناخته‌شده با فعالیت اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز است که به آن اجازه می‌دهد به‌طور مؤثر پیوندهای پپتیدی را بشکند و پپتیدها و آمینو اسیدهای کوچک‌تری آزاد کند (۳۱، ۳۲، ۳۳). این آنزیم به کارآمدی خود در آبکافت انواع سوبستراهای پروتئینی از جمله پروتئین‌های ماهی شناخته شده است (۳۳). پس از ۱۸۰ دقیقه مقدار نهایی درجه آبکافت به حدود ۴۷/۵۱ درصد رسید که با سایر مطالعات مربوط به استفاده از آلکالاز در آبکافت پروتئین ماهی قابل مقایسه است (۲۰، ۳۲). تیمار FO روندی مشابه با آلکالاز نشان داد اما در مراحل اولیه آبکافت درجه آبکافت کم‌تری داشت. این امر ممکن است به دلیل فعالیت اندوپپتیدازی آن باشد که اگرچه مؤثر است، اما به محل‌های اتصال خاصی در ساختار پروتئین مادری محدود می‌شود (۳۴). درجه آبکافت نهایی (۴۷/۱ درصد) با تیمار

آلکالاز اختلاف معنی‌داری نداشت و نشان می‌دهد که فعالیت اندوپپتیدازی به تنهایی می‌تواند تحت شرایط بهینه به درجات بالای آبکافت دست یابد. همچنین نرخ کمی پایین‌تر نسبت به آلکالاز که در ابتدای آبکافت مشاهده می‌شود ممکن است به دلیل الگوی برش خاص‌تر آن باشد که می‌تواند تعداد پیوندهای مستعد موجود در مراحل ابتدایی آبکافت را محدود کند (۳۵). تیمار FO+FL منحنی درجه آبکافت مشابهی با سایر تیمارها نشان داد. با استفاده متوالی از اندوپپتیداز (FO) و اگزوپپتیداز (FL) انتظار می‌رفت آبکافت را از طریق تکمیل فعالیت‌های یکدیگر افزایش دهند (۳۶). با این حال، درجه آبکافت نهایی (۴۷/۰۵ درصد) تفاوت معنی‌داری با تیمارهای دیگر نداشت. این موضوع ممکن است به دلیل اشباع بستر یا همپوشانی ویژگی‌های بستر باشد که آبکافت اضافی را محدود کرد. تیمار اولیه اندوپپتیدازی ممکن است اکثر پیوندهای مستعد را شکسته باشد و بستر محدودی برای اگزوپپتیداز باقی گذاشته باشد (۳۷). در مطالعه‌ای که توسط برجس و همکاران (۲۰۲۳) صورت گرفت افزایش غلظت آنزیم آلکالاز از ۱ به ۲/۵ درصد منجر به افزایش درجه آبکافت شد اما آلکالاز مورد استفاده در مقادیر بین ۲/۵ تا ۵ درصد درجه آبکافت مشابه‌ای را در کل فرآیند نشان داد. بعد از گذشت زمان کوتاهی، درجه آبکافت به حدود ۵۰ درصد رسید که نشان می‌دهد سرعت آبکافت در اوایل فرآیند بالا بوده و سپس به حالت ثابت می‌رسد که با مطالعه حاضر مطابقت دارد (۳۸). افزایش سریع اولیه در درجه آبکافت و سپس ثابت شدن آن با مطالعه‌های دیگر در زمینه آبکافت آنزیمی پروتئین سازگار است (۳۹). به‌عنوان مثال، در مطالعه‌ای روی آبکافت پروتئین ماهی کپور سر بزرگ با استفاده از آنزیم فلاورزایم روند مشابهی مشاهده شد که مقادیر درجه آبکافت در ۱، ۳ و ۶ ساعت به ترتیب برابر با

است که در آن دسترسی به بستر یا ویژگی آنزیمی دیگر به‌طور قابل‌توجهی بر واکنش تأثیر نمی‌گذارد. در حالی‌که تمامی تیمارها در آبکافت مؤثر هستند، انتخاب آنزیم می‌تواند بر سایر ویژگی‌های آبکافت مانند پروفیل اسیدآمینه پپتیدها، خواص زیست‌فعال و عملکردی آن‌ها تأثیر بگذارد، زیرا آلکالاز ممکن است پپتیدهای کوتاه‌تری تولید کند در حالی‌که FO در ابتدا زنجیره‌های طولانی‌تر را حفظ کند (۴۱).

۱۶/۵۶، ۲۲/۲۳ و ۲۵/۴۸ درصد بود (۴۰). این الگو افزایش سریع درجه آبکافت و سپس ثابت شدن مقادیر آن در طول زمان برای آبکافت آنزیمی پروتئین معمول است و کاهش دسترسی به سایت‌های قابل آبکافت را در طول فرآیند نشان می‌دهد. مقادیر مشابه نهایی درجه آبکافت در تمام تیمارها نشان می‌دهد که هر سه استراتژی آنزیمی برای تولید پروتئین آبکافت ماهی لومپ مؤثر هستند. هم‌چنین تحت شرایط مورد استفاده، فعالیت آنزیمی به یک حالت ثابت رسیده



شکل ۱- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب استفاده از Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) بر درجه آبکافت پروتئین ماهی لومپ در فرآیند آبکافت آنزیمی.

Figure 1. The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the degree of hydrolysis of lumpfish protein in the enzymatic hydrolysis process.

برای ارزیابی ظرفیت انتقال الکترون آن‌ها استفاده شدند. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ بر اساس توانایی آن‌ها در مهار رادیکال DPPH ارزیابی شد که به صورت درصد مهار این رادیکال در شکل ۲ بیان شده است. غیرفعال کردن رادیکال به‌عنوان یک مکانیسم اساسی توسط آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از فرآیندهای اکسیداتیو استفاده می‌شود. ۲،۲-دی‌فنیل-۱-پیکریل‌هیدرازیل

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ: منابع دریایی به‌عنوان منبعی برای پپتیدهای فعال زیستی عمل می‌کنند که پتانسیل نشان دادن فعالیت آنتی‌اکسیدانی را دارند. برای تعیین خواص آنتی‌اکسیدانی این پپتیدها، آزمایش‌های مختلف اغلب شامل ارزیابی‌هایی است که توانایی آن‌ها را در پاکسازی کاتیون‌های رادیکالی اندازه‌گیری می‌کنند. به‌طور خاص، رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS

طول آبکافت پروتئین اثرات افزایشی ایجاد می‌کند (۴۳، ۴۴). بنابراین، یک رویکرد ترکیبی از اندوپپتیدازها و آگزوپپتیدازها ممکن است منجر به آزادسازی پپتیدهایی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالا (با وزن مولکولی کوچک‌تر) شود (۴۵، ۴۶). آبکافت متوالی امکان آزادسازی پپتیدهای کوچک‌تر با ساختارهای متنوع را فراهم می‌کند که شامل اسیدهای آمینه معطر و باقی‌مانده‌های هیدروفوبیک هستند. این ترکیبات به‌طور شناخته‌شده‌ای در فعالیت مهار رادیکال‌ها مؤثر هستند.

یافته‌های مشابهی در مطالعاتی که استفاده از آگزوپپتیداز پس از پیش‌تیمار با اندوپپتیداز منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی شد، گزارش شده است (۳۳، ۳۵). برای مثال، مطالعه‌ای روی پروتئین‌های آبکافت گربه‌ماهی نشان داد که شرایط بهینه آنزیمی می‌تواند به مهار رادیکال DPPH تا ۸۶/۱ درصد برسد و پتانسیل تولید آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی قوی را نشان دهد (۴۷). هم‌چنین، پژوهشی روی محصولات جانبی ماهی از ناوگان ماهی‌گیری شمال غرب اسپانیا نشان داد که تیمارهای متوالی آنزیمی آبکافت‌هایی با فعالیت بالای مهار رادیکال DPPH و دیگر خواص زیست‌فعال ایجاد کرد (۴۸). تیمار FO به تنهایی در غلظت‌های متوسط و پایین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی کمی بالاتر از آلكالاز نشان داد، هر چند که هر دو آنزیم در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نتایج مشابهی داشتند. این تفاوت ممکن است به دلیل ویژگی‌های خاص آنزیمی FO باشد که عمدتاً پیوندهای داخلی پپتیدی را شکسته و احتمالاً باقی‌مانده‌های هیدروفوبیک و اسیدهای آمینه معطر بیش‌تری را آشکار می‌کند که برای فعالیت آنتی‌اکسیدانی حیاتی هستند. از سوی دیگر، مشخصات گسترده شکافت آلكالاز ممکن است منجر به تولید پروفایل پپتیدی کم‌تر بهینه برای مهار رادیکال

(DPPH)، که دارای یک الکترون جفت نشده است، مستعد جذب یون هیدروژن است و بنابراین پایداری آن در حضور غیرفعال‌کننده‌های رادیکال آزاد افزایش می‌یابد. نتایج مهار رادیکال DPPH سه تیمار آلكالاز، FO+FL و FO در غلظت‌های مختلف محصول (۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر، ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر و ۲/۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر) سنجش شد که در شکل ۲ نیز نشان داده شده است. در غلظت ۱۰ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر ترکیب آنزیم FO+FL با اختلاف معنی‌دار بالاترین مهار رادیکال DPPH (۷۹/۸۳ درصد) را نشان داد و FO (۶۸/۹۴ درصد) و آلكالاز (۶۷/۷۸ درصد) در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. در غلظت ۵ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر FO+FL دوباره فعالیت آنتی‌اکسیدانی برتری داشت (۵۱/۳۹ درصد) و FO (۴۶/۴۵ درصد) بهتر از آلكالاز (۴۵/۶۵ درصد) عمل کرد اما تفاوت آن‌ها معنی‌دار نبود.

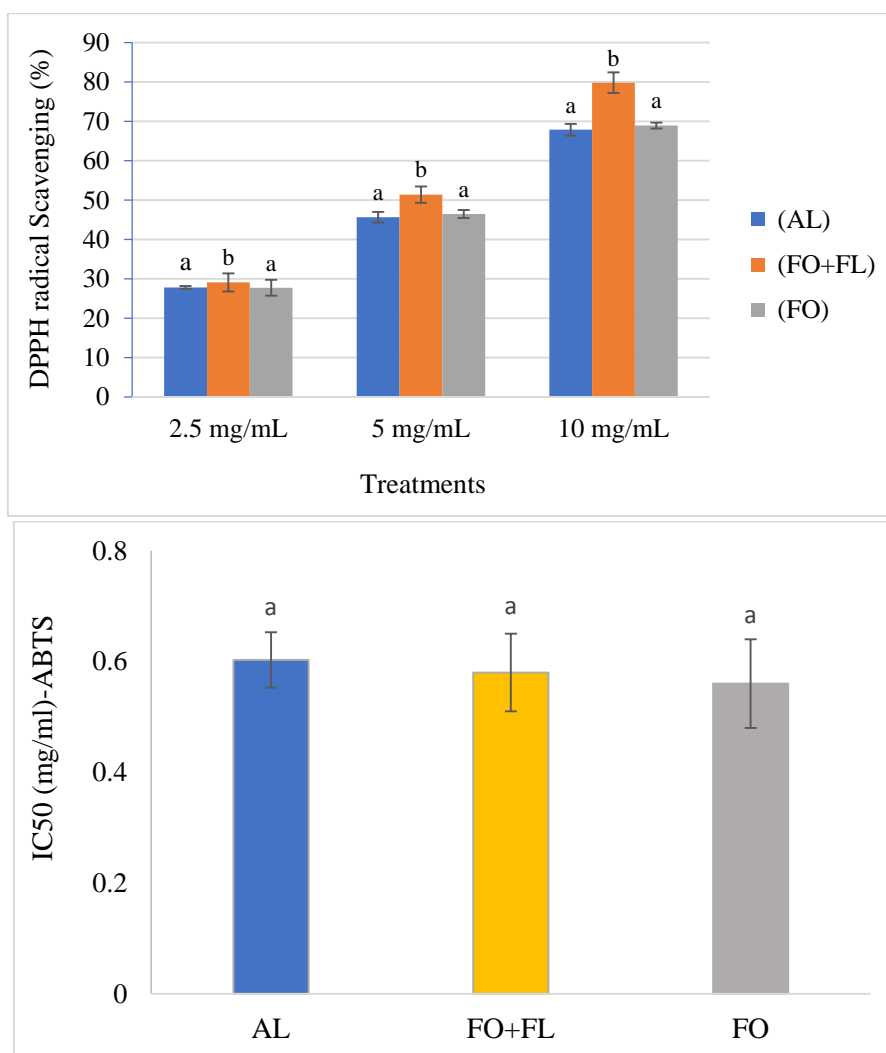
این یافته‌ها با مطالعات پیشین روی پروتئین‌های آبکافت ماهی مطابقت دارد و نقش آبکافت آنزیمی را در افزایش خواص آنتی‌اکسیدانی برجسته می‌کند. همان‌طور که اشاره شد تیمار FO+FL بالاترین میزان مهار DPPH رادیکال آزاد را در تمامی غلظت‌ها نشان داد و مقادیر آن به ۷۹/۸۳ درصد در غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسید. این عملکرد برتر احتمالاً به دلیل عملکرد مکمل FO (اندوپپتیداز) و فلاورزایم (آگزوپپتیداز) است. اندوپپتیدازها بر پیوندهای α -پپتیدی داخلی عمل می‌کنند که دور از انتهای N یا C زنجیره قرار دارند (۴۲). آگزوپپتیدازها اسیدهای آمینه منفرد، دی‌پپتیدها یا تری‌پپتیدها را از انتهای N یا C یک زنجیره پلی‌پپتیدی آزاد می‌کنند و آبکافت توسط اندوپپتیدازها منجر به آبکافت محدود یک پروتئین می‌شود (۴۲)، که در نتیجه بیش‌تر پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر به‌عنوان محصولات باقی می‌مانند. استفاده هم‌زمان از اندوپپتیدازها و آگزوپپتیدازها در

میلی‌لیتر)، تمام تیمارها فعالیت مهارکنندگی بسیار بالایی (۸۹-۹۱ درصد) نشان دادند، که نشان‌دهنده پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قوی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ است. میزان IC_{50} % در سه تیمار اختلاف معناداری نداشتند و در آبکافت‌های تیمار شده با آلکالاز، FO+FL و FO، به ترتیب ۰/۶، ۰/۵۸ و ۰/۵۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر مشاهده شد.

این یافته‌ها نشان‌دهنده پتانسیل بالای مهار رادیکال ABTS در تمام تیمارهای آنزیمی است، این روند با گزارش‌های مطالعات قبلی هم‌خوانی دارد که در آن‌ها آبکافت آنزیمی می‌تواند پپتیدهایی با خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آزاد کند (۳۱، ۳۴). مطالعات روی پروتئین‌های آبکافت ماهی تیمار شده با آلکالاز به‌طور مداوم روندهای مشابهی را نشان داده‌اند، که کارایی آن را در توسعه غذاهای کارکردی پیشنهاد می‌کند (۳۶). بنابراین، ترکیب اندوپپتیدازها و اگزوپپتیدازها برای تولید پروتئین‌های آبکافتی آنتی‌اکسیدانی مفید است زیرا پپتیدهای کوتاه‌تر آزاد می‌شوند. این امر در مطالعه‌ای بر روی آبکافت‌های کازئین که با استفاده از آزمون ABTS بررسی شد، نشان داده شد. یک محلول کازئین غیرآبکافت شده اثری آنتی‌اکسیدانی در حدود ۱۵ درصد نشان داد اما پس از آبکافت با استفاده از آلکالاز، اثر آنتی‌اکسیدانی به حدود ۲۷ درصد افزایش یافت. کاربرد یک پروتئین ترکیبی (FUS-PepN-PepX) که شامل دو نوع اگزوپپتیداز آمینوپپتیداز عمومی، و پرول-دی‌پپتیدیل-آمینوپپتیداز بود، اثر آنتی‌اکسیدانی را به بیش از ۴۰ درصد نسبت به کازئین غیرآبکافت شده افزایش داد (۵۰). فعالیت قوی مهار رادیکال ABTS در پروتئین آبکافت ماهی لومپ احتمالاً ناشی از آزاد شدن پپتیدهای زیست‌فعال در طی آبکافت آنزیمی است. این پپتیدها ممکن است حاوی توالی‌های خاصی از اسیدهای آمینه یا ویژگی‌های ساختاری باشند که به آن‌ها اجازه می‌دهد رادیکال‌های آزاد را به‌طور مؤثر خنثی کنند.

DPPH شود. روندهای مشابهی در مطالعه‌ای روی پروتئین آبکافت ماهی *Catla catla* مشاهده شد، جایی که پروتئین‌های مختلف بسته به مکانیزم عمل خود، فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی تولید کردند. برای مثال، آبکافت‌های تهیه‌شده با بروملین (آنزیمی با سایت‌های شکافت خاص) فعالیت مهار رادیکال DPPH بالاتری نسبت به آلکالاز داشتند (۴۹). این موضوع تأکید می‌کند که ویژگی آنزیمی نقش مهمی در تعیین خواص زیست‌فعال آبکافت‌ها دارد. در مطالعه‌ای روی آبکافت‌های ماهی *Ribbon Fish* مشاهده شد که آلکالاز آبکافت‌هایی با خواص آنتی‌اکسیدانی خوب اما نه بهینه تولید می‌کند که این امر به محدودیت اندازه پپتیدها نسبت داده شد (۳۱). اثرگذاری بیش‌تر FO+FL ممکن است بازتاب توانایی آن در آشکار کردن باقی‌مانده‌های هیدروفوبیک و اسیدهای آمینه معطر باشد که از عوامل کلیدی مهار رادیکال DPPH هستند. این یافته با مطالعاتی که نشان داده‌اند تیمارهای متوالی آنزیمی خواص زیست‌فعال عملکردی آبکافت‌ها را با آزادسازی پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی قوی‌تر بهبود می‌بخشند، هم‌خوانی دارد (۹).

هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ از طریق توانایی آن‌ها در مهار رادیکال‌های ABTS ارزیابی شد. یکی دیگر از روش‌های سنجش که به‌طور مکرر استفاده می‌شود، آزمون حذف ۲،۲-آزینوبیس (۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید) یا آزمون ABTS است. در این آزمون، ABTS توسط رادیکال‌های پروکسیل یا سایر اکسیدان‌ها به کاتیون رادیکال آن، $ABTS^{+}$ اکسید می‌شود. میزان مهار این رادیکال در غلظت‌های مختلف آبکافت‌ها (۰/۵، ۱، ۲ و ۴ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) بررسی شد و نتایج به صورت IC_{50} % در شکل ۲ ارائه شده است. در بالاترین غلظت (۴ میلی‌گرم/



شکل ۲- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلکالاز (AL)، Food ProPNL (FO) و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) بر فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH و ABTs پروتئین آبکافت ماهی لومپ. حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌ها است. حروف مختلف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری بین گروه‌ها در سطح $P < 0.05$ است.

Figure 2. The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the DPPH and ABTS radical scavenging activity of lumpfish hydrolyzed protein. Similar letters indicate no significant statistical difference between groups, while different letters indicate a significant statistical difference between groups at the level of $P < 0.05$.

پروپیل اسیدهای آمینه و تأثیر تیمارهای آنزیمی بر ترکیب اسیدهای آمینه: ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پپتیدها به‌طور پیچیده با ترکیب اسید آمینه آن‌ها، توالی این اسیدهای آمینه و خواص آب‌گریز آن‌ها مرتبط است (۵۱). پروپیل اسیدهای آمینه شامل ۱۷ اسید آمینه بررسی شد. تیمارهای آنزیمی منجر به بازده‌های متفاوت اسید آمینه کل شدند، به‌طوری‌که مجموع

اسیدهای آمینه در تیمار آلکالاز ۶۸۰/۷۳ میلی‌گرم بر گرم بود، به دنبال آن FO با مقدار ۶۴۰/۲۲ و FO+FL با مقدار ۵۹۹/۶۶ میلی‌گرم بر گرم قرار گرفتند. آلکالاز به‌طور مداوم بالاترین غلظت‌های اسیدهای آمینه را تولید کرد، به‌ویژه گلوتامیک اسید (۹۵/۰۵ میلی‌گرم در گرم)، گلیسین (۷۶/۶۵ میلی‌گرم در گرم)، آسپارتیک اسید (۵۹/۴۳ میلی‌گرم در گرم)،

و لیزین (۵۱/۴۴ میلی‌گرم در گرم). این عملکرد برتر را می‌توان به اختصاصیت گسترده آلکالاز و فعالیت‌های ترکیبی اندوپپتیدازی و اگزوپپتیدازی آن نسبت داد. محتوای اسیدهای آمینه ضروری در مطالعه حاضر قابل مقایسه با گزارش قبلی نومان و همکاران (۲۰۲۰) بود، که در آن از آلکالاز و پاپائین برای ایجاد پروتئین‌های آبکافتی از تاس‌ماهی چینی استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که محتوای اسید آمینه ضروری در آبکافت‌های به‌دست آمده از آلکالاز ۴۹/۶۲ (گرم در ۱۰۰ گرم پروتئین) بود (۵۲).

کارایی آلکالاز در آزادسازی طیف گسترده‌ای از اسیدهای آمینه، از جمله اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین، با یافته‌های مطالعات انجام شده روی گونه‌های دیگر ماهی هم‌خوانی دارد. در دونگ و همکاران (۲۰۰۸) ماهی کپور نقره‌ای با آنزیم آلکالاز و فلاورزیم آبکافت شد. در نمونه تیمار شده با آلکالاز، هر دو اسید آمینه گوگردی (متیونین و سیستئین) افزایش ۱ تا ۳ برابری نشان دادند. افزایش جزئی در پرولین نیز در پروتئین ماهی کپور نقره‌ای آبکافت شده با آلکالاز مشاهده شد. چندین آمینواسید مانند تیروزین، متیونین، هیستیدین، لیزین و تریپتوفان که به‌طور کلی به‌عنوان آنتی‌اکسیدان شناخته شده‌اند و همچنین محتوای کلی آمینواسیدهای هیدروفوبیک در پروتئین‌های آبکافت ماهی کپور نقره‌ای با آلکالاز بالاتر از فلاورزیم بود (۵۳). این نتایج نشان می‌دهند که آلکالاز به‌دلیل فعالیت ترکیبی اندوپپتیداز و اگزوپپتیداز، در آزادسازی اسیدهای آمینه مؤثرتر بوده است.

مقادیر لیزین و آلانین در تیمار FO قابل توجه بود این موضوع نشان می‌دهد که فعالیت اندوپپتیدازی

FO در شکستن پیوندهای پپتیدی خاص مؤثر است و احتمالاً بقایای آب‌گریز بیش‌تری را آشکار می‌کند. محتوای نسبتاً بالای لیزین از دیدگاه تغذیه‌ای مهم است، زیرا لیزین یک اسید آمینه ضروری است که اغلب در پروتئین‌های گیاهی محدود است. در مطالعه آسپویک و همکاران (۲۰۲۱) گزارش شده است که محتوای کل پروتئین در آبکافت‌های ستون فقرات ماهی سالمون، ماکرل و هرینگ که با استفاده از آنزیم FO تهیه شده بود، به‌ترتیب ۹۲/۱، ۸۹/۹ و ۸۴/۹ گرم در ۱۰۰ گرم بود درحالی‌که با استفاده از آنزیم بروملین به ترتیب ۳۵/۲، ۳۴/۱ و ۳۳/۸ گرم در ۱۰۰ گرم مشاهده شد (۵۴).

محتوای بالای گلوتامیک اسید، گلیسین و اسید آسپارتیک در آبکافت‌های حاصل از تیمار با آلکالاز نشان‌دهنده کاربردهای بالقوه در بهبود طعم است. به‌ویژه، گلوتامیک اسید به‌دلیل نقش آن در طعم یومامی یا طعم ویژه آبزیان شناخته شده است. حضور اسیدهای آمینه ضروری مانند لیزین و لوسین در تمام تیمارها، نشان‌دهنده ارزش تغذیه‌ای پروتئین‌های آبکافت ماهی لومپ است. اسیدهای آمینه آروماتیک و هیستیدین در توالی پپتید به‌عنوان مهارکننده مستقیم رادیکال عمل می‌کنند. وجود اسیدهای آمینه آروماتیک در ساختار یک پپتید یک مزیت است زیرا می‌تواند پروتون‌ها را به راحتی به رادیکال‌هایی که کمبود الکترون دارند، اهدا کنند و در عین حال ثبات خود را از طریق ساختارهای رزونانس حفظ کنند. از این رو می‌توان حدس زد که تفاوت در فعالیت مهار اکسیداسیون می‌تواند به دلیل وزن مولکولی یا آرایش خاص اسیدهای آمینه باقی مانده در توالی پپتید باشد (۵۵).

جدول ۱- تأثیر تیمارهای آنزیمی مختلف آلكالاز (AL)، Food ProPNL (FO)، و ترکیب Food ProPNL و فلاورزایم (FO+FL) بر پروفایل اسیدهای آمینه پروتئین آبکافت ماهی لومپ (mg g^{-1}).

Table 1. The effect of different enzymatic treatments of Alcalase (AL), Food ProPNL (FO), and the combination of Food ProPNL and Flavourzyme (FO+FL) on the amino acid profile of lumpfish hydrolyzed protein (mg/g).

آنزیم‌ها Enzymes			اسید آمینه Amino acid
FO	FO+FL	AL	
48.76±0.16 ^a	47.08±0.42 ^a	0.07 ^b ±51.44	لیزین LSN
12.57±0.02 ^a	11.76±0.25 ^a	13.23±0.13 ^a	هیستیدین HIS
35.38±0.24 ^b	28.85±1.46 ^a	36.25±1.33 ^b	آرژنین ARG
70.97±1.83 ^b	65.54±1.86 ^a	76.65±1.34 ^c	گلیسین GLY
34.65±0.22 ^a	32.59±1.17 ^a	17/36±0.01 ^b	سرین SER
45.32±0.64 ^a	41.80±2.11 ^a	48.58±1.56 ^b	آلانین ALA
29.43±0.11 ^a	27.92±1.88 ^a	31.39±0.09 ^a	ترئونین THR
54.47±0.74 ^a	52.08±1.33 ^a	59.43±1.08 ^b	آسپارتیک اسید ASP
88.29±1.35 ^b	82.59±1.14 ^a	95.05±1.34 ^c	گلوتامیک اسید GLU
45.70±0.54 ^b	41.58±1.23 ^a	49.91±0.07 ^c	پرولین PRO
27.78±0.28 ^a	27.23±1.26 ^a	29.33±1/03 ^a	والین VAL
18.81±0.23 ^a	17.61±0.72 ^a	19.49±0.22 ^a	متیونین MET
16.78±0.25 ^a	16.56±0.57 ^a	16.70±0.2 ^a	تیروزین TYR
44.87±0.27 ^{ab}	42.50±1.96 ^a	46.02±1.36 ^b	ایزولوسین ILE
42.93±0.62 ^a	41.52±1.49 ^a	45.96±0.29 ^b	لوسین LEU
23.49±0.64 ^{ab}	22.45±0.91 ^a	25.13±0.35 ^b	فنیل آلانین PHE
640.22 ^b	599.66 ^a	680.73 ^c	اسید آمینه کل Total

حروف a, b و c نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف در سطح $P < 0.05$ می‌باشد

The letters a, b, and c indicate significant differences in each row at the level of $P < 0.05$

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر به بررسی قابلیت استفاده از پروتئین آبکافت ماهی لومپ (*Cyclopterus lumpus*) به‌عنوان منبعی برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال با خواص آنتی‌اکسیدانی پرداخته است. این رویکرد در راستای استفاده بهینه از ضایعات دریایی و بهره‌برداری از منابع پایدار صورت گرفت. نتایج این مطالعه نشان داد که آبکافت آنزیمی پروتئین‌های این ماهی با استفاده از آنزیم‌های مختلف، می‌تواند به تولید پپتیدهایی منجر شود که نه تنها دارای خواص آنتی‌اکسیدانی قوی هستند، بلکه می‌توانند به‌عنوان جایگزین طبیعی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی در صنایع مختلف مورد بررسی قرار گیرند. از سه تیمار آنزیمی استفاده شده، تیمار ترکیبی FO+FL عملکرد برتری در مهار رادیکال‌های آزاد نشان داد، که می‌تواند به اثرات هم‌افزایی این دو آنزیم نسبت داده شود. این ترکیب با آزادسازی پپتیدهای کوتاه‌تر و با زیست‌فعالی بیشتر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیش‌تری نسبت به سایر تیمارها نشان داد. از سوی دیگر، آلکالاز به دلیل ویژگی‌های اندوپپتیدازی و آگزوپپتیدازی گسترده خود، قادر به تولید مقادیر بیش‌تری از اسیدهای آمینه ضروری و طعم‌دهنده بود که می‌تواند کاربردهای بالقوه‌ای در بهبود ارزش تغذیه‌ای و طعم محصولات داشته باشد.

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای تولید شده، از جمله توانایی مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS، نشان‌دهنده پتانسیل بالای این ترکیبات در مقابله با استرس اکسیداتیو است. این ویژگی می‌تواند به کاربرد

این پپتیدها در فرمولاسیون مکمل‌های غذایی، محصولات آرایشی-بهداشتی و دارویی منجر شود. علاوه بر این، استفاده از آبکافت آنزیمی یک روش پایدار زیست‌محیطی برای فرآوری ضایعات شیلاتی به‌شمار می‌آید. از منظر محیط‌زیستی، نتایج این پژوهش نقش مهمی در کاهش ضایعات دریایی و حمایت از اقتصاد چرخه‌ای دارد. استفاده از ضایعات ماهی لومپ به‌عنوان یک منبع پروتئینی با ارزش افزوده، نه تنها از هدررفت منابع طبیعی جلوگیری می‌کند، بلکه به کاهش وابستگی به آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی و بهره‌گیری از جایگزین‌های طبیعی و ایمن کمک می‌کند. در مجموع، این مطالعه نشان داد که پروتئین‌های استخراج‌شده از ماهی لومپ، به‌ویژه از طریق آبکافت آنزیمی با تیمارهای مناسب، می‌توانند به‌عنوان یک منبع نوآورانه برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال باشند. توسعه این فناوری نه تنها گامی مؤثر در راستای پایداری منابع دریایی و کاهش ضایعات است، بلکه می‌تواند به پیشرفت صنایع مختلف از طریق تولید ترکیبات طبیعی، ایمن و با کارایی بالا کمک کند.

سپاسگزاری

نویسندگان از دانشگاه دریانوردی و علوم دریایی چابهار به جهت حمایت مادی و معنوی از پژوهش حاضر در قالب رساله دکتری خانم الهه شریفی تشکر می‌نمایند.

منابع

1. Wen, C., Zhang, Y., Liu, Y., & Zhang, H. (2020). Purification and identification of novel antioxidant peptides from watermelon seed protein hydrolysates and their cytoprotective effects on H₂O₂-induced oxidative stress. *Food Chemistry*, 327, 127059. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127059>.
2. Liu, W., Liu, Y., & Zhang, Y. (2022). Anti-inflammatory function of plant-derived bioactive peptides: A review. *Foods*, 11(15), 2361. <https://doi.org/10.3390/foods11152361>.
3. Avilés-Gaxiola, S., López-Cervantes, J., & González-Córdova, A. F. (2021). Antioxidant and anti-inflammatory properties of novel peptides from *Moringa oleifera* Lam. leaves. *South African Journal of Botany*, 141, 466-473. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2021.04.005>.
4. Yang, S., & Lian, G. (2020). ROS and diseases: Role in metabolism and energy supply. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 467, 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11010-020-03892-1>.
5. Rahman, M. S., Saha, S., & Rahman, M. M. (2018). A novel antioxidant peptide, purified from *Bacillus amyloliquefaciens*, showed strong antioxidant potential via Nrf-2 mediated heme oxygenase-1 expression. *Food Chemistry*, 239, 502-510. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.051>.
6. Wang, J. Y., Zhang, Y., & Liu, X. (2020). Triphenylphosphonium (TPP)-based antioxidants: A new perspective on antioxidant design. *ChemMedChem*, 15(5), 404-410. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900730>.
7. Guo, H., Zhang, Y., Wang, Y., Liu, X., & Chen, X. (2023). Separation and purification of antioxidant peptide from fermented whey protein by *Lactobacillus rhamnosus* B2-1. *Food Science of Animal Resources*, 43(1), 10. <https://doi.org/10.5851/fsar.2023.10>.
8. Zhang, F., Wang, Y., Liu, Y., & Chen, X. (2019). Purification and identification of an antioxidative peptide from peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) seed dreg. *Food Chemistry*, 285, 266-274. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.02.020>.
9. Chen, X., Li, Y., Zhang, Y., & Zhao, Y. (2023). Antioxidant peptides from the collagen of antler ossified tissue and their protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage toward HaCaT cells. *Molecules*, 28(19), 6887. <https://doi.org/10.3390/molecules28196887>.
10. Xia, Z., Zhang, Y., Wang, Y., & Liu, X. (2022). Purification, identification, and antioxidative mechanism of three novel selenium-enriched oyster antioxidant peptides. *Food Research International*, 157, 111359. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111359>.
11. López-García, G., Pérez, M., & Martínez, J. (2022). Antioxidant and antimicrobial peptides derived from food proteins. *Molecules*, 27(4), 1343. <https://doi.org/10.3390/molecules27041343>.
12. Duffuler, P., Boulanger, A., & Gauthier, C. (2022). Bioactive peptides: From basic research to clinical trials and commercialization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(12), 3585-3595. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.2c00823>.
13. Patil, P. J., Shukla, S. S., & Khedkar, V. M. (2022). Exploring bioactive peptides as potential therapeutic and biotechnology treasures: A contemporary perspective. *Life Sciences*, 301, 120637. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2022.120637>.
14. Zaky, A. A., El-Sayed, M. A., & El-Baz, F. K. (2022). Bioactivities, applications, safety, and health benefits of bioactive peptides from food and by-products: A review. *Frontiers in Nutrition*, 8, 815640. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.815640>.

15. Rajapakse, N., & Mendis, E. (2005). Purification and in vitro antioxidative effects of giant squid muscle peptides on free radical-mediated oxidative systems. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 16(9), 562-569. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.04.002>.
16. Brooker, A. J., Papadopoulou, A., Gutierrez, C., Rey, S., Davie, A., & Migaud, H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183(12), 383-383.
17. Ageeva, T. N., & Kolesnikova, S. A. (2021). Lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) used as cleaner fish: Characterization and suitability for human consumption. *Applied Food Research*, 1(2), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2021.100008>.
18. Brooker, A. J., & Stien, L. H. (2018). Sustainable production and use of cleaner fish for the biological control of sea lice: Recent advances and current challenges. *Veterinary Record*, 183(12), 383. <https://doi.org/10.1136/vr.k490>.
19. Vang, B., & Haug, A. (2021). Utfordringer som hindrer økt utnyttelse av marine restråstoff og marine arter. *Nofima Rapportserie*.
20. Lian, K., Zhang, Y., & Wang, Y. (2024). More sustainable use of aquaculture cleaner fish: Collagen-rich protein hydrolysates from lumpfish (*Cyclopterus lumpus*)—effects of biomass, pretreatment, and enzyme choice. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 8, 1346548. <https://doi.org/10.3389/fsufs.2024.1346548>.
21. Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.014>.
22. Ashaolu, T. J. (2020). Applications of soy protein hydrolysates in the emerging functional foods: A review. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(2), 421-428. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14467>.
23. Zhuang, X., Zhang, Y., & Liu, Y. (2018). The ecological study of isolation and characterization of acid and pepsin-soluble collagens from the skin of lumpfish. *Ekoloji Dergisi*, 106.
24. Vate, N. K., & Zhang, Y. (2023). Structural and functional properties of collagen isolated from lumpfish and starfish using isoelectric precipitation vs salting out. *Food Chemistry: X*, 18, 100646. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100646>.
25. Adler-Nissen, J. (1979). Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 27(6), 1256-1262. <https://doi.org/10.1021/jf60255a002>.
26. Shimada, K., & Yamamoto, T. (1992). Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(6), 945-948. <https://doi.org/10.1021/jf00018a014>.
27. Obon, J. M., & Gómez, M. (2005). Assessment of the TEAC method for determining the antioxidant capacity of synthetic red food colorants. *Food Research International*, 38(8-9), 843-845. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2005.02.006>.
28. Özcan, S., & Şenyuva, H. Z. (2006). Improved and simplified liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry method for the analysis of underivatized free amino acids in various foods. *Journal of Chromatography A*, 1135(2), 179-185. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.04.058>.
29. Adler-Nissen, J. (1986). Enzymic hydrolysis of food proteins. UK: Elsevier.
30. Abd El-Rady, T. K., & El-Sayed, M. A. (2023). Effect of different hydrolysis

- methods on composition and functional properties of fish protein hydrolysate obtained from bigeye tuna waste. *International Journal of Food Science and Technology*, 58(12), 6552-6562. <https://doi.org/10.1111/ijfs.16299>.
31. Shahidi, F., Han, X. Q., & Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53(3), 285-293. [https://doi.org/10.1016/0308-8146\(95\)00077-2](https://doi.org/10.1016/0308-8146(95)00077-2).
 32. Hai, T. (2020). Hydrolysis methods for protein extraction from seafood. *American Journal of Biomedical Science & Research*, 11(2), 222-224. <https://doi.org/10.34297/ajbsr.2020.11.001>.
 33. Ren, L., & Zhang, Y. (2021). Enzymatic hydrolysis of broken rice protein: Antioxidant activities by chemical and cellular antioxidant methods. *Frontiers in Nutrition*, 8, 788078. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.788078>.
 34. Kristinsson, H. G., & Rasco, B. A. (2000). Fish protein hydrolysates: Production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1), 43-81. <https://doi.org/10.1080/10408690091189228>.
 35. Anggraeni, S. L., & Sari, R. (2022). Edamame protein hydrolysis using *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus paracasei* produce short peptides with higher antioxidant potential. *Biodiversitas Journal of Biological Diversity*, 23(7). <https://doi.org/10.13057/biodiv/d230731>.
 36. Zhang, Y., & Liu, Y. (2011). Influence of the degree of hydrolysis (DH) on antioxidant properties and radical-scavenging activities of peanut peptides prepared from fermented peanut meal. *European Food Research and Technology*, 232, 941-950. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1446-1>.
 37. Dent, T., & Maleky, F. (2023). Pulse protein processing: The effect of processing choices and enzymatic hydrolysis on ingredient functionality. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 63(29), 9914-9925. <https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2231234>.
 38. Borges, S., & Ferreira, I. (2023). Fish by-products: A source of enzymes to generate circular bioactive hydrolysates. *Molecules*, 28(3), 1155. <https://doi.org/10.3390/molecules28031155>.
 39. Camargo, T. R., & Silva, A. (2021). Biological activities of the protein hydrolysate obtained from two fishes common in the fisheries bycatch. *Food Chemistry*, 342, 128361. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.128361>.
 40. Alahmad, K., & Khedher, N. B. (2023). Influence of the enzymatic hydrolysis using flavourzyme enzyme on functional, secondary structure, and antioxidant characteristics of protein hydrolysates produced from bighead carp (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Molecules*, 28(2), 519. <https://doi.org/10.3390/molecules28020519>.
 41. Nielsen, P., Petersen, D., & Dambmann, C. (2001). Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science*, 66(5), 642-646. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2001.tb04682.x>.
 42. Rawlings, N. D., Morton, F. R., & Barrett, A. J. (2007). An introduction to peptidases and the MEROPS database. In *Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications* (pp. 161-179). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6359-6_10.
 43. Merz, M., & Pohl, M. (2015). Wheat gluten hydrolysis using isolated Flavourzyme peptidases: Product inhibition and determination of synergistic effects using response surface methodology. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 122, 218-226. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2015.06.006>.
 44. Stressler, T., & Ewert, J. (2013). Characterization of the recombinant exopeptidases PepX and PepN from *Lactobacillus helveticus* ATCC 12046 important for food protein hydrolysis.

- PLoS One*, 8(7), e70055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070055>.
45. Ewert, J., & Stressler, T. (2019). An innovative two-step enzymatic membrane bioreactor approach for the continuous production of antioxidative casein hydrolysates with reduced bitterness. *Biochemical Engineering Journal*, 150, 107261. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.107261>.
46. Braun, C., Ewert, J., & Stressler, T. (2017). Characterization of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) of the fusion protein FUS-PepN_PepX and their application for milk protein hydrolysis. *European Food Research and Technology*, 243, 1815-1828. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2830-5>.
47. Nguyen, H. T., & Tran, T. (2022). Protein characteristics and bioactivity of fish protein hydrolysates from tra catfish (*Pangasius hypophthalmus*) side stream isolates. *Foods*, 11(24), 4102. <https://doi.org/10.3390/foods11244102>.
48. Henriques, A., & Varela, J. (2021). Characterization of protein hydrolysates from fish discards and by-products from the North-West Spain fishing fleet as potential sources of bioactive peptides. *Marine Drugs*, 19(6), 338. <https://doi.org/10.3390/md19060338>.
49. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., & Shamasundar, B. (2014). Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla Catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3), 1207-1214. <https://doi.org/10.1111/jfpp.12036>.
50. Stressler, T., & Ewert, J. (2016). A fusion protein consisting of the exopeptidases PepN and PepX-production, characterization, and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 7499-7515. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7468-4>.
51. Alemán, A., & Gómez-Guillén, M. C. (2011). Antioxidant activity of several marine skin gelatins. *LWT - Food Science and Technology*, 44(2), 407-413. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.10.010>.
52. Noman, A., & Zhang, Y. (2020). Effects of ultrasonic, microwave, and combined ultrasonic-microwave pretreatments on the enzymatic hydrolysis process and protein hydrolysate properties obtained from Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*). *Journal of Food Biochemistry*, 44(8), e13292. <https://doi.org/10.1111/jfbc.13292>.
53. Dong, S., & Zhang, Y. (2008). Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107(4), 1485-1493. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.09.013>.
54. Aspevik, T., & Haug, A. (2021). Nutritional and sensory properties of protein hydrolysates based on salmon (*Salmo salar*), mackerel (*Scomber scombrus*), and herring (*Clupea harengus*) heads and backbones. *Frontiers in Nutrition*, 8, 695151. <https://doi.org/10.3389/fnut.2021.695151>.
55. Himaya, S., & Kim, S. K. (2012). Peptide isolated from Japanese flounder skin gelatin protects against cellular oxidative damage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9112-9119. <https://doi.org/10.1021/jf302158u>.