



Enzymatic Production of Protein Hydrolysate with DPP-IV Inhibitory and Antioxidant Activity from Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) Head

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

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

How to cite this article

Esmaeili Kharyeki M, Rezaei M, Khodabandeh S, Motamedzadegan A. Enzymatic Production of Protein Hydrolysate with DPP-IV Inhibitory and Antioxidant Activity from Skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) Head. Modares Journal of Biotechnology. 2020;11(2):177-184.

ABSTRACT

Aims Improving the antioxidant system in patients with diabetes can prevent the occurrence of secondary diseases caused by oxidative stress. The aim of this study was to investigate the antidiabetic and antioxidant activities of skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) head protein hydrolysate.

Materials & Methods In the present experimental research, the skipjack tuna head was hydrolyzed by alcalase enzyme (1.5% of raw material weight) for 4 hours. The DPP-IV inhibition activity, 1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and reducing power of hydrolysate were measured in different concentrations and their IC₅₀ values were reported. The evaluations were performed in 3 replications. The data were analyzed by SPSS 22, using one-way ANOVA and Duncan's new multiple range test.

Findings The skipjack tuna head protein hydrolysate had bioactive properties in a concentration-dependent manner and increasing the protein concentration leads to a significant increase in bioactive properties of hydrolyzed product. The IC₅₀ of protein hydrolysate in DPP-IV inhibition and DPPH radical scavenging activities were obtained 1.016±0.02mg/ml and 0.297±0.015mg/ml, respectively. Also, the reducing power of hydrolysate was 0.176±0.002 in 2.5mg/ml protein concentration. Changes in the concentration of protein hydrolysate had a significant effect on iron reducing power, so that with increasing protein concentration, the absorption at 700nm wavelength significantly increased.

Conclusion The protein hydrolysate of skipjack tuna head has high antioxidant and antidiabetic activities in vitro.

Keywords Enzymatic Hydrolysis; Tuna Head; Alcalase; Antioxidant Activity; Antidiabetic Activity

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

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

³Food Sciences & Technology Department, Agricultural Engineering Faculty, Sari Agricultural Sciences & Natural Resources University, Sari, Iran

*Correspondence

Address: Natural Resources & Marine Sciences Faculty, Imam Reza Boulevard, Imam Khomeini Street, Nur, Mazandaran, Iran. Postal code: 46414356

Phone: +98 (11) 44559145

Fax: +98 (11) 44553499

rezai_ma@modares.ac.ir

Article History

Received: September 9, 2016

Accepted: August 9, 2017

ePublished: June 10, 2020

CITATION LINKS

[1] Dipeptidyl peptidase IV inhibitory ... [2] Managing diabetes in Asia: Overcoming ... [3] Identification of novel dipeptidyl ... [4] Fish skin gelatin hydrolysates ... [5] Purification, identification and ... [6] Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory ... [7] Purification and identification ... [8] Quinoa ... [9] Antioxidant properties of Salmon ... [10] Marine proteins and peptides ... [11] A novel anticoagulant ... [12] Bioactive ... [13] Antioxidant and antihypertensive ... [14] Angiotensin I-converting enzyme ... [15] Applications of antimicrobial ... [16] Antioxidant properties of peptide ... [17] Purification, characterization ... [18] Purification and determination ... [19] Structure activity relationship ... [20] Antioxidant activity of Cod ... [21] Purification and characterization ... [22] Functional properties and ... [23] Effect of enzymatic hydrolysis time ... [24] Physiological properties of tuna ... [25] Antioxidant and anti-inflammatory ... [26] Evaluation of the biomethane potential ... [27] Functions, applications and ... [28] Antioxidant activity of Bigeye ... [29] Fish protein hydrolysates ... [30] Screening and identification of ... [31] Antioxidative properties of xanthan ... [32] Studies on products of browning ... [33] In vitro inhibition of dipeptidyl ... [34] Dipeptidyl peptidase IV-inhibitory ... [35] Dipeptidyl peptidase IV and adenosine ... [36] Characterization, antioxidative and ... [37] Structural characterization of an ... [38] Purification and identification of three novel ... [39] Purification and characterization ... [40] Evaluation of the in vitro antioxidant ... [41] Purification and characterization ... [42] In vitro and in vivo studies on ... [43] Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from ... [44] Simultaneous recovery of lipids and ... [45] Purification and antioxidant properties ... [46] In vitro antioxidant activity of a ... [47] Antioxidant and free radical-scavenging ... [48] Purification and identification of novel antioxidant ... [49] Antioxidant activities and functional ...

تولید آنزیمی پروتئین هیدرولیزشده با عملکرد بازدارندگی DPP-IV و فعالیت ضداکسایشی از سر ماهی هورر مسقطی (*Katsuwonus pelamis*)

مینا اسمعیلی‌خاریکی PhD

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

مسعود رضایی* PhD

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

صابر خدابنده PhD

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

علی معتمدزادگان PhD

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

چکیده

اهداف: تقویت سیستم آنتی‌اکسیدانی بدن بیماران دیابتی می‌تواند از بروز بیماری‌های ثانویه ناشی از استرس‌های اکسیداتیو جلوگیری نماید. هدف پژوهش حاضر بررسی فعالیت ضددیابتی و ضداکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی بود.

مواد و روش‌ها: در پژوهش تجربی حاضر، سر ماهیان هورر مسقطی با استفاده از آنزیم آلکالاز (۱/۵٪ وزن ماده اولیه) به مدت ۴ ساعت هیدرولیز شد. میزان فعالیت بازدارندگی DPP-IV، قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH و توانایی کاهندگی محصول تولیدشده در غلظت‌های مختلف، ارزیابی و مقدار IC₅₀ آنها گزارش شد. ارزیابی‌ها در سه تکرار صورت گرفتند. داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 از طریق آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه و آزمون دانکن تحلیل شدند.

یافته‌ها: پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی عملکرد زیست‌فعال وابسته به غلظت داشت و افزایش غلظت پروتئین منجر به افزایش معنی‌دار در توانایی زیست‌فعال محصول تولیدشده شد. مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیزشده در مهار DPP-IV و حذف DPPH به ترتیب ۰/۰۲±۰/۱۶ و ۰/۱۵±۰/۲۹۷ میلی‌گرم/میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین فعالیت کاهندگی در غلظت پروتئین ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر، ۰/۰۲±۰/۱۷۶ بود. تغییر غلظت پروتئین هیدرولیزشده اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت کاهندگی یون آهن داشت، به گونه‌ای که با افزایش میزان غلظت پروتئین، میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر به طور معنی‌داری افزایش یافت.

نتیجه‌گیری: پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هورر مسقطی فعالیت ضداکسیدانی و ضددیابتی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی دارد.

کلیدواژه‌ها: هیدرولیز آنزیمی، سر ماهی تون، آلکالاز، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضددیابتی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۰۶/۱۹

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۰۵/۱۸

*نویسنده مسئول: rezai_ma@modares.ac.ir

مقدمه

شیوع بیماری دیابت در سراسر جهان براساس گزارش‌های متعدد، رو به افزایش است [1-3]. تعداد بیماران دیابتی در سال ۲۰۰۰ حدود

۱۷۱ میلیون نفر برآورد شده است و برای سال ۲۰۳۰، این تعداد حدود ۳۶۶ میلیون نفر تخمین زده می‌شود [4]. حدود ۹۵-۹۰٪ این تعداد را بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲ شامل می‌شوند [5]. روش‌های مختلفی برای کنترل این بیماری و کمک به بیماران دیابتی به کار برده می‌شوند که یکی از این روش‌ها بازداشتن و مهار دی‌پپتیدیل‌پپتیداز تیپ ۴ (DPP-IV) است [1]. (EC: 3.4.1.4.5) یک سرین‌پروتئاز است که در مایعات بدن و بافت‌های مختلف همانند کبد، کلیه و روده کوچک حضور داشته و می‌تواند یک دی‌پپتید را از انتهای آمینی پروتئین‌ها و پلی‌پپتیدها جدا کند [6]. این آنزیم معمولاً به ترتیب اسیدآمینه‌های پرولین، آلانین و سرین را در جایگاه ماقبل آخر انتهای آمینی پلی‌پپتیدها مورد هدف قرار می‌دهد. یکی از سوبستراهای طبیعی برای عملکرد این آنزیم، پپتید شبه گلوکاگون نوع یک (GLP-1) است [4]. GLP-1 یکی از هورمون‌های تنظیم‌کننده قند خون است که عملکرد چندگانه‌ای همانند تشدید تکثیر و افزایش بقای سلول‌های بتای لانگرهانس، تحریک سنتز و ترشح انسولین، مهار ترشح گلوکاگون، کندکردن روند تخلیه دستگاه گوارش و کاهش اشتها دارد [4].

تحقیقات نشان داده که GLP-1 نیمه‌عمر کوتاهی داشته است و حدود ۹۵٪ آن تنها ۱-۲ دقیقه پس از ترشح در پاسخ به مصرف مواد غذایی، توسط DPP-IV غیرفعال می‌شود. این یافته‌ها منجر به تلاش برای پیداکردن ترکیباتی برای مهار این آنزیم به منظور کنترل بیماری دیابت نوع ۲ شده است. در سال‌های اخیر بازدارنده‌های صنعتی متعددی که عموماً گلیپتین شناخته می‌شوند، همانند ویلداگلیپتین، ساکساگلیپتین، لیناگلیپتین، سیتاگلیپتین و آلوگلیپتین به عنوان داروهای ضددیابت نوع ۲ مصرف می‌شوند [7، 4]. مصرف اغلب این داروها علی‌رغم عملکرد خوب منجر به بروز عوارض جانبی همانند سردرد، عفونت ادراری و عفونت دستگاه تنفسی فوقانی می‌شود [8، 4]. بنابراین جست‌وجو و مطالعه برای یافتن بازدارنده‌های DPP-IV طبیعی و بدون عوارض جانبی ضروری به نظر می‌رسد. علاوه بر این در افراد مبتلا به بیماری دیابت نوع ۲ سیستم‌های حفاظتی آنتی‌اکسیدانی درون‌زا همانند سوپراکسیددیسموتاز، گلوکاتیون پراکسیداز و کاتالاز ممکن است در نتیجه افزایش استرس‌های اکسیداتیو تضعیف شوند [1]. فرآیندهای اکسیداتیو در بدن با بیماری‌های متعددی مرتبط هستند. واکنش‌های وابسته به اکسیژن و تنفس‌های هوازی با توجه به نقش فیزیولوژیک که طی متابولیسم دارند مطلوب هستند، اما افزایش این واکنش‌ها در بدن می‌تواند منجر به تولید بیش از حد شکل‌های فعال اکسیژن و رادیکال‌های آزاد شود. مقادیر بالای این ترکیبات موجب تخریب DNA، غشاهای سلولی، پروتئین‌ها، آنزیم‌ها و سایر ترکیبات سلولی و در نهایت ایجاد بیماری‌های مزمن متعدد می‌شود [9]. به همین دلیل در بسیاری از بیماران مبتلا به دیابت نوع ۲، بیماری‌های قلبی-عروقی و کلیوی می‌توانند به عنوان عوارض ثانویه این بیماری بروز کنند [1].

ظروف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی (Memmert؛ آلمان) ۹۰°C قرار گرفتند. پس از خنک شدن، ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نمونه‌ها اضافه و با استفاده از همزن مغناطیسی RHD (IKA؛ آلمان) به‌طور کامل مخلوط شدند. سپس pH مخلوط با استفاده از pH متر ۳۵۱۰ (Jenway؛ انگلستان) و به‌وسیله سود یک‌نرمال به ۷/۵ رسانده شد. ظروف شیشه‌ای حاوی نمونه در یک دستگاه انکوباتور متحرک (Comecta؛ اسپانیا) با سرعت حرکت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار گرفتند. زمانی که دمای نمونه‌ها به دمای بهینه فعالیت آنزیم (۵۰°C) رسید، فرآیند هیدرولیز آنزیمی با افزودن آنزیم آلکالاز به نسبت ۱/۵٪ (بر مبنای وزن ماده اولیه) آغاز شد. پس از گذشت ۴ ساعت به‌منظور قطع واکنش آنزیمی، ظروف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی ۹۰°C حرارت داده شدند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، به مدت ۳۰ دقیقه و با ۶۰۰ دور در دقیقه، با دستگاه (Hettich) Universal R 320؛ آلمان) سانتریفیوژ و سپس فاز محلول، جداسازی و تا زمان انجام آزمایش‌های بعدی در فریزر ۲۰°C نگهداری شدند.

سنجش فعالیت بازدارندگی DPP-IV: فعالیت بازدارندگی DPP-IV در میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای و با استفاده از گلی-پروپی-نیتروآنیلید (Gly-Pro-p-nitroanilide) به‌عنوان سوبسترا به روش جین و همکاران^[30] با تغییرات اندک انجام شد. غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیزشده (صفر تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار (pH برابر با ۸) آماده شدند. سپس ۲۵ میکرولیتر از نمونه و ۲۵ میکرولیتر سوبسترای ۱/۶ میلی‌مولار (در بافر تریس ۱۰۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۸) به میکروپلیت افزوده شدند. مخلوط به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C، انکوبه و سپس ۵۰ میکرولیتر DPP-IV (۰/۲۵ میلی‌واحد بر میلی‌لیتر) به هر خانه از میکروپلیت، افزوده و مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۳۷°C قرار گرفت. در نهایت واکنش با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر بافر استات سدیم (یک‌مولار و pH برابر با ۴) متوقف شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۳۸۵ نانومتر و با استفاده از دستگاه خوانش جذب Fluostar Omega (BMG LABTECH؛ فرانسه) قرائت شد و برای محاسبه درصد بازدارندگی DPP-IV از فرمول زیر استفاده شد. پپتید ایزولوسین-پرولین-ایزولوسین (IPI) که بازدارنده DPP-IV است و به‌نام دیپروتین A نیز شناخته می‌شود، به‌منظور مقایسه به روش مشابه مورد بررسی قرار گرفت. غلظتی از نمونه هیدرولیزشده که توانایی بازداشتن ۵۰٪ فعالیت DPP-IV را داشت، به‌عنوان IC₅₀ گزارش شد.

$$DPP-IV \text{ درصد بازدارندگی} = \frac{(\text{نمونه} - \text{شاهد}) - (\text{کنترل} - \text{شاهد})}{\text{کنترل} - \text{شاهد}} \times 100$$

برای تهیه کنترل، نمونه با بافر واکنش و برای تهیه شاهد، نمونه و آنزیم با بافر واکنش جایگزین شدند.

ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی به روش‌های مختلف ارزیابی شد.

مطالعات متعدد تا به امروز گزارش کرده‌اند که پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیزشده حاصل از منابع مختلف پروتئینی همانند شیر، دانه سویا، گندم و تخم‌مرغ عملکردهای زیست‌فعال متفاوتی نشان می‌دهند^[5].

پروتئین هیدرولیزشده مخلوطی از فرکشن‌های مختلف پپتیدی با محدوده متنوعی از وزن‌های مولکولی است^[10]. عملکرد ضد میکروبی، تقویت سیستم ایمنی، مهارکنندگی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسین I، بازدارندگی رنین، فعالیت ضد انعقادی، خواص ضد سرطان، ضد تومور، ضد دیابت و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و پروتئین‌های هیدرولیزشده در مطالعات متعدد بررسی شده است^[11-19]. همچنین در بسیاری از مطالعات بیان شده است که پروتئین‌های هیدرولیزشده و پپتیدهای حاصل از منابع مختلف دریایی شامل ماهی‌ها، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ضایعات حاصل از فرآوری آبزیان یا محصولات جانبی آنها (امعا و احشا، پوست، استخوان و سر) نیز عملکردهای زیست‌فعال متنوعی نشان داده‌اند^[10, 20-23]. سالانه حدود ۴ میلیون تُن ماهی تون در جهان برداشت می‌شود^[24] و ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) که عمدتاً برای تولید کنسرو استفاده می‌شود، بالاترین میزان صید جهانی تون ماهیان را به خود اختصاص می‌دهد. بنا بر گزارش سازمان خواروبار و کشاورزی سازمان ملل (FAO)، میزان صید این گونه در سال ۲۰۱۴ بیش از ۲/۷ میلیون تُن بوده است که شامل بیش از نیمی از صید تون ماهیان می‌شود. طی فرآیند کنسروسازی ماهیان، حدود ۴۵-۵۰٪ وزن ماده اولیه تبدیل به ضایعات می‌شود که سر ماهی یکی از عمده‌ترین آنها است^[25-27]. سر ماهی تون حاوی حدود ۶۴٪ پروتئین (بر مبنای وزن خشک) است که می‌تواند به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیزشده با خواص زیست‌فعال متنوع مورد استفاده قرار گیرد^[28]. بنابراین هدف پژوهش حاضر بررسی فعالیت ضد دیابتی و ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی بود.

مواد و روش‌ها

در پژوهش تجربی حاضر، سرهای ۵ عدد از ماهی‌های هوور مسقطی مورد استفاده در کارخانه تولید کنسرو ماهی (آذین‌مهر خزر؛ بابل) پس از خروج از فریزر توسط اهر برقی صنعتی، جدا و در حالت منجمد قطعه‌قطعه شد. سپس این نمونه‌ها در جعبه‌های یونولیتی و در حالی که کاملاً با یخ پوشانده شده بودند، به آزمایشگاه فرآوری محصولات شیلادی دانشگاه تربیت مدرس منتقل شدند. سرهای ماهی پس از شست‌وشو با آب سرد در حالت منجمد توسط چرخ گوشت کاملاً چرخ و در بسته‌های پلاستیکی در دمای ۲۰°C- تا زمان استفاده نگهداری شدند.

هیدرولیز آنزیمی: هیدرولیز آنزیمی به روش /ویسی‌پور و همکاران^[29] و با تغییرات اندک انجام شد. مقدار ۵۰ گرم از نمونه‌های چرخ‌شده در ظروف شیشه‌ای درب‌دار ۵۰۰ میلی‌لیتری ریخته شدند. سپس به‌منظور غیرفعال‌سازی آنزیم‌های داخلی،

فعالیت حذف رادیکال آزاد دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH):

فعالیت حذف رادیکال آزاد DPPH به روش شیمادا/ و همکاران [31] با تغییرات اندک سنجش شد. براساس این روش ۵۰۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۱۶/۰ میلی‌مولار در اتانول ۹۶٪) با ۵۰۰ میکرولیتر نمونه پروتئین هیدرولیزشده (۲۵/۰-۵۰/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) مخلوط شد. سپس مخلوط به خوبی ورتکس و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در تاریکی انکوبه شد. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. به منظور مقایسه از اسیدآسکوربیک در غلظت‌های مختلف (۹۰-۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر) استفاده و ظرفیت حذف رادیکال DPPH با فرمول زیر محاسبه شد:

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

قدرت احیای آهن (Fe²⁺ ← Fe³⁺): براساس روش /ویازو [32]

مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه رقیق شده (۲/۵-۲/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با ۲۵۰ میکرولیتر محلول بافر فسفات (۲/۰ میلی‌مولار و pH برابر با ۶/۶) و ۲۵۰ میکرولیتر فری‌سیانیدپتاسیم ۱٪ مخلوط و سپس محلول تهیه شده به مدت ۳۰ دقیقه در تاریکی و در دمای ۵۰°C انکوباسیون شد. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به نمونه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه سانتیفریوژ شد. پس از آن ۲۵۰ میکرولیتر از فاز بالایی با ۲۵۰ میکرولیتر آب مقطر و ۵۰ میکرولیتر کلریدفریک آبدار ۱٪ به خوبی مخلوط و پس از گذشت ۱۰ دقیقه جذب نمونه‌ها در ۷۰۰ نانومتر قرائت شد. قدرت احیاکنندگی اسیدآسکوربیک نیز به منظور مقایسه به روش مشابه مورد ارزیابی قرار گرفت.

داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 از طریق آزمون کولموگروف-اسمیرنوف برای بررسی توزیع نرمال داده‌ها، آزمون تحلیل واریانس یک‌طرفه برای بررسی وجود تفاوت در بازدارندگی DPP-IV پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی و فعالیت غلظت‌های مختلف، فعالیت حذف رادیکال DPPH و فعالیت کاهندگی آهن پروتئین هیدرولیزشده و اسیدآسکوربیک در غلظت‌های مختلف و آزمون دانکن برای مقایسه میانگین‌ها تحلیل شدند. ارزیابی‌ها در سه تکرار صورت گرفتند.

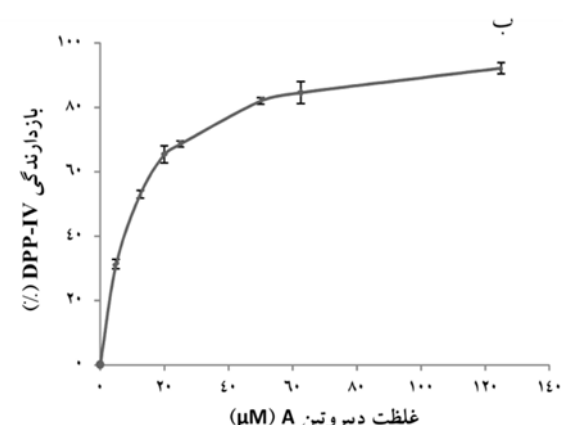
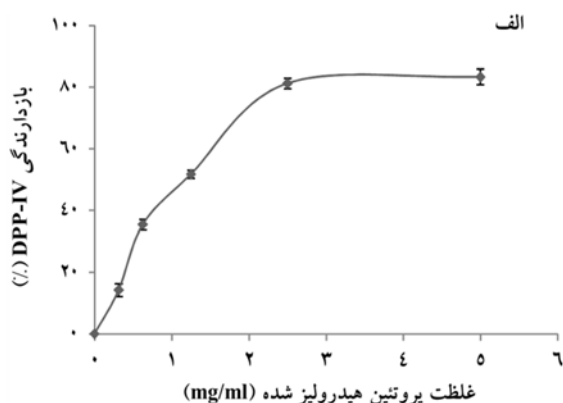
یافته‌ها

بازدارندگی DPP-IV: پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی عملکرد بازدارندگی وابسته به غلظت را نشان داد و با افزایش غلظت، فعالیت بازدارندگی آن به طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵). مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیزشده در مهار DPP-IV، ۱۶±۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد که از مقدار آن در دیپروتین A برابر با ۷۱±۰/۳۴ میکرومولار کمتر بود (نمودار ۱).

فعالیت حذف رادیکال DPPH: مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیزشده در حذف DPPH ۲۹۷±۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد.

با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیزشده توانایی حذف رادیکال آزاد به طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵)، به گونه‌ای که بیشترین میزان بازدارندگی در بالاترین غلظت پروتئین مشاهده شد (۷۸/۶۹±۱/۸۲٪ در غلظت ۱/۲۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر؛ نمودار ۲-الف). روند فعالیت اسیدآسکوربیک نیز مشابه با پروتئین هیدرولیزشده بود و افزایش غلظت منجر به افزایش معنی‌دار در فعالیت حذف رادیکال آزاد شد (p < ۰/۰۵؛ نمودار ۲-ب). مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی (۲۹۷±۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیش از اسیدآسکوربیک بود (۲۹۷±۰/۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر). مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیزشده به طور معنی‌داری بیش از اسیدآسکوربیک بود (p < ۰/۰۵).

فعالیت کاهندگی آهن: فعالیت کاهندگی در غلظت پروتئین ۲/۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۱۷۶±۰/۰۰۲ بود. تغییر غلظت پروتئین هیدرولیزشده اثر معنی‌داری بر میزان فعالیت کاهندگی یون آهن داشت، به گونه‌ای که با افزایش میزان غلظت پروتئین، میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر به طور معنی‌داری افزایش یافت (p < ۰/۰۵؛ نمودار ۳-الف) همچنین میزان فعالیت اسیدآسکوربیک نیز از روند مشابهی تبعیت کرد (نمودار ۳-ب).



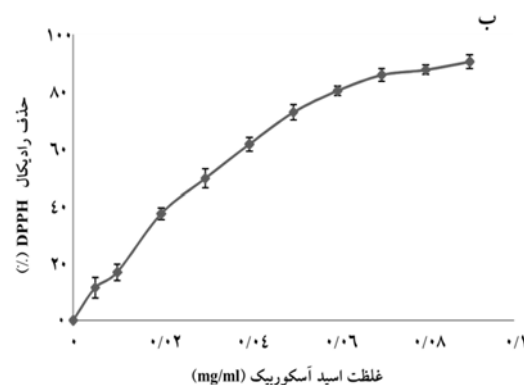
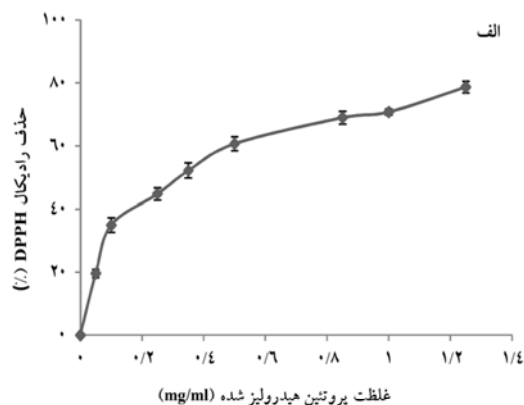
نمودار ۱) فعالیت بازدارندگی DPP-IV پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی و دیپروتین A در غلظت‌های مختلف؛ الف) فعالیت بازدارندگی DPP-IV پروتئین هیدرولیزشده سر ماهی هوور مسقطی؛ ب) فعالیت بازدارندگی DPP-IV دیپروتین A

بحث

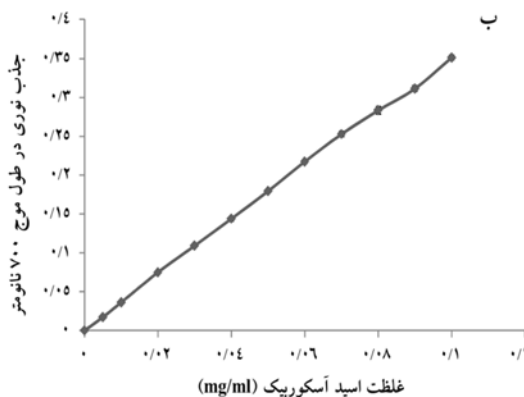
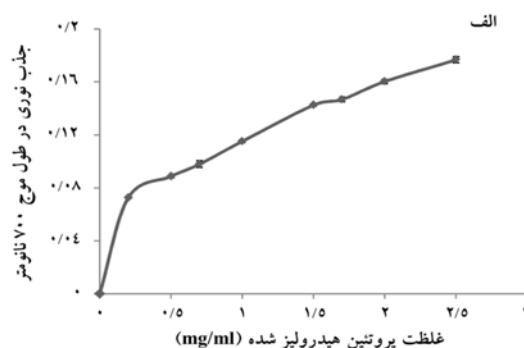
پژوهش حاضر با هدف بررسی فعالیت ضد دیابتی و ضد اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی انجام شد. طبق یافته‌ها با افزایش غلظت، فعالیت بازدارندگی به طور معنی داری افزایش یافت. این روند مشابه با نتایج گزارش شده توسط ولارد-سالسیدو و همکاران^[33] روی پروتئین هیدرولیز شده گل تاج خروس (*Amaranthus hypochondricus*) بوده است. میزان IC_{50} پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی در پژوهش حاضر $1/16 \pm 0/02$ میلی گرم بر میلی لیتر) قابل مقایسه با پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی زردپر ($1/94$ میلی گرم بر میلی لیتر)^[5] و جلبک *پالماریا پالماتا* (*Palmaria palmata*)؛ $1/47 \pm 0/09$ میلی گرم بر میلی لیتر)^[7] بود که نشان دهنده فعالیت بازدارندگی قابل توجه محصول تولید شده است. در پژوهش انجام شده توسط زنگ و همکاران^[34] پروتئین ماهی کپور علف خوار با استفاده از آنزیم نوتراز هیدرولیز شده و مقدار IC_{50} بازدارندگی DPP-IV برای محصول تولید شده $1/12$ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش شده است که تقریباً مشابه با نتایج پژوهش حاضر بود.

اگر چه فعالیت بازدارندگی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی از دیپروتین A کمتر بود، اما در مقایسه با پژوهش‌های دیگر و انواع مختلف پروتئین هیدرولیز شده از عملکرد خوبی برخوردار بود. به عنوان مثال جین و همکاران^[30] و هو/نگ و همکاران^[6] میزان بازدارندگی هیدرولیز پوست گوزن در غلظت 6 میلی گرم بر میلی لیتر را حدود 15% و برای هیدرولیز مایع حاصل از پخت ماهی تون در غلظت 10 میلی گرم پودر جامد در هر میلی لیتر $45/2\%$ گزارش نموده‌اند. همچنین در پژوهش انجام شده روی پروتئین گل تاج خروس مقدار IC_{50} محصول هیدرولیز شده $20-17$ میلی گرم بر میلی لیتر محاسبه شده است^[33] و مردانیان و همکاران^[35] نیز مقدار IC_{50} عصاره گیاه سنجد را $2/5$ میلی گرم بر میلی لیتر گزارش نموده‌اند. تفاوت در میزان فعالیت انواع مختلف پروتئین هیدرولیز شده می‌تواند به دلیل تفاوت در ساختار پپتیدها باشد، به گونه‌ای که هو/نگ و همکاران^[6] بیان نموده‌اند که توانایی مهار DPP-IV در یک پروتئین هیدرولیز شده به وسیله ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها تعیین می‌شود. در مجموع با توجه به نتایج پژوهش حاضر و مقایسه با نتایج گزارش شده در سایر پژوهش‌ها می‌توان بیان نمود که پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی عملکرد خوبی در بازداشتن فعالیت آنزیم DPP-IV داشت و در صورت انجام پژوهش‌های تکمیلی می‌تواند به عنوان افزودنی غذایی به منظور افزایش سطح سلامت در بیماران دیابتی پیشنهاد شود.

رادیکال DPPH یک ترکیب ناپایدار است که با پذیرفتن الکترون یا هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل می‌شود^[20]. بنابراین روش حذف رادیکال DPPH برای مطالعه فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات مختلف به کار می‌رود^[36]. در پژوهش حاضر نیز توانایی



نمودار ۲) فعالیت حذف رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی و اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف: الف) فعالیت حذف رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی؛ ب) فعالیت حذف رادیکال DPPH اسید آسکوربیک



نمودار ۳) فعالیت کاهندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی و اسید آسکوربیک در غلظت‌های مختلف: الف) فعالیت کاهندگی یون آهن پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی؛ ب) فعالیت کاهندگی یون آهن اسید آسکوربیک

بالا تر است [49] که در پژوهش حاضر نیز میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر افزایش داشت و نشان دهنده افزایش توانایی کاهندگی یون آهن بود.

در مطالعه انجام شده توسط فاروین و همکاران [20] نیز نشان داده شده که توانایی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد در کاهیدن یون آهن، وابسته به غلظت بوده و با افزایش غلظت پروتئین میزان جذب در طول موج ۷۰۰ نانومتر افزایش یافته است. لاسوئد و همکاران [36] نیز پروتئین سپرماهی (*Raja clavata*) را با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز نموده و روند افزایش فعالیت کاهندگی با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده را گزارش داده اند. در پژوهش های انجام شده توسط محققان میزان فعالیت کاهندگی یون آهن پروتئین های هیدرولیز شده اسکوئید هندی و ماهی کاد (غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر) به ترتیب 0.08 ± 0.01 و 0.03 گزارش شده است [20, 37]. همچنین در پژوهش انجام شده روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی ساردین فعالیت کاهندگی در غلظت پروتئین ۲۰ میلی گرم بر میلی لیتر بیش از 0.08 گزارش شده است [43]. این تفاوت در نتایج مختلف می تواند به دلیل تفاوت در نوع ماده اولیه، شرایط هیدرولیز آنزیمی، ترکیب و توالی آمینواسیدی و وزن مولکولی پپتیدها باشد. در مجموع می توان بیان نمود که پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی با وجود این که فعالیت کاهندگی یون آهن ضعیف تری نسبت به اسیدآسکوربیک نشان داد، اما در مقایسه با سایر پژوهش ها از عملکرد نسبتاً مناسبی برخوردار بود.

از محدودیت های مطالعه حاضر عدم بررسی فعالیت ضد دیابت و آنتی اکسیدانی در شرایط محیط زنده است. پیشنهاد می شود که فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی در افزایش عمر ماندگاری مواد غذایی حاوی درصد بالای چربی مورد بررسی قرار گیرد و در صورت دستیابی به نتایج مناسب از این فرآورده به عنوان افزودنی غذایی استفاده شود. همچنین در پژوهشی تکمیلی فعالیت ضد دیابت پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی در مدل های حیوانی همانند موش های دیابتیک مورد بررسی قرار گیرد.

نتیجه گیری

پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی، فعالیت ضد اکسیدانی و ضد دیابتی قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی دارد.

تشکر و قدردانی: نویسندگان بر خود لازم می دانند تا از جناب آقای مهندس جمشیدی و کارکنان محترم شرکت آذین مهر خزر به دلیل همکاری برای در اختیار قرار دادن ماده اولیه مورد استفاده در پژوهش حاضر (سر ماهی هوور مسقطی) تشکر و قدردانی کنند.

تأییدیه اخلاقی: مطالعه حاضر توسط همه نویسندگان تأیید شده است. همچنین این مطالعه در نشریه دیگری به زبان فارسی، انگلیسی یا هر

پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی در حذف رادیکال DPPH و اثر تغییر غلظت پروتئین (۰/۵-۱/۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر) بر این توانایی مورد بررسی قرار گرفت. در پژوهش های انجام شده توسط سودکار و همکاران [37] و همچنین چای و همکاران [38] نیز پروتئین های هیدرولیز شده ماهی مرکب و ماهی بادکنکی باله آبی، فعالیت وابسته به غلظت نشان داده و با افزایش غلظت پروتئین، فعالیت حذف رادیکال آزاد افزایش معنی داری داشته است. کای و همکاران [39] نیز بیان نموده اند که با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده کپور علف خوار میزان فعالیت بازدارندگی رادیکال آزاد به طور معنی داری افزایش نشان داده است. با توجه به نمودار ۲ فعالیت بازدارندگی DPPH پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی بیش از مقادیر گزارش شده برای پروتئین های هیدرولیز شده ماهی کاد (۱۹٪ در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر)، اسکوئید هندی (۲۴/۱۸٪ در غلظت ۱/۵ میلی گرم بر میلی لیتر)، عضله ستون فقرات ماهی تون (۳۵/۸۲٪ در غلظت ۱/۳ میلی گرم بر میلی لیتر)، سپرماهی (۳۱٪ در غلظت ۵ میلی گرم بر میلی لیتر) و ماهی کراکر (۵۹/۷٪ در غلظت یک میلی گرم بر میلی لیتر) بود [36, 37, 40-42]. اگر چه مقدار IC₅₀ پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی بیش از اسیدآسکوربیک بود، اما به مقدار قابل توجهی کمتر از پروتئین های هیدرولیز شده ماهی ساردین (۹۱ میلی گرم بر میلی لیتر) [43]، پوست ماهی بادکنکی باله آبی (۵/۲۲ میلی گرم بر میلی لیتر) [38]، امعا و احشای ماهی کاتلا (۳/۴۷ میلی گرم بر میلی لیتر) [44]، باله ماهی سالمون (۱/۶۳ میلی گرم بر میلی لیتر) [45] و ژلاتین فلس تیلپای نیل (۰/۶ میلی گرم بر میلی لیتر) [46] بود. این تفاوت در فعالیت بازدارندگی در پژوهش های مختلف می تواند به دلیل تفاوت در ماده اولیه، شرایط فرآیند هیدرولیز و تفاوت در وزن مولکولی و توالی آمینواسیدی پپتیدها باشد [47]. در مجموع می توان بیان نمود که پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی دارای توانایی بالایی در حذف رادیکال آزاد DPPH بود و احتمالاً حاوی پپتیدها یا آمینواسیدهایی است که به عنوان یک ترکیب الکترون دهنده عمل می کنند یا با رادیکال های آزاد واکنش داده و آنها را به محصولات پایدارتر تبدیل می کنند و در نهایت واکنش های زنجیره ای رادیکال های آزاد را متوقف می نمایند. روش سنجش قدرت کاهندگی نیز اغلب برای ارزیابی توانایی یک ترکیب آنتی اکسیدانی در دادن الکترون یا هیدروژن مورد استفاده قرار می گیرد. در مطالعات متعدد بیان شده که ارتباط مستقیمی بین میزان فعالیت آنتی اکسیدانی و قدرت کاهندگی یک ترکیب زیست فعال وجود داشته است که در آن روش توانایی پروتئین هیدرولیز شده در کاهیدن یون Fe³⁺ به یون Fe²⁺ مورد ارزیابی قرار می گیرد [48] و در صورتی که پروتئین هیدرولیز شده دارای قدرت کاهندگی یون آهن باشد، رنگ سبز در محیط واکنش ایجاد می شود و هر چه رنگ سبز قوی تر باشد و میزان جذب نوری در طول موج ۷۰۰ نانومتر بالاتر باشد، نشان دهنده فعالیت کاهندگی

- 13- Je JY, Lee KH, Lee MH, Ahn CB. Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Res Int*. 2009;42(9):1266-72.
- 14- Gu RZ, Li CY, Liu WY, Yi WX, Cai MY. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity of low-molecular-weight peptides from Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) skin. *Food Res Int*. 2011;44(5):1536-40.
- 15- Rajanbabu V, Chen JY. Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*. 2011;32(2):415-20.
- 16- Zhong S, Ma C, Lin YC, Luo Y. Antioxidant properties of peptide fractions from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance spectrometry. *Food Chem*. 2011;126(4):1636-42.
- 17- Wang M, Nie Y, Peng Y, He F, Yang J, Wu C, et al. Purification, characterization and antitumor activities of a new protein from *Syngnathus acus*, an official marine fish. *Mar Drugs*. 2012;10(1):35-50.
- 18- Ko JY, Lee JH, Samarakoon K, Kim JS, Jeon YJ. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from Flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food Chem Toxicol*. 2013;52:113-20.
- 19- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Structure activity relationship modelling of milk protein-derived peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory activity. *Peptides*. 2016;79:1-7.
- 20- Farvin KHS, Lystabæk Andersen L, Hauch Nielsen H, Jacobsen Ch, Jakobsen G, Johansson I, et al. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chem*. 2014;149:326-34.
- 21- Jiang H, Tong T, Sun J, Xu Y, Zhao Z, Liao D. Purification and characterization of antioxidative peptides from Round Scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysates. *Food Chem*. 2014;154:158-63.
- 22- Alinejad M, Motamedzadegan A, Rezaei M. Functional properties and antioxidant activities of protein hydrolysates from Whitecheek shark (*Carcharhinus dussumieri*) meat. *Food Sci Technol*. 2016;13(50):159-69.
- 23- Shabanpour B, Kordjazi M, Nazari Kh, Esmaeili Khariki M. Effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on antioxidant properties of prawn bioactive peptides. *Food Sci Technol*. 2017;14(62):31-45.
- 24- Choi JI, Kim JH, Lee JW. Physiological properties of tuna cooking drip hydrolysates prepared with gamma irradiation. *Process Biochem*. 2011;46(9):1875-8.
- 25- Ahn CB, Je JY, Cho YS. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Res Int*. 2012;49(1):92-8.
- 26- Eiroa M, Costa JC, Alves MM, Kennes C, Veiga MC. Evaluation of the biomethane potential of solid fish waste. *Waste Management*. 2012;32(7):1347-52.
- 27- He S, Franco C, Zhang W. Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Res Int*. 2013;50(1):289-97.
- 28- Yang P, Ke H, Hong P, Zeng Sh, Cao W. Antioxidant activity of Bigeye Tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *Int J Food Sci*

زیان دیگری چاپ نشده یا به‌طور همزمان برای نشریه دیگری ارسال نشده است.

تعارض منافع: هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهم نویسندگان: مینا اسمعیلی خاریکی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/نگارنده بحث (۳۰٪); مسعود رضایی (نویسنده دوم)، پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۵٪); صابر خداینده (نویسنده سوم)، نگارنده مقدمه/روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵٪); علی معتمدزادگان (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۰٪)

منابع مالی: منابع مالی این پژوهش توسط دانشگاه تربیت مدرس تامین شده است.

منابع

- 1- Nongonierma AB, FitzGerald RJ. Dipeptidyl peptidase IV inhibitory and antioxidative properties of milk protein-derived dipeptides and hydrolysates. *Peptides*. 2013;39:157-63.
- 2- Mu YM, Misra A, Adam JM, Chan SP, Chow FC, Cunanan EC, et al. Managing diabetes in Asia: Overcoming obstacles and the role of DPP-IV inhibitors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2012;95:179-88.
- 3- Lafarga T, O'Connor P, Hayes M. Identification of novel dipeptidyl peptidase-IV and angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides from meat proteins using in silico analysis. *Peptides*. 2014;59:53-62.
- 4- Wang TY, Hsieh CH, Hung CC, Jao CL, Chen MC, Hsu KC. Fish skin gelatin hydrolysates as dipeptidyl peptidase IV inhibitors and glucagon-like peptide 1 stimulators improve glycaemic control in diabetic rats: A comparison between warm- and cold-water fish. *J Funct Foods*. 2015;19(Part A):330-40.
- 5- Sila A, Alvarez OM, Haddar A, Frikha F, Dhulster P, Nedjar-Arroume N, et al. Purification, identification and structural modeling of DPP-IV inhibiting peptides from Barbel protein hydrolysate. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2016;1008:260-9.
- 6- Huang SL, Jao CL, Ho KP, Hsu KC. Dipeptidyl-peptidase IV inhibitory activity of peptides derived from tuna cooking juice hydrolysates. *Peptides*. 2012;35(1):114-21.
- 7- Harnedy PA, O'Keeffe MB, FitzGerald RJ. Purification and identification of dipeptidyl peptidase (DPP) IV inhibitory peptides from the macroalga *Palmaria palmata*. *Food Chem*. 2015;172:400-6.
- 8- Nongonierma AB, Le Maux S, Dubrulle C, Barre C, FitzGerald RJ. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) protein hydrolysates with in vitro dipeptidyl peptidase IV (DPP-IV) inhibitory and antioxidant properties. *J Cereal Sci*. 2015;65:112-8.
- 9- Girgih AT, Udenigwe CC, Hasan FM, Gill TA, Aluko RE. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo Salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Res Int*. 2013;52(1):315-22.
- 10- Kim SK, editor. *Marine proteins and peptides: Biological activities and Applications*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013. pp. 385-435.
- 11- Rajapakse N, Jung WK, Mendis E, Moon SH, Kim SK. A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysates inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Sci*. 2005;76(22):2607-19.
- 12- Shahidi F, Zhong Y. *Bioactive Peptides*. *J AOAC Int*. 2008;91(4):914-31.

- protein hydrolysate of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *J Funct Foods*. 2015;16:234-42.
- 40- Girgih AT, He R, Hasan FM, Udenigwe CC, Gill TA, Aluko RE. Evaluation of the in vitro antioxidant properties of a Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem*. 2015;173:652-9.
- 41- Je JY, Qian ZJ, Byun HG, Kim SK. Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from Tuna Backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochem*. 2007;42(5):840-6.
- 42- Nazeer RA, Kumar NS, Jai Ganesh R. In vitro and in vivo studies on the antioxidant activity of fish peptide isolated from the Croaker (*Otolithes ruber*) muscle protein hydrolysate. *Peptides*. 2012;35(2):261-8.
- 43- García-Moreno PJ, Batista I, Pires C, Bandarra NM, Espejo-Carpio FJ, Guadix A, et al. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Res Int*. 2014;65(Part C):469-76.
- 44- Hathwar SC, Bijinu B, Rai AK, Narayan B. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;164(1):115-24.
- 45- Ahn CB, Kim JG, Je JY. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem*. 2014;147:78-83.
- 46- Ngo DH, Qian ZJ, Ryu B, Park JW, Kim SK. In vitro antioxidant activity of a peptide isolated from Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) scale gelatin in free radical-mediated oxidative systems. *J Funct Foods*. 2010;2(2):107-17.
- 47- Bougatef A, Hajji M, Balti R, Lassoued I, Triki-Ellouz Y, Nasri M. Antioxidant and free radical-scavenging activities of Smooth Hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chem*. 2009;114(4):1198-205.
- 48- Bougatef A, Nedjar-Arroume N, Manni L, Ravallec R, Barkia A, Guillochon D, et al. Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of Sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chem*. 2010;118(3):559-65.
- 49- Taheri, A., Farvin, K.H.S., Jacobsen, C., Baron, C.P. Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted Herring Brine. *Food Chem*. 2014;142:318-26.
- Technol. 2011;46(12):2460-6.
- 29- Ovissipour M, Benjakul S, Safari R, Motamedzadegan A. Fish protein hydrolysates production from Yellowfin Tuna *Thunnus albacares* head using Alcalase and Protamex. *Int Aquat Res*. 2010;2(2):87-95.
- 30- Jin Y, Yan J, Yu Y, Qi Y. Screening and identification of DPP-IV inhibitory peptides from deer skin hydrolysates by an integrated approach of LC-MS/MS and in silico analysis. *J Funct Foods*. 2015;18(Part A):344-57.
- 31- Shimada K, Fujikawa K, Yahara K, Nakamura T. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J Agric Food Chem*. 1992;40(6):945-8.
- 32- Oyaizu M. Studies on products of browning reactions antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn J Nutr*. 1986;44(6):307-15.
- 33- Velarde-Salcedo AJ, Barrera-Pacheco A, Lara-González S, Montero-Morán GM, Díaz-Gois A, González de Mejia E, et al. In vitro inhibition of dipeptidyl peptidase IV by peptides derived from the hydrolysis of Amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) proteins. *Food Chem*. 2013;136(2):758-64.
- 34- Zhang Y, Chen R, Chen X, Zeng Z, Ma H, Chen S. Dipeptidyl peptidase IV-inhibitory peptides derived from Silver Carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) proteins. *J Agric Food Chem*. 2016;64(4):831-9.
- 35- Mardanyan S, Sharoyan S, Antonyan A, Zakaryan N. Dipeptidyl peptidase IV and adenosine deaminase inhibition by Armenian plants and antidiabetic drugs. *Int J Diabetes Metab*. 2011;19(2):69-74.
- 36- Lassoued I, Mora L, Nasri R, Aydi M, Toldrà F, Aristoy MC, et al. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from Thornback Ray (*Raja clavata*) muscle. *J Proteomics*. 2015;128:458-68.
- 37- Sudhakar S, Abdul Nazeer R. Structural characterization of an Indian squid antioxidant peptide and its protective effect against cellular reactive oxygen species. *J Funct foods*. 2015;14:502-12.
- 38- Chi CF, Wang B, Hu FY, Wang YM, Zhang B, Deng SG, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from protein hydrolysate of Bluefin Leatherjacket (*Navodon septentrionalis*) skin. *Food Res Int*. 2015;73:124-9.
- 39- Cai L, Wu X, Zhang Y, Li X, Ma Sh, Li J. Purification and characterization of three antioxidant peptides from