بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)

زهرا یعقوب‌زاده[۱]، حامی کابوسی*[۱]، فاطمه پیروی قادیکلایی[۲] ، رضا صفری[۳]، اسماعیل فتاحی[۴]

*h.kaboosi@iauamol.ac.ir

۱- گروه میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران
۲- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم شهر ، قائم شهر، ایران
۳- پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران
٤- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله آملی، آمل، ایران

تاریخ دریافت: دی ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۷

چکیده

مطالعه حاضر به بررسی خواص ضدباکتریایی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) تولید شده با آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم می‌پردازد. فعالیت ضد باکتریایی پروتئین هیدرولیز شده (FPH) به روش های انتشار دیسک، انتشار چاهک و رقیق سازی انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آزمون های قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH و قدرت احیاءکنندگی آهن در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ppm بررسی شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز و فلاورزایم قادر به مهار رشد (حداقل غلظت بازدارندگی MIC) باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* (سویه های استاندارد) نبودند، ولی دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده و آنزیم فلاورزایم نسبت به آنزیم آلکالاز قادر به تولید پودر پروتئینی با درجه هیدرولیز بالاتری (۱/۷۵±۴۳/۸۳) بود. قدرت مهار رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز به طور معنی‌داری بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بود ($p<۰/۰۵$). اما در مورد قدرت احیاءکنندگی آهن عکس این نتیجه بود و پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم قدرت احیاءکنندگی بالاتری نسبت به هیدرولیز حاصل از آلکالاز داشت ($p<۰/۰۵$). با افزایش غلظت خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت. در صورتیکه آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT قدرت مهار رادیکال DPPH و قدرت احیاءکنندگی آهن بالاتری نسبت به پروتئین‌های هیدرولیز شده آلکالاز و فلاورزایم داشتند. نتایج نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده کمتر از ۳ کیلودالتون پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان قادر به مهار رشد باکتری‌ها نمی‌باشند، اما می‌توانند به عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی مواد تشکیل دهنده در تهیه غذاها و محصولات بهداشتی پیشنهاد شوند.

لغات کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، ماهی قزل آلای رنگین کمان، پروتئین هیدرولیز شده، خواص ضدباکتریایی ، خواص آنتی اکسیدانی

*نویسنده مسئول

مقدمه

سالانه حجم عظیمی از ضایعات ماهیان شامل سر، امعا و احشا، پوست، باله و اسکلت در کارخانه‌های فرآوری آبزیان استحصال می‌شوند که تا ۷۵ درصد از کل وزن صید را شامل می‌شود (Rustad *et al.*, 2011). تبدیل ضایعات شیلاتی به ترکیباتی با ارزش افزوده، راه حلی مناسب جهت کاهش آلودگی زیست محیطی و استفاده بهینه از ضایعات آبزیان می باشد (Guerard *et al.*, 2002) . پپتیدهای ضد میکروبی جزء مهمی از سیستم ایمنی ذاتی هستند، آنها در منابع مختلفی وجود دارند و می‌توانند پاسخ های التهابی را تعدیل کنند (Devin & Hancock, 2002). ماهیان دارای انواع پپتیدهای ضد میکروبی می‌باشند که می‌توانند به عنوان داروهای ضد باکتری، ضد قارچی، ضد ویروسی و ضد تومور استفاده شوند (Rajanbabu & Chen, 2011). از پروتئین هیدرولیز شده ماهی پپتیدهای ضد میکروبی مختلفی جدا کردند. فعالیت ضد میکروبی پوست هموژن شده ماهی *Epinephelus fario* (Zhang *et al.*, 2004)، ژلاتین پوست ماهی تون (*Thunnus tonggol*) و اسکوئید (*Dosidicus gigas*) (Gómez-Guillén *et al.*, 2011)، فیله آنچوی نیمه برفی هیدرولیز شده با آنزیم پپسین (۴) و پروتئین هیدرولیز شده ماهیچه ماهی باربل (Sila *et al.*, 2014) بر ضد باکتری‌های بیماریزای مختلف انسان اثبات شده است.

پپتیدهای ضد میکروبی معمولاً کمتر از ۵۰ اسید آمینه دارند و تقریبا نیمی از پپتیدهای ضد میکروبی در طبیعت آبگریز هستند (Shahidi & Zhong, 2008; Najafian & Babji, 2012). در چند دهه اخیر، استفاده بیش از حد از آنتی بیوتیک‌ها در داروهای انسانی و دامپزشکی به منظور کاهش پاتوژن ها منجر به بروز باکتری های مقاوم به چند دارو شده است (Tohidpour *et al.*, 2010). یکی از روش‌های حل این مشکل استفاده از پپتیدهای ضد میکروبی می باشد (Najafian & Babji, 2012).

اکسیداسیون لیپیدها با بیماری های قلبی-عروقی، سرطان و اختلالات عصبی و همچنین فرآیند پیری مرتبط است (Ovissipour *et al.*, 2013). از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی مانندBHT (Butylated hydroxyl ltoluene) و BHA (Butylated hydroxy anisole) برای جلوگیری از پراکسیداسیون لیپیدها در غذا استفاده می‌شود (Gómez-Ruiz *et al.*, 2008). امروزه توجه زیادی به آنتی اکسیدان‌های طبیعی در گیاهان و آبزیان شده است. بررسی‌های خفایی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) نشان داد که هیدرولیزهای روتیفرها (*Brachionus plicatilis*) دارای فعالیت آنتی اکسیدانی چشمگیری است و امکان استفاده از آن به عنوان مکمل در مواد غذایی قابل بررسی می باشد. دیبا و همکاران (۱۳۹۵) گزارش کردندکه خیار دریایی *Holothuria arva* دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بوده است. آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT با غظت ۲۰۰ppm دارای قدرت مهار رادیکال DPPH بترتیب ۹۲/۳۹ و ۸۷/۳۸ و قدرت احیاءکنندگی آهن بترتیب ۰/۰۹۳ و ۰/۰۸۹ را داشتند (Elavarasan *et al.*, 2014). آنزیم‌های مختلف مانند آلکالاز (یک آندوپروتئیناز سرین که تحت شرایط قلیایی فعال است)، فلاورزیم (دارای فعالیت اندو و اکسی پپتیدازی)، برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص آنتی‌اکسیدانی و عملکردی مورد استفاده قرار گرفته است (Elavarasan *et al.*, 2014). با توجه به عوارض جانبی آنتی اکسیدان‌های سنتزی، تحقیق بر آنتی اکسیدان‌های طبیعی ضروری است (Chalamaiah *et al.*, 2012). پروتئین هیدرولیز شده ماهی، ترکیبات زیست فعالی هستند که به عنوان مکمل غذایی براحتی جذب شده و برای فعالیت‌های مختلف متابولیک استفاده می‌شوند (Chalamaiah *et al.*, 2012). تولید پپتیدهای زیست فعال از آبزیان طی دهه گذشته بسیار مورد توجه قرار گرفته است (Raghavan & Kristinsson, 2008, 2009). در حال حاضر، ۲۶ درصد از تولید تجاری آزاد ماهیان را قزل‌آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) بخود اختصاص داده است. ماهی قزل‌آلای رنگین کمان یکی از گونه‌های مهم پرورشی آب شیرین در ایران می باشدکه فرآوری آن مقادیر فراوانی پوست خام بر جای می‌گذارد (Tabarestani *et al.*, 2010).

به دلیل عرضه ماهی به صورت فیله توسط برخی از کارخانه‌های شیلاتی، امروزه پوست ماهی به یکی از مشکلات صنعت فرآوری محصولات شیلاتی تبدیل شده است. جهت کاهش آلودگی زیست محیطی می توان از پوست ماهی در صنایع تبدیلی و استخراج ترکیبات زیست فعال استفاده کرد. بنابراین، در تحقیق حاضر هیدرولیز آنزیمی برای تولید ترکیبات زیست فعال از پوست ماهی قزل آلای رنگین‌کمان بکار گرفته شده است. لذا، فعالیت ضدباکتریایی با روش‌های انتشار دیسک، انتشار چاهک و رقیق‌سازی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، با استفاده از آزمون‌هایDPPH و آزمون قدرت احیاءکنندگی یون آهن بررسی شد.

مواد و روش‌ها

ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۱۰۰۰- ۸۰۰ گرم از استخر پرورش ماهی قزل‌آلا در ساری تهیه و در کنار یخ به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شد. سپس پوست ماهی جدا گردیده به قطعات کوچک برش داده شد و به عنوان ماده خام اولیه تا زمان مصرف در دمای۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری گردید. آنزیم آلکالاز (استخراج شده از *Bacillus licheniformis*) و فلاورزایم (استخراج شده از*Aspergillus oryzae*) از نمایندگی شرکت نووزایم (دانمارک) در ایران تهیه و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. باکتری‌های مورد مطالعه *Pseudomonas aeruginosa* با شماره ATCC 27853 و *Staphylococcus aureus* با شماره ATCC25923 بود که به صورت لیوفیلیزه از سازمان پژوهش‌های علمی صنعتی ایران تهیه گردید. آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT از شرکت مرک تهیه و استفاده شدند.

سنجش ترکیبات پوست ماهی

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

تهیه پروتئین هیدرولیز شده از پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان

برای انجام عملیات هیدرولیز، ابتدا پوست منجمد شده، جهت یخ زدایی در دمای اتاق قرار گرفت سپس ۱۰۰ گرم از آن توزین و به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری (هر کدام ۵۰ گرم) انتقال داده شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر (نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲) به هر ارلن مایر حاوی نمونه اضافه شد. سپس ارلن ها به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آنزیم‌های داخلی پوست غیرفعال شوند (Guerard *et al.*, 2012). بعد از خنک شدن ارلن‌ها، آنزیم آلکالاز به میزان ۱ درصد (محتوی پروتئین) به ارلن اول اضافه شد و هیدرولیز به مدت ۹۰ دقیقه در pH ۸/۵ و دمای ۵۸ درجه انجام شد. پس از آن آنزیم فلورزایم به مقدار۱ درصد (محتوی پروتئین) به ارلن دوم اضافه شد و هیدرولیز به مدت ۹۰ دقیقه در pH ۷و دمای ۵۰ درجه انجام گردید. سپس از فرآیند حرارتی در دمای ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه جهت غیرفعال کردن آنزیم‌ها استفاده - گردید. بعد از این زمان، ارلن ها در دمای محیط خنک و سپس محتویات آنها،۱۰ دقیقه با دور g× ۱۰۰۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی گراد، سانتریفیوژ شدند. سوپرناتانت‌ها (مایعات رویی) با استفاده از خشک‌کن انجمادی، خشک گردیدند (Ojagh *et al.*, 2012). پودرهای تولیدی در کیسه‌های زیپ دار در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شدند. تولید پروتئین هیدرولیز شده در سه تکرارانجام گردید.

اندازه گیری درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز (DH) به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA)۲۰ درصد (حجمی/ حجمی) اندازه گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های

محلول در تری کلرو استیک اسید به کل پروتئین های موجود در نمونه حاصل از سانتریفیوژ پس از هیدرولیز است. بدین منظور حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شده و پس از هم زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۶۷۰۰×g) سانتریفیوژ شدند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با روش Lowry اندازه گیری 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 معادله ذیل محاسبه شد (Raghavan and Kristinsson, 2008).

$$DH = \frac{\text{TCA 10\% - soluble N in sample}}{\text{Total N in Sample}} \times 100$$

جداسازی پپتیدها

جداسازی پپتیدها توسط اولترا فیلتراسیون با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (MWCO)، ۳ و۳۰ کیلودالتون انجام شد. سه فرکشن (MW<3kDa)، (3kDa<MW<30kDa)، (MW>30kDa) جدا گردید. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۳۰ کیلودالتون، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰×*g* سانتریفیوژ (Sigma 2-16kl، اسپانیا) شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۳۰ کیلودالتون مجددا با استفاده از فیلتر آمیکون ۳ کیلودالتون ، در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰×*g* سانتریفیوژ شد. بدین ترتیب، پپتیدهای کمتر از ۳ کیلودالتون ، بین ۳ و ۳۰ کیلودالتون و بیشتر از ۳۰ کیلودالتون جدا شدند.

بررسی اثرات ضد میکروبی

فعالیت ضد میکروبی با استفاده از غلظت های متفاوت در برابر دو نوع باکتری*Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* مورد بررسی قرار گرفتند. محلول پروتئین هیدرولیز شده از فیلتر سر سرنگی ۰/۲۲ میکرون عبور داده شد تا از نظر آلودگی باکتریایی استریل گردد.

ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی پپتیدها

روش انتشار دیسک (Disk Diffusion)

در این روش دیسک های بلانک استریل، به مدت ۵ دقیقه در محلول پپتیدهای زیست فعال زیر ۳ کیلودالتون قرار داده شدند تا پروتئین ها کاملا جذب دیسک ها شدند. سپس این دیسک ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده تا خشک شوند. از کشت ۲۴ ساعته باکتری *سودوموناس آئروجینوزا* و *استافیلوکوکوس اورئوس* سوسپانسیون باکتریایی معادل نیم مک‌فارلند تهیه و به وسیله سوآپ بر سطح محیط کشت TSA کشت یکنواخت داده شد. دیسک های حاوی پروتئین هیدرولیز شده بر سطح آگار قرار گرفتند و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در ۳۵ درجه سانتی‌گراد گرمخانه‌گذاری شدند. با اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد در اطراف دیسک‌ها، حساسیت یا مقاومت باکتری‌ها به پپتیدهای زیست فعال مشخص شد (Ojagh *et al.*, 2012).

روش انتشار چاهک (Well Diffusion)

دراین روش همانند روش انتشار دیسک سوسپانسیون باکتریایی سودوموناس آئروجینوزا و استافیلوکوکوس اورئوس را در سطح پلیت آگار طوری پخش گردید، بطوریکه به طوریکنواخت تمام سطح پلیت را بپوشاند. سپس، یک چاهک به قطر ۸-۶ میلی متر در شرایط استریل با پانچ استریل از آگارتعبیه شده و حجم مشخص (۱۰۰-۲۰ میلی لیتر) از پپتیدهای زیست فعال زیر ۳ کیلودالتون تهیه شده با غلظت معین به چاهک اضافه شدند. پلیت‌ها ابتدا در ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه شدند. فعالیت ضد میکروبی با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر مورد بررسی قرار گرفت (Jemil *et al.*, 2014).

روش رقیق سازی (Micro dilution)

در این روش سری‌های ۱۰ تایی رقت پروتئین هیدرولیز شده زیر ۳ کیلودالتون به مقدار ۰/۵ میلی لیتر در ۱۰ لوله آزمایش ریخته شد. به تمام لوله‌ها ۲ میلی لیتر محیط

کشت TSB و µl ۱۰۰ سوسپانسیون باکتری اضافه شد (غلظت نهایی باکتری در هر لوله در حد نیم مک فارلند تنظیم شد). یک لوله حاوی محیط کشت و باکتری برای شاهد مثبت و یک لوله حاوی محیط کشت برای شاهد منفی تهیه شد . تمامی لوله‌ها به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. سپس کمترین غلظت از پروتئین هیدرولیز شده که در آن هیچگونه کدورت ناشی از رشد مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت ممانعت کنندگی در نظر گرفته شد (Ojagh *et al*., 2012).

بررسی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی

۲ شاخص ضد اکسیدانی مهم یعنی قدرت مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و احیاء یون آهن سه ظرفیتی در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ ppm محاسبه شد.

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲و۲ دی فنیل ۱- پیکریل هیدرازیل DPPH

ابتدا پروتئین هیدرولیز شده تا غلظت ۲ میلی گرم در میلی لیتر در آب حل شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر محلول ۰/۱ میلی مولار رادیکال DPPH در اتانول ۹۹/۵ درصد اضافه گردید. محلول حاصل با سرعت بالا هموژن و به مدت ۳۰ دقیقه در مکان تاریک قرار داده شد و متعاقب جذب آن در طول موج ۵۱۷ نانومتر با استفاده از 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 آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT در غلظت ppm ۲۰۰ استفاده گردید. قدرت پروتئین های هیدرولیز شده برای مهار رادیکال DPPH با استفاده از فرمول ذیل محاسبه گردید (Yen and Wu,1999).

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

قدرت احیاءکنندگی 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٪ وزنی حجمی پتاسیم فری سیانید مخلوط شد. این محلول به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد 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 هیدرولیز شده، از آنتی اکسیدان های سنتزی BHT و BHA در غلظت ppm۲۰۰ به عنوان یک عامل احیاءکننده استفاده شد.

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد . میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم افزار Excel محاسبه شد. از نرم افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ برای آنالیز داده ها و از نرم افزارExcel برای رسم نمودارها استفاده گردید .

نتایج

تعیین ترکیبات تقریبی

نتایج مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی پوست خشک شده ماهی قزل آلای رنگین کمان و پروتئین هیدرولیز شده آن توسط دو آنزیم الکالاز و فلاورزایم در جدول ۱ ارائه شده است. همانطوریکه مشاهده می‌شود، میزان پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلا به میزان قابل توجهی نسبت به ماده اولیه پوست و سایر ترکیبات شیمیایی بالاتر بود. میزان رطوبت در پروتئین هیدرولیزشده نسبت به ماده خام پوست افزایش داشت. اما میزان چربی در پروتئین هیدرولیزشده نسبت به مادهی خام پوست کاهش داشت. در حالیکه خاکستر پروتئین

هیدرولیزشده با فلاورزایم نسبت به ماده خام پوست افزایش و خاکستر پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز نسبت به ماده خام پوست کاهش داشته است. درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز بود ($p<0/05$) (جدول۲).

فعالیت ضدباکتریایی

دربررسی فعالیت ضد باکتریایی توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به روش‌های انتشار دیسک، انتشار چاهک و رقیق سازی پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۳ کیلودالتون قادر به مهار رشد باکتری‌های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* نبود (جدول ۳). هاله مهاری در سطح پلیت‌ها مشاهده نشد و در روش رقیق سازی تمامی لوله ها دارای کدورت بودند.

جدول ۱: آنالیز شیمیایی ماده خام (بر اساس وزن خشک) و پروتئینهای هیدرولیز شده حاصل از آن
Table 1: Chemical analysis of raw material (based on dry weight) and its hydrolyzed proteins.

ماده	رطوبت(%)	چربی(%)	خاکستر(%)	پروتئین (%)
پوست قزل آلا	۵/۳۷±۰/۳۳^{a}	۴۷/۳۷±۰/۳۶^{a}	۶/۳۵±۰/۳۹^{a}	۴۱/۵۶ ±۰/۴۱^{a}
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز	۸/۵۲ ±۰/۴۹^{b}	۲۰/۶۰ ±۱/۶۵^{b}	۵/۴۴ ±۰/۵۳^{b}	۷۳/۴۵ ±۰/۶۵^{b}
پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم	۷/۵۳ ±۰/۴۶^{c}	۲۴/۳۵ ±۰/۶۵^{c}	۶/۸۵ ±۰/۲۸^{a}	۶۹/۴۵ ±۰/۷۶^{c}

حروف متفاوت اختلاف معنی دار را نشان می دهد. داده ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است.

جدول ۲: درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلا
Table 2: Hydrolytic degree, Hydrolyzed protein of salmon skin.

آنزیم	pH	دما (درجه سانتیگراد)	زمان(دقیقه)	درجه هیدرولیز ٪
آلکالاز	۸/۵	۵۸	۹۰	۲۸/۳۸±۱/۶۴ ^{a}
فلاورزایم	۷	۵۰	۹۰	۴۳/۸۳±۱/۷۵ ^{b}

حروف متفاوت اختلاف معنی دار را نشان می دهد. داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار است.

جدول ۳ : بررسی فعالیت ضد باکتریایی با روش انتشار دیسک
Table 3: Antibacterial activity with disk diffusion method.

نمونه	*Pseudomonas aeruginosa*	*Staphylococcus aureus*
پروتئین خام محلول	R	R
پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز	R	R
پروتئین هیدرولیز شده با فلورزایم	R	R

R =رشد سلول های میکروبی مشاهده شد (هیچ منطقه مهاری وجود نداشت)، S= منطقه مهار مشاهده شد.

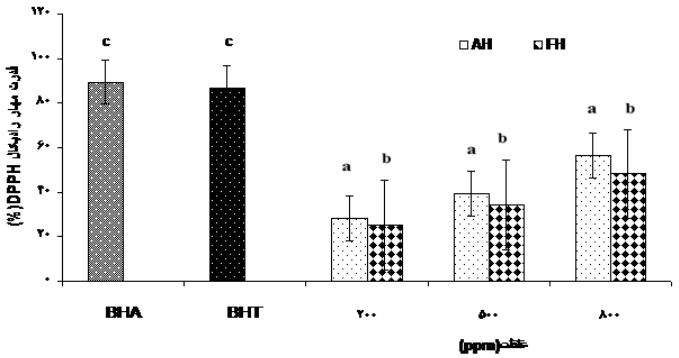
قدرت مهار رادیکال آزادDPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده

در شکل ۱ پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و ۸۰۰ ppm قدرت مهار رادیکال DPPH (۲۸/۱±۰/۱۳، ۳۹/۴±۰/۲۹، ۵۶/۳۸±۰/۲۵) بیشتری نسبت پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم (۲۵/۲۶±۰/۱۵، ۳۴/۲۲±۰/۰۶، ۴۸/۲۴±۰/۰۵) داشت ($p<0/05$). آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT با غلظت ۲۰۰ppm دارای قدرت مهار رادیکال DPPH بترتیب ۸۹/۴۴±۰/۷۱ و ۸۶/۰۷±۰/۰۶ بودند ($p>0/05$).

قدرت احیاءکنندگی یون آهن توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده

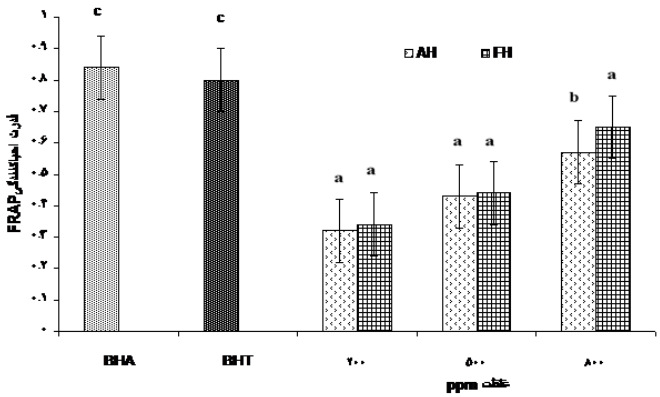
مطابق شکل ۲ پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم در سه غلظت ۲۰۰، ۵۰۰ و۸۰۰ ppm قدرت احیاءکنندگی بیشتری (۰/۳۴±۰/۰۱، ۰/۴۴±۰/۰۱، ۰/۶۵±۰/۰۲) از

پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز (۰/۰۱±۰/۳۲، ۰/۰۱±۰/۴۳، ۰/۰۴±۰/۵۷) داشت و از نظر آماری اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>0/05$). همانطوریکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود، قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم با افزایش غلظت بیشتر گردید ($p<0/05$). BHA و BHT با غلظت ۲۰۰ppm دارای قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی بترتیب ۰/۰۲±۰/۸۴ و ۰/۰۳±۰/۸ بودند ($p>0/05$).



شکل ۱: فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزادDPPH پوست هیدرولیز شده ماهی قزل آلای رنگین کمان. داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد($p<0/05$). (AH : پروتئین هیدرولیز شده آلکالاز FH : پروتین هیدرولیز شده فلاورزایم)

Figure 1: Free radical inhibitory DPPH activity of rainbow trout, hydrolyzed. Data showed a significant difference between mean ± standard deviation and different letters ($p < 0.05$). (AH: Hydrolyzed Protein of Alkaline FH: Hydrolyzed Protein of Fluoramide)



شکل ۲: درصد مهار کنندگی رادیکال آزادFRAP پوست هیدرولیز شده ماهی قزل آلای رنگین کمان. داده ها بصورت میانگین ± انحراف معیار و حروف مختلف نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار می باشد($p<0/05$). (AH : پروتئین هیدرولیز شده آلکالاز FH : پروتین هیدرولیز شده فلاورزایم)

Figure 2: Free radical inhibitory FRAP concentration of rainbow trout hydrolized. Data showed a significant difference between mean ± standard deviation and different letters ($p < 0.05$). (AH: Hydrolyzed Protein of Alkaline FH: Hydrolyzed Protein of Fluoramide).

بحث

پروتئین‌های محلول ماهی، منابع غنی از پپتید های زیست فعال با پتانسیل های ارزشمند مواد غذایی و دارویی می‌باشند. پپتیدهای زیست فعال که به صورت غیرفعال در پروتئین اولیه وجود دارند، تحت تاثیر هیدرولیز آنزیمی فعال می‌شوند (Elavarasan *et al*., 2014). مطالعات مختلفی در خصوص خواص عملکردی پروتئین هیدرولیز شده آبزیان توسط آنزیم‌های مختلف انجام گرفته است. در این تحقیق مهار رشد باکتری های *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus* توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده کمتر از ۳ کیلودالتون، پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان مشاهده نشدکه احتمالاً به دلیل مقاوم بودن در شرایط سخت محیطی و دارا بودن ژن‌های قوی و مقاومت در برابر آنتی بیوتیک‌ها باشد. اعتقاد بر این است که شیوه عمل این پروتئین‌ها بواسطه تشکیل منافذ غشائی و به دنبال آن نفوذ در غشاء است که منجر به تخریب سلول می شود (Amissah, 2012). در مطالعه فعالیت ضد باکتریایی Rajendran (۲۰۱۲) پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم کموتریپسین، تریپسین و پپسین از پوست سگ ماهی دریایی قادر به مهار رشد باکتری های اشرشیاکلی سویه *DH5α*، *Lactococcus lactis* و *Bacillus subtilis* نبودند. این عدم فعالیت آنتی باکتریایی می‌تواند به علت عدم حساسیت باکتری‌ها به پروتئین هیدرولیز شده، فقدان پپتیدهایی با فعالیت ضد میکروبی و نیز ممکن است به علت ارائه نامناسب هیدرولیزات برای واکنش با باکتری‌ها باشد (Rajendran, 2012). ولی Sila و همکاران (۲۰۱۴) گزارش داد که پپتیدهای هیدرولیز شده از پروتئین عضله *Barbus callensis* دارای فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌های گرم مثبت (*Staphylococcus aureus*، *listeria monocytogenes*، *Micrococcus luteus, Enterococcus faecali* و *Bacillus subtilis*) و گرم منفی (*Pseudomonas aeruginosa*، *Escherichia coli* ، *Klebsiella pneumoniae* ، *Salmonella enterica* و *Enterobacter sp*) بودند. عواملی مانند آبگریزی، pH، قدرت یونی، درجه حرارت، سورفکتانت ها، منشاء پپتید، ترکیبات اسید آمینه، بار پپتید، اندازه و ساختار ثانویه پپتید می‌توانند فعالیت ضد میکروبی را تحت تاثیر قرار دهند (Ramos-Villarroel, 2010; Shahidi & Zhong, 2008).

درجه هیدرولیز به معنای درصدی از پیوندهای پپتدی است که توسط آنزیم تجاری طی فرایند هیدرولیز شکسته می شوند . در تحقیق حاضر درجه هیدرولیز، پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بیشتر از پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز می باشد. این امر را می‌توان با توجه به قدرت آنزیم‌های تحت شرایط این آزمایش توجیه کرد. بدین معنی که آنزیم فلاورزایم تحت شرایط این آزمایش قویتر از آنزیم آلکالاز عمل کرد و توانست طی ۹۰ دقیقه، درصد بیشتری از پیوندهای پپتیدی مولکول پروتئین را تجزیه کند. علاوه بر این، فلاورزایم یک آنزیم اندو و اگزو پپتیداز است.

یکی از شاخص‌های مهم جهت سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین‌ها، قدرت آنها برای مهار DPPH است. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار و محلول در اتانول است که بیشترین جذب را در طول موج ۵۱۷ نانومتر دارد. این رادیکال با مواد الکترون دهنده مانند آنتی‌اکسیدان‌ها مهار می‌شود و جذبش کاهش می‌یابد (ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۶). درصد مهار رادیکال‌های آزاد DPPH برایBHA و BHT بترتیب ۸۹/۴۴ و ۸۶/۷۰ محاسبه گردید که در مقایسه با بالاترین فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز که ۵۶/۳۸ درصد بود، اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p<۰/۰۵$) و فعالیت مهار رادیکال آزاد با افزایش غلظت، افزایش یافت. بنابراین، پروتئین‌های محلول پوست ماهی قزل آلا دارای قابلیت خنثی سازی 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. Dong و همکاران (۲۰۰۸) در مطالعات پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور نقره‌ای با آلکالاز در مدت ۱/۵ ساعت (زمان هیدرولیز) نشان داد که فرکشن‌های کمتر از ۱۰۰۰ دالتون بیش از ۶۰ درصد است. همچنین طبق این بررسی، فعالیت آنتی اکسیدانی

پروتئین هیدرولیز شده کپور نقره‌ای با درجه هیدرولیز، زمان هیدرولیز و وزن مولکولی ارتباط دارد (Dong *et al*., 2008). رمضان زاده و همکاران (۱۳۹۵) بیان کردند بالاترین میزان مهار رادیکال های آزادDPPH و ارزیابی قدرت کاهندگی پروتئین هیدرولیز شده ماهی قزل آلا (با آنزیم آلکالاز) در غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر بترتیب ۳۹/۸٪ و۰/۱۲۳ بوده است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به چندین عامل از جمله نوع آنزیم، درجه هیدرولیز، حلالیت پروتئین ها، طبقه پپتیدها و حضور اسید آمینه های آزاد بستگی دارد (Galla *et al*., 2012). یکی دیگر از شاخص‌های آنتی اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده که در این مطالعه مورد بررسی قرار گرفت، قدرت احیاء آهن است. بالاترین فعالیت احیاءکنندگی یون آهن توسط پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم در غلظت ppm ۸۰۰ به میزان ۰/۶۵ درصد بدست آمد که در مقایسه با سایر غلظت‌های هیدرولیز اختلاف معنی‌داری از خود نشان داد ($p<0/05$). نتایج فعالیت احیاءکنندگی یون آهن همانند فعالیت مهار رادیکال‌های آزاد DPPH به صورت صعودی بوده است (شکل‌های ۱ و۲). جهت مقایسه قدرت احیاءکنندگی پروتئین هیدرولیز شده، از BHA و BHT با غلظت ppm۲۰۰ به عنوان یک عامل احیاءکننده استفاده شد که جذب نمونه مربوط به آن در طول موج ۷۰۰ نانومتر ۰/۸۴ و۰/۸۰ بدست آمد. بین میانگین جذب نمونه با غلظت‌های مختلف و جذب نمونه با تیمار BHA و BHT تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p<0/05$). مشابه با نتایج این تحقیق، در مطالعه Klompong و همکاران (۲۰۰۸) در بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم بیان کردند که هر دو پروتئین هیدرولیز شده فعالیت احیاءکنندگی را نشان دادند و پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاورزایم فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری را نسبت به پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز نشان داد و نیز فعالیت‌های آنتی اکسیدانی با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزات افزایش می‌یابد. 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. Slizyte و همکاران (۲۰۱۶) گزارش دادند که برای بدست آوردن فعالیت‌های بیولوژیک بالا، ارتباطی بین فعالیت بیولوژیک، زمان هیدرولیز ، درجه هیدرولیز و وزن مولکولی وجود دارد. در مطالعه Elavarasan و همکاران (۲۰۱۴) نیز فعالیت کاهندگی پروتئین حاصل از آنزیم فلاورزایم بیشتر از آنزیم آلکالاز بوده است .

نتایج نشان داد که پروتئین‌های هیدرولیز شده آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم فعالیت آنتی اکسیدانی پایین‌تری نسبت به آنتی اکسیدان‌های سنتزی BHA و BHT داشت. باید توجه داشت که آنتی اکسیدان‌های طبیعی به دلیل قدرت پایین‌تر همیشه در مقادیر بالاتری نسبت به آنتی اکسیدان‌های سنتزی استفاده می شوند. بنابراین، پروتئین‌های هیدرولیز شده با آلکالاز و فلاورزایم در غلظت‌های مناسب قادر به رقابت با آنتی اکسیدان‌های سنتزی می‌باشند.

منابع

خفایی زاده، ک.، سخایی، ن.، دوست شناس، ب.، غانمی، ک. و ذوالقرنین، ح.، ۱۳۹۵. ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی پپتید های تخلیص شده از هیدورلیز روتیفر *Brachionus plicatilis*. مجله علمی شیلات ایران, ۲۵(۲), صفحات ۷۸-۶۹. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110240

دیبا، گ. ، جمیلی، ش.، و رمضانی، ا.، ۱۳۹۵. بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی خیار دریایی *Holothuria parva*در دو حالت خشک (آبدهی شده) و تازه. مجله علمی شیلات ایران، ۲۵(۴) صفحات ۸۷-۷۷. DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110300

رمضان زاده، ل.، حسینی، س.ف. و نیکخواه. م.، ۱۳۹۵. هیدرولیز آنزیمی ژلاتین پوست ماهی قزل آلای رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) و ارزیابی خاصیت ضداکسیدانی آن. مجله علوم و فنون شیلات. دورهٔ ۵ ،شمارهٔ ۲ ،صفحات ۴۴-۲۹.

ریحانی پول، س. و جعفرپور، س.ع.، ۱۳۹۶. اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و صنایع غذایی ایران. جلد ۱۴ (۶۸) صفحات ۱۲۴-۱۱۳.

Amissah, J., 2012. Bioactive Properties of Salmon Skin Protein Hydrolysates (Doctoral dissertation, McGill University Libraries).

AOAC. 2002. Official Methods of Analysis Chemists (14th Ed.). Association of Official Analytical Chemists. Washington, DC.

Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4): 3020-3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100

Devin, D.A. and Hancock, R.E.W., 2002. Cationic peptides: distribution and mechanism of resistance. *Current Pharmaceutical Design*, 8(9): 703-714. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.11.013

Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H., 2008. Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from Silver carp *(Hypophthalmichthys molitrix)*. *Food Chemistry*, 107(4), pp.1485-1493. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.10.011

Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B.A., 2014. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3): 1207-1214. DOI: 10.1111/jfpp.12081

Galla, N.R., Pamidighantam, P.R., Akula, S. and Karakala, B., 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of Channa striatus and Labeo rohita. *Food Chemistry*, 135(3):1479-1484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.098

Gómez-Guillén, M.C., Giménez, B., López-Caballero, M.A. and Montero, M.P., 2011. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. *Food Hydrocolloids*, 25(8):1813-1827. Doi:

Gómez-Ruiz, J.Á., López-Expósito, I., Pihlanto, A., Ramos, M. and Recio, I., 2008. Antioxidant activity of ovine casein hydrolysates: identification of active peptides by HPLC–MS/MS. European *Food Research and Technology*, 227(4): 1061-1067.

Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19: 489-498. DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00203-5

Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R.B.S.B., Mehiri, M., Hajji, M. and Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by Bacillus subtilis

A26. *Process Biochemistry*, 49(6): 963-972. DOI: 10.1016/j. procbio.2014.03.004

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., Hayes, K.D. and Shahidi, F., 2008. Comparative study on antioxidative activity of yellow stripe trevally protein hydrolysate produced from Alcalase and Flavourzyme. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(6): 1019-1026. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2007.01555.x

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193(1): 265-275.

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

Ojagh, S.M., Rezaei, M., Razavi, S.H. and Hosseini, S.M.H., 2012. Investigation of antibacterial activity cinnamon bark essential oil (*Cinnamomum zeylanicum*) in vitro antibacterial activity against five food spoilage bacteria. *Iranian Journal Of Food Science And Technology***.** 9 (35): 67-76.

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. DOI: 10.1002/jsfa.5957

Raghavan, S. and Kristinsson, H.G., 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(4): 1434-1441.

Raghavan, S. and Kristinsson, H.G., 2009. ACE-inhibitory activity of tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 117(4): 582-588. DOI:10.1016/j.foodchem.2009.04.058

Rajanbabu, V. and Chen, J.Y., 2011. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. Peptides, 32(2): 415-420. DOI:10.1016/j.peptides.2010.11.005

Rajendran, S., 2012. Biologically active protein hydrolysates from dog fish (*Squalus acanthias*) skin. (Doctoral dissertation, McGill University).

Ramos-Villarroel, A.Y., Soliva-Fortuny, R. and Martın-Belloso, O., 2011. Natural antimicrobials for food processing. *Animal Science Reviews* , 2010, 211P.

Rustad, T., Storrø, I. and Slizyte, R., 2011. Possibilities for the utilisation of marine by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(10): 2001-2014. DOI: 10.1111/j. 1365-2621.2011.02736.x

Shahidi, F. and Zhong, Y., 2008. Bioactive peptides. *Journal of AOAC International*, 91(4): 914-931. DOI:

Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M.,

Dhulster, P. and Bougatef, A., 2014. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 55(1): 183-188. DOI: 10.1016/j. lwt.2013.07.021

Slizyte, R., Rommi, K., Mozuraityte, R., Eck, P., Five, K. and Rustad, T., 2016. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotechnology Reports*, 11:99-109. DOI: 10.1016/j.btre.2016.08.003

Tabarestani, H. S., Maghsoudlou, Y., Motamedzadegan, A., and Mahoonak, A. S. 2010. Optimization of physico-chemical properties of gelatin extracted from fish skin of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss). Bioresource Technology*, 101 (15): 6207-6214. DOI: 10.1016/j.biortech.2010.02.071

Tohidpour, A., Sattari, M., Omidbaigi, R., Yadegar, A. and Nazemi, J., 2010. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA). *Phytomedicine*, 17(2):142-145. DOI: 10.1016/j.phymed.2009.05.007

Yen, G.C. and Wu, J.Y., 1999. Antioxidant and radical scavenging properties of extracts from Ganoderma tsugae. *Food Chemistry*, 65(3): 375-379. DOI: 10.1016/S0308-8146(98)00239-8

Zhang, Y.A., Zou, J., Chang, C.I. and Secombes, C.J., 2004. Discovery and characterization of two types of liver-expressed antimicrobial peptide 2 (LEAP-2) genes in rainbow trout. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 101(3-4):.259-269. DOI:10.1016/j.vetimm.2004.05.005

Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin protein hydrolysate

Yaghoubzadeh Z.[1]; Kaboosi H.[1*]; Peyravii Ghadikolaii F.[2]; Safari R.[3]; Fattahi E.[4]

[*]h.kaboosi@iauamol.ac.ir

1- Department of Microbiology, Ayatollah Amoli branch, Islamic Azad University, Amol, Iran
2- Department of Biology, Ghaemshahr branch, Islamic Azad University, Ghaemshahr, Iran
3- Caspian Sea Ecology Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran
4- Department of Biology, Ayatollah Amoli branch, Islamic Azad University, Amol, Iran

Abstract

The present study aimed to investigate antibacterial and antioxidant properties of proteins produced by the enzyme hydrolysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin produced by alcalase and flavourzyme enzymes. Antibacterial activity of skin protein hydrolysate were done by disc diffusion, agar pit diffusion and microdilution methods. Antioxidant activity of skin protein hydrolysate were investigated by DPPH free radical inhibitory and ferric reducing antioxidant power (FRAP) at three concentrations of 200, 500 and 800 ppm. The results showed that skin protein hydrolysate by alcalase and flavourzyme were not able to inhibit growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* strains (standard strains) but they had antioxidant activity. Degree of hydrolysis in SPH produced by flavourzyme was more than the alcalase (43.83 ± 1.75). The radical DPPH inhibitory power of SPH produced by alcalase was significantly higher than the flavourzyme ($p<0.05$). However, FRAP results in SPH produced by flavourzyme was significantly higher than the alcalase ($p<0.05$). By increasing protein concentrations, the antioxidant properties of the SPH increased. In the event that, the synthetic anti-oxidants BHA and BHT had radical DPPH inhibitory power and ferric reducing power higher than alcalase and flavourzyme hydrolyzed proteins.The results showed that the hydrolyzed proteins less than 3 kD of Rainbow trout skin could not inhibit the growth of bacteria but they can be offered as a natural antioxidant in the preparation of foods and health products.

Keywords: Enzymatic Hydrolysis, Rainbow Trout, Antibacterial Properties, Antioxidant Properties

[*]Corresponding author