

Research Article

Antibacterial peptides have attracted a great deal of attention due to their biological properties against a wide range of microorganisms

Maryam Shokoohmand^{1*}, Hossein Zolgharnein¹, Mohammad Ali Salari Ali Abadi¹, Mojtaba Alishahi², Reza Safari³

¹ Department of Marine Biology, Faculty of Marine and Ocean Sciences, Khorramshahr University of Marine Sciences and Technology, Khorramshahr, Iran

² Department of Clinical Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

³ Caspian Sea Ecological Research Center, Iranian Fisheries Science Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization, Sari, Iran

Key Words

Aeromonas hydrophyla
Antibacterial properties
Bioactive peptides
Lantern fish
Streptococcus agalactiae
Sterptococcu iniae
Yersini ruckeri

Abstract

Introduction: The present study aimed to investigate antibacterial and properties of proteins produced by the enzyme hydrolysis of lantern fish (*Benthoosema petrotum*) produced by alcalase and flavourzyme enzymes.

Materials & Methods: Membrane ultrafiltration method was used to isolate and purify antimicrobial peptides smaller than 3 kDa. Antibacterial activity of protein hydrolyzed with alkalase enzyme (BPHA) and flavourzyme enzyme (BPHF) against *Aeromonas hydrophila*, *Streptococcus agalactiae*, *Sterptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri* (standard strains) was performed by disk diffusion and microdilution method.

Results: The results showed the appropriate efficiency of enzymes used to isolate antimicrobial peptides smaller than 3 kDa from lantern fish. Also, the lowest amount of MIC, MBC of hydrolyzed protein by flavourzyme against bacteria *S. iniae* was 16 and 32 µg / ml. The diameter of the growth inhibition zone of peptides isolated with alkalase enzyme (BPHA) and flavourzyme enzyme (BPHF) against *Y. ruckeri* and *S. iniae* was competitive with tetracycline antibiotic.

Conclusion: In general, it can be concluded that bioactive peptides derived from lantern fish have relative antibacterial effects against fish bacterial agents, although this effect depends on the type of enzyme used and the bacterial species. Therefore, further research on the possibility of using these antibacterial agents for fish bacterial pathogens is recommended.

Article info

* Corresponding Author's email:
shokoohmand_sa@yahoo.com

Received: 8 May 2024

Reviewed: 9 June 2024

Revised: 21 August 2024

Accepted: 11 September 2024

مقاله علمی - پژوهشی

بررسی اثر ضد باکتریایی پپتیدهای زیست فعال فانوس ماهیان دریای عمان (*Bebthosema petrotum*) در برابر برخی باکتری‌های بیماری‌زای ماهی

مریم شکوهمند^{*}، حسین ذوالقرنین^۱، محمدعلی سالاری‌علی‌آبادی^۱، مجتبی‌علیشاهی^۲، رضا صفری^۳

^۱ گروه زیست‌شناسی دریا، دانشکده علوم دریایی و اقیانوسی، دانشگاه علوم و فنون دریایی خرمشهر، خرمشهر، ایران

^۲ گروه علوم درمانگاهی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران

^۳ پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، ساری، ایران

کلمات کلیدی

چکیده

خواص ضدباکتریایی

پپتید زیست فعال

فانوس ماهیان

Yersinia ruckeri

Aeromonas hydrophyla

Streptococcus agalactiae

Sterptococcus iniae

مقدمه: پپتیدهای ضدباکتریایی به علت دارا بودن خواص بیولوژیکی در برابر طیف وسیعی از میکروارگانیسم‌ها، استفاده می‌شوند.

در این مطالعه بررسی خواص ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده فانوس ماهیان دریای عمان (*Benthosema petrotum*) تولید

شده با آنزیم‌های آلکالاز (Alcalase) و فلاورزایم (Flavourzyme) انجام شد.

مواد و روش‌ها: از روش اولترافیلتراسیون غشایی برای جداسازی و خالص‌سازی پپتیدهای ضد میکروبی کوچک‌تر از ۳ کیلو

دالتون استفاده گردید. فعالیت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز (BPHA) و آنزیم فلاورزایم (BPHF) در

برابر باکتری‌های *Aeromonas hydrophyla*, *Streptococcus agalactiae*, *Sterptococcus iniae*, *Yersinia ruckeri*

(سویه‌های استاندارد) به روش میکروداپلوشن و انتشار دیسک انجام شد.

نتایج: نتایج تحقیق نشان دهنده کارایی مناسب آنزیم‌های به کار رفته برای جداسازی پپتیدهای ضد میکروبی کوچک‌تر از ۳

کیلودالتون از فانوس ماهیان بودند. هم‌چنین کم‌ترین میزان MIC و MBC پروتئین هیدرولیز شده توسط فلاورزایم در برابر

باکتری *S. iniae* به میزان ۱۶ و ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. میزان قطر هاله عدم رشد پپتیدهای جدا شده با آنزیم آلکالاز

(BPHA) و آنزیم فلاورزایم (BPHF) در برابر باکتری *S. iniae* و *Y. ruckeri* قابل رقابت با آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین بود.

بحث و نتیجه‌گیری: به‌طور کلی می‌توان نتیجه گرفت که پپتیدهای زیست فعال حاصل از فانوس ماهیان دارای اثرات ضدباکتریایی

نسبی در برابر عوامل باکتریایی ماهی بوده، هرچند این اثر بستگی به نوع آنزیم به کار رفته و گونه باکتری دارد. لذا تحقیق بیش‌تر

در زمینه امکان استفاده از این مواد ضدباکتریایی در مبارزه با عوامل بیماری‌زای ماهی اکیداً توصیه می‌گردد.

* پست الکترونیکی نویسنده مسئول:

shokoohmand_sa@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۹ اردیبهشت ۱۴۰۳

تاریخ داوری: ۲۰ خرداد ۱۴۰۳

تاریخ اصلاح: ۳۱ مرداد ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: ۲۱ شهریور ۱۴۰۳

مقدمه

تولیدات آبزیان در جهان طی چند دهه اخیر به طور چشمگیری افزایش یافته است، به طوری که انتظار می رود تا سال ۲۰۲۵ به حدود ۱۹۶ میلیون تن خواهد رسید. با توجه به آمار فوق سهم فراوری آبزیان از ۲۵ درصد به ۷۵ درصد افزایش خواهد یافت (۱). توسعه پایدار آبی پروری، نیازمند به کارگیری تکنیک های نوین می باشد. استفاده از تکنولوژی های نوین در افزایش بهره وری و کاهش هزینه تولید از جمله موارد قابل اهمیت در آبی پروری پایدار است (۲). تلفات ناشی از بروز و شیوع بیماری های مختلف عفونی و انگلی که به دنبال عوامل استرس زا و کاهش سیستم ایمنی رخ می دهد از مهم ترین مشکلات پرورش دهندگان و از موانع اصلی رشد و توسعه این صنعت در ایران می باشد. عفونت های باکتریایی یکی از عوامل اصلی مرگ و میر ماهیان پرورشی است. آئروموناس هیدروفیلا یکی از باکتری های گرم منفی، متحرک، هوازی و بی هوازی اختیاری است که در محیط های آبی و دستگاه گوارش ماهیان سالم زندگی می کند و موجب سیتیسمی همراه با خونریزی های جلدی و احشایی، تورم روده و مرگ می شود (۳). بیماری دهان قرمز باکتریایی (Red Entric Mouth or Yersiniosis) یکی از بیماری های باکتریایی مهم در صنعت پرورش ماهیان سردآبی می باشد که در چند سال اخیر باعث بروز تلفات در مزارع سردآبی کشور شده است (۴). عامل بیماری، باکتری یرسینیا روکری (*Yersinia ruckeri*) می باشد. این باکتری جزء خانواده انتروباکتریاسه بوده که به عنوان یک عامل بیماری زای بسیار مهم برای بسیاری از گونه های مختلف ماهیان از جمله خانواده آزاد ماهیان است و در کشور نیز این بیماری از مهم ترین بیماری های باکتریایی پرورش قزل آلا است. استریپکوکوزیس نیز به عنوان یکی از بیماری های عمده مراکز تکثیر و پرورش ماهیان سردآبی در بسیاری از کشورهای دنیا و ایران معرفی شده است (۵). این باکتری ها امکان ایجاد بیماری در ماهیان آب شیرین و شور را دارند. در ایران نیز به عنوان عامل مهم بیماری زای ماهی قزل آلا مطرح است و هم چنین در ماهیان دریایی مثل پرورش ماهی سی باس آسیایی مهم ترین عامل بیماری زای آسیب رسان است (۶). اعمال روش های درمانی مرسوم علیه بیماری ها نظیر استفاده از انواع آنتی بیوتیک ها و داروهای شیمیایی دارای معایب و مشکلاتی است. برای مثال، استفاده مداوم از آنتی بیوتیک ها منجر به بروز پدیده مقاومت آنتی بیوتیکی در گونه های پرورشی و مصرف کنندگان در بلندمدت می شود. امکان انتقال این مقاومت به انسان مصرف کننده ماهی نیز از خطرات آنتی بیوتیک تراپی است. هم چنین اثرات مخرب داروهای شیمیایی بر منابع آبی و محیط زیست غیرقابل اغماض است (۷). ماهیان

دریایی منبع غنی از ترکیبات فعال زیستی مانند پپتیدها هستند. که می توانند به عنوان داروهای ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی و ضد تومور استفاده شوند (۸). براساس مطالعات انجام شده، استفاده دارویی از پپتیدها در مدل های جانوری بسته به هدف مطالعه به صورت گاو، ترکیب با خوراک و تزریقی پیشنهاد شده است (۹). در خصوص ماهیان در مراحل لاروی به صورت غوطه وری و یا در ماهیان مولد مانند قزل آلا به صورت تزریقی مطرح شده است (۱۰). در ساختار فضایی پروتئین، اجزای پپتیدی در قالب اسید آمینه های مختلف به تعداد ۲ تا ۲۰ عدد و وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰۰۰ دالتون وجود داشته که در شکل اولیه پروتئین به صورت غیرفعال بوده و هنگامی که پروتئین تحت تاثیر هیدرولیز بیوشیمیایی قرار می گیرد، پپتیدهای مذکور نمایان شده و بسته به وزن مولکولی و توالی و تعداد اسید آمینه ها خواص کارکردی متفاوتی از خود نشان می دهند (۱۱). از پروتئین هیدرولیز شده ماهی پپتیدهای ضد میکروبی مختلفی جدا کردند. پپتیدهای ضد میکروبی دارای بخش های کاتیونی می باشند که فعل و انفعالات آن ها با غشای پاتوژن های میکروبی را تسهیل می کنند (۱۲). گونه های بیماری زا *Aeromonas hydrophyla* و *Yersinia ruckeri* (نسبت به پروتئین های هیدرولیز شده از ماهیان تیلاپیا، باربوس ماهیان و کپور ماهیان حساسیت نشان دادند (۱۳، ۱۴، ۱۵). تعدادی از ماهیان دریایی که در نتیجه صید جانبی به ویژه تور ترال به دست می آیند به عنوان ارگانسیم غیرهدف بوده که بایستی در مدیریت شیلات مدنظر قرار داده شوند. یک خانواده از این ماهیان، فانوس ماهیان (Lantern Fish) بوده که از دسته ماهیان مزوپلاژیک دریایی محسوب می شوند و از اعماق ۳۰۰ تا ۱۲۰۰ متری آب ها با ۲۳۰ تا ۲۵۰ گونه و ۳۰ تا ۳۵ جنس وجود داشته و پراکندگی آن ها در آب های آزاد بسیار گسترده است. فانوس ماهی، متعلق به خانواده Myctophidae می باشد. از میان گونه های شناسایی شده در دریای عمان گونه *Benthosema pterotum*, Alcock 1890 گونه شاخص و غالب معرفی شده است، به طوری که میزان آن در آب های ایران حدوداً ۱ تا ۴ میلیون تن می باشد. فانوس ماهی ها، ماهی های کوچک با اندازه حداکثر ۴ سانتی متر و وزنی حدوداً ۲ تا ۵ گرم می باشند که در ایران مصرف خوراکی ندارند و معمولاً به مصرف تولید آرد ماهی می رسند (۱۶، ۱۷). این ماهیان منابعی غنی از پروتئین، به میزان کمتری چربی و کربوهیدرات هستند (۱۸). فانوس ماهیان از ذخایر بکر و دست نخورده ای هستند که برای استفاده از آن ها جهت مصرف انسانی و خوراک دام پژوهش های زیادی انجام شده است. مطمئناً با توجه به محدودیت منابع پروتئینی قابل استحصال از دریا، در آینده توجه به استفاده از فانوس ماهیان جایگاه ویژه ای خواهد یافت (۱۹). هرچند استفاده از این ماهیان برای

تولید پودر ماهی و تغذیه دام معمول است ولی یکی از بهترین روش‌های استفاده از این منبع وسیع پروتئین خدادادی ارزان، تولید مواد بیولوژیک فعال و ارزشمند قابل استفاده در صنایع دارویی و غذایی است (۲۰). یکی از این مواد بیولوژیک پپتیدهای ضد میکروبی هستند، لذا در تحقیق حاضر هیدرولیز آنزیمی برای تولید ترکیبات زیست فعال از فانوس ماهیان دریای عمان به کار گرفته شد و به منظور ارزیابی اثرات ضد باکتریایی این مواد از روش‌های انتشار دیسک و رقیق‌سازی در برابر ۴ باکتری استاندارد ذکر شده استفاده گردید.

مواد و روش‌ها

فانوس ماهیان (*Benthosema pterotum*) با وزن متوسط ۱۰-۲ گرم از دریای عمان (طول و عرض جغرافیایی ۵۷ ۰۰ E / ۲۵ ۱۰ N) صید و با حفظ کامل شرایط انتقال و کنار یخ با هواپیما به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر منتقل شد. سپس ماهی‌ها به عنوان ماده خام اولیه تا زمان مصرف در دمای فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. آنزیم آلکالاز استخراج شده از *Licheniformis bacillus* 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.

سنجش ترکیبات ماهی: سنجش ترکیبات ماهی برای سنجش ترکیب تقریبی نمونه‌ها از روش AOAC استفاده شد. برای اندازه‌گیری 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 انکوبه گردید. میزان پروتئین با روش کجلدال به دست آمد. چربی کل نیز با سوکسله استخراج شد (۲۱).

هیدرولیز ماهی‌ها: برای تهیه پروتئین هیدرولیز شده از فانوس ماهیان (کل ماهی)، ابتدا ماهی منجمد شده جهت یخ‌زدایی در دمای اتاق قرار گرفت، سپس ۱۰۰ گرم از آن توزین و به دو ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری (هر کدام ۵۰ گرم) انتقال داده شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت وزنی- حجمی ۱ به ۲ به هر ارلن حاوی نمونه اضافه شد. سپس ارلن‌ها به مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا آنزیم‌های داخلی پوست غیرفعال شوند (۱۱). 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 سانتی‌گراد انجام شد. پس از آن آنزیم فلاورزایم به مقدار ۱ درصد محتوی پروتئین به ارلن دوم اضافه شد و هیدرولیز به مدت

۹۰ دقیقه در pH ۷ و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. سپس از فرآیند حرارتی در دمای ۹۰ درجه به مدت ۱۰ دقیقه جهت غیرفعال کردن آنزیم‌ها استفاده گردید. بعد از این زمان، ارلن‌ها در دمای محیط خنک و سپس محتویات آن‌ها، ۱۰ دقیقه با دور ۱۰۰۰ ×g در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، سانتریفوژ شدند. سوپرناتانت‌ها (مایعات رویی) با استفاده از خشک‌کن انجمادی، خشک شدند (۲۲). پودرهای تولیدی در کیسه‌های زیپ‌دار در فریزر در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگه‌داری شدند. تولید پروتئین هیدرولیز شده در سه تکرار انجام گردید.

اندازه‌گیری میزان هیدرولیز: اندازه‌گیری میزان هیدرولیز

(DH) به کمک تری کلرواستیک اسید (TCA) ۲۰ درصد حجمی/ حجمی اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری، درصد نسبت پروتئین‌های هیدرولیزی محلول در تری کلرواستیک اسید به کل پروتئین‌های موجود در نمونه حاصل از سانتریفوژ پس از هیدرولیز است. بدین‌منظور حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده با محلول TCA مخلوط شده و پس از هم‌زدن در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه (۶۷۰۰×g) سانتریفوژ شدند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول با روش Lowry اندازه‌گیری گردید. در این روش ایجاد کمپلکس رنگی و شدت رنگ ایجاد شده بستگی به غلظت پروتئینی موجود در نمونه دارد (۲۳). میزان درجه هیدرولیز از طریق معادله ذیل محاسبه شد (۲۴).

$$DH = \frac{TCA10\% - Soluble N \text{ in sample}}{Total N \text{ in sample}} \times 100$$

جداسازی پپتیدها: جداسازی پپتیدها توسط اولترافیلتراسیون

با دو فیلتر آمیکون با وزن مولکولی مختلف (3, 10 MWCO) کیلو دالتون انجام شد. ابتدا پروتئین هیدرولیز شده خام با استفاده از فیلتر آمیکون ۱۰ کیلودالتون در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت زمان ۱۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰×g سانتریفوژ شد. سپس پروتئین هیدرولیز شده کم‌تر از ۳ کیلو دالتون در دمای ۲۵ درجه به مدت زمان ۲۰ دقیقه و با سرعت ۷۵۰۰×g سانتریفوژ شد. بدین‌ترتیب پپتیدهای بین ۳ و ۱۰ کیلو دالتون و پپتیدهای زیر ۳ کیلو دالتون جدا شدند.

باکتری‌های مورد استفاده: باکتری‌های مورد مطالعه شامل

Streptococcus agalactiae, *Aeromonas hydrophila* و *Yersinia ruckeri* به صورت لیوفیلیزه از بانک باکتریایی بخش آبیان دانشکده دامپزشکی دانشگاه شهید چمران اهواز استفاده گردید. این باکتری‌ها از ماهیان بیمار در طول سال‌ها جداسازی شده و دارای سابقه تشخیص مولکولی با PCR و از نظر اسید نوکلئیکی توالی‌یابی شده بودند.

روش انتشار دیسک (Diffusion Disk) ابتدا دیسک‌های بلانک استریل را به مدت ۵ دقیقه در استوک پپتیدهای زیست فعال زیر ۳ کیلودالتون قرار داده شدند تا پروتئین‌ها کامل جذب دیسک‌ها شوند. سپس باکتری‌های مورد تحقیق در سطح محیط مولر هینتون آگار به طور یکنواخت با استفاده از سوآپ استریل کشت داده شده و سپس دیسک‌های آماده شده با استفاده از پنس استریل روی پلیت‌ها قرار داده شدند. دیسک‌های آنتی‌بیوتیک استاندارد مخصوص آنتی‌بیوگرام هم به عنوان کنترل مثبت استفاده شدند. محیط‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شده و سپس قطر هاله عدم رشد باکتری در مورد هر باکتری برای محصول پپتید ضد میکروبی و آنتی‌بیوتیک‌ها ثبت گردید (سه تکرار) (۲۲).

تجزیه و تحلیل آماری: تمام آزمایش‌ها در سه تکرار انجام و نتایج ثبت گردید. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. میانگین مقادیر و انحراف معیار در نرم‌افزار Excel محاسبه شد. از نرم‌افزار آماری SPSS نسخه ۱۸ برای آنالیز داده‌ها استفاده گردید.

نتایج

نتایج تعیین ترکیبات تقریبی مربوط به تعیین ترکیبات تقریبی خشک شده فانوس ماهی و پروتئین هیدرولیز شده آن توسط دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در جدول ۱ ارائه شده است. همان‌طوری‌که مشاهده می‌شود میزان پروتئین، در پروتئین هیدرولیز شده فانوس ماهیان به میزان قابل توجهی نسبت به ماده اولیه ماهی و سایر ترکیبات شیمیایی بالاتر بود. میزان رطوبت و چربی در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام ماهی کاهش داشت. درحالی‌که میزان خاکستر در نمونه هیدرولیز شده در مقایسه با نمونه خام افزایش داشت. درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده با آلکالاز بیش‌تر از پروتئین هیدرولیز شده با فلاورزایم بود ($p < 0.05$) (جدول ۲).

تعیین MIC و MBC به روش میکرودايلوشن (ریز - رقیق سازی):

استوک اولیه با غلظت ۵۰۰ میلی گرم در میلی لیتر از هر یک از پپتیدهای ضد میکروبی تولید شده با دو آلکالاز و فلاورزایم به صورت جداگانه تهیه شد. برای ساختن محلول از پودر لیوفیلیزه پروتئین هیدرولیز شده زیر ۳ کیلودالتون در آب دوبار تقطیر استفاده شد (۱۸). برای تهیه رقت‌های متوالی از محیط کشت مولر هینتون برات (Merck Germany, Darmstadt) استفاده شد (۲۵). به‌طور خلاصه ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از محیط مولر هینتون برات به چاهک‌های میکروپلیت ۹۶ خانه‌ای کشت سلولی اضافه گردید و سپس رقت‌های متوالی بر مبنای دو در سه تکرار در میکروپلیت تهیه گردید، بدین‌منظور ۱۰۰ میکرولیتر استوک اولیه به گوده هر ردیف اضافه شد و بعد از پیپتینگ، ۱۰۰ میکرولیتر به گوده دوم منتقل و به‌همین صورت تا گوده آخر تکرار شد و از گوده آخر ۱۰۰ میکرولیتر خارج گردید. سپس مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت 1.0×10^8 cfu/ml باکتری‌های آئروموناس هیدروفیلا، استرپتوکوکوس اینه، استرپتو کوکوس آگالاکتیک و یرسینا راکری به‌طور جداگانه در هر ردیف (در ۳ تکرار) تلقیح گردید. سپس جذب نوری میکروپلیت در طول موج ۶۲۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفوتومتر (Bio Tek ELx800, USA) خوانده شد. بعد از انکوباسیون ۲۴ ساعته در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد علاوه بر بررسی چشمی رشد باکتری، جذب نوری مجدداً در طول موج ۶۳۰ نانومتر اندازه‌گیری و ثبت شد و حداقل غلظتی که باعث مهار رشد شده بود، به‌عنوان MIC در نظر گرفته شد. برای تعیین MBC، پس از این‌که حداقل غلظت مهاري BPHA و BPHF بر سوش‌های باکتریایی مورد نظر تعیین شد، از سه غلظت بعدی MIC ($1/2$ ، $1/4$ و $1/8$) بر روی محیط کشت مولر هینتون آگار به‌وسیله سوآپ در شرایط استریل کشت داده شد و پلیت‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. رشد باکتری‌ها نشان دهنده حداقل غلظت کشندگی MBC می‌باشد (۲۶).

تعیین قدرت ضدباکتریایی پروتئین‌های ضد میکروبی به روش انتشار دیسک:

در ارزیابی خاصیت ضدباکتریایی پپتیدها به

جدول ۱: آنالیز شیمیایی ماده خام (براساس وزن خشک) و پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آن

ماده	رطوبت (%)	چربی (%)	خاکستر (%)	پروتئین (%)
پروتئین نمونه خام	۱۱/۷۷±۰/۴۵ ^a	۲۵/۳±۰/۰۲ ^a	۱۸/۴±۰/۰۵ ^a	۲۱/۱۵±۰/۱۲ ^a
پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز	۳۶/۹±۰/۰۴ ^b	۳۶/۱±۰/۰۱ ^b	۴۱/۸±۰/۰۷ ^b	۲۶/۸±۰/۰۸۵ ^b
پروتئین هیدرولیز شده با آنزیم فلاورزایم	۷۵/۹±۰/۰۳ ^c	۶۴/۱±۰/۰۵ ^c	۶۸/۸±۰/۰۴ ^c	۴۵/۷۹±۰/۳۶ ^c

حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار را نشان می‌دهد. داده‌ها به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شده است.

MBC، نتایج نشان داد کم‌ترین میزان MIC و MBC به باکتری *S. iniae* مربوط بود، یعنی این باکتری بیش‌ترین حساسیت را به پپتید BPHF را نشان داد (جدول ۳). مشاهده هاله عدم رشد پپتیدهای زیست‌فعال فانوس ماهیان در محیط کشت باکتری‌های *A. hydrophila*، *S. agalactiae*، *S. iniae*، *Y. ruckeri* موید اثر ضدباکتریایی پپتیدهای مذکور بود ولی قابل رقابت با آنتی‌بیوتیک‌های استاندارد اریترومايسين، کلرامفنیکل و تتراسایکلین نبود. هم‌چنین باکتری‌های *S. iniae* و *Y. ruckeri* در برابر آنتی‌بیوتیک تتراسایکلین هیچ‌گونه هاله عدم رشد مشاهده نگردید (جدول ۴).

جدول ۲: درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده فانوس ماهیان

آنزیم	PH	دما (درجه سانتی‌گراد)	زمان (دقیقه)	درجه هیدرولیز (%)
آلکالاز	۸/۵	۵۸	۹۰	۴۲/۳۵±۰/۱۶ ^a
فلاورزایم	۷	۵۰	۹۰	۲۷/۳۱±۰/۲۱ ^b

حروف متفاوت لاتین اختلاف معنی‌دار در سطح ۰/۰۵ را نشان می‌دهد. داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار بیان شده است.

فعالیت ضدباکتریایی: در بررسی فعالیت ضدباکتریایی پپتیدهای

زیر ۳ کیلودالتون توسط آنزیم آلکالاز و فلاورزایم به روش MIC و

جدول ۳: میزان حداقل غلظت ممانعت‌کنندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) فرکشن‌های پپتیدهای زیست‌فعال

باکتری	آنزیم	MIC (میکروگرم / میلی‌لیتر)	MBC (میکروگرم / میلی‌لیتر)
<i>A. hydrophila</i>	BPHA	۳۲	۶۴
	BPHF	۳۲	۶۴
<i>S. agalactiae</i>	BPHA	۶۴	۶۴
	BPHF	۳۲	۶۴
<i>S. iniae</i>	BPHA	۳۲	۶۴
	BPHF	۱۶	۳۲
<i>Y. ruckeri</i>	BPHA	۶۴	۱۲۸
	BPHF	۳۲	۶۴

جدول ۴: میزان قطر هاله عدم رشد (میلی‌متر) پپتیدهای زیست‌فعال در برابر باکتری‌های استاندارد

باکتری	BPHA (میلی‌متر)	BPHF (میلی‌متر)	Erythromycin (میلی‌متر)	Chloramphenicol (میلی‌متر)	Tetracycline (میلی‌متر)
<i>A. hydrophila</i>	۱۰	۸	۲۲	۳۵	۲۸
<i>S. agalactiae</i>	۱۱	۸	۲۲	۱۵	۳۲
<i>S. iniae</i>	۱۰	۸	۲۵	۳۵	-
<i>Y. ruckeri</i>	۸	۱۰	۳۸	۱۸	-

بحث

پروتئین‌های محلول ماهی، منابع غنی از پپتیدهای زیست‌فعال با پتانسیل‌های ارزشمند و دارویی می‌باشند. پپتیدهای زیست‌فعال که به‌صورت غیرفعال در پروتئین اولیه وجود دارند، تحت تاثیر هیدرولیز آنزیمی فعال می‌شوند (۲۷). به‌کارگیری تکنولوژی آنزیمی به‌منظور بازیابی و تغییرات پروتئینی، منجر به تولید طیف گسترده‌ای از اجزای غذایی و محصولات صنعتی گردیده است. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های غذایی روشی موثر در بازیابی پپتیدهای زیست‌فعال قوی می‌باشد. مشخص شده است که پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی کاربردهای تغذیه‌ای و دارویی دارند (۲۸). تحقیقات زیادی

روی هیدرولیز آنزیمی قسمت‌های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری صورت گرفته است. بسیاری از این تحقیقات اثر آنزیم‌های مختلف را مورد بررسی قرار دادند که از جمله می‌توان به آنزیم پاپاین با منشا گیاهی، آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با منشا جانوری، آنزیم آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نوئوتراز با منشا میکروبی اشاره داشت. راندمان بازیافت پروتئینی نشان‌دهنده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های یک ماده می‌باشد که به خصوصیات ماده مورد نظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیم بستگی دارد (۲۹). نتایج مطالعه حاضر نشان‌دهنده آن است که میزان پروتئین پس از هیدرولیز با استفاده از آنزیم آلکالاز و فلاورزایم نسبت به نمونه خام اولیه افزایش داشته (۶۵-۷۰ درصد) و میزان چربی و رطوبت کاهش

یافته است. مطالعات Henriques و همکاران، بر روی پروتئین‌های هیدرولیز شده چندین گونه از ماهیان شمال غرب اسپانیا با استفاده از آنزیم آلکالاز انجام شد که در آن میزان چربی و رطوبت پس از هیدرولیز کاهش یافته و میزان پروتئین تا حد ۶۹/۸ تا ۷۶/۶ درصد افزایش یافت که هم‌سو با نتایج حاضر می‌باشد (۳۰). بررسی انجام شده توسط Ovissipour و همکاران، اثر چهار آنزیم تجاری (آلکالاز، پروتامکس، نئوتراز و تریپسین) بر هیدرولیز پروتئین‌های امعا و احشا ماهی کپور نقره‌ای مورد مطالعه قرار گرفت (۳۱). در این مطالعه بیش‌ترین درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز بوده است که با مطالعه حاضر مطابقت دارد. این امر را می‌توان با توجه به قدرت آنزیم‌ها تحت شرایط این آزمایش توجیه کرد. بدین‌معنی که آنزیم آلکالاز تحت شرایط این آزمایش قوی‌تر از فلاورزایم عمل کرد و توانست طی ۱۸۰ دقیقه، درصد بیش‌تری از پیوندهای پپتیدی مولکول پروتئین را تجزیه کند. بر همین اساس در بررسی دیگری روند هیدرولیز امعا و احشا ماهی تون زرد باله را با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده آلکالاز به‌صورت معنی‌داری از لحاظ میزان پروتئین بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد (۲۹). این نتیجه با مطالعه فعلی هم‌خوانی دارد. آنزیم آلکالاز باعث تولید اسیدهای آمینه قابل‌دسترس بیش‌تری شده و به نوعی مکمل فعالیت پروتئازی باکتری مورد استفاده در جهت هیدرولیز فراتر پپتیدها و متعاقب آن تولید اسیدهای آمینه آزاد می‌باشد. در مطالعه حاضر عملکرد بهینه آنزیم آلکالاز با غلظت ۱/۵ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد، محدوده PH ۸/۵ و در زمان ۹۰ دقیقه مشاهده شد. این در حالی است که شرایط بهینه برای آنزیم فلاورزایم با غلظت ۱/۵ در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد؛ محدوده PH ۷ و در زمان ۹۰ دقیقه حاصل شد. در خصوص آنزیم آلکالاز بایستی اشاره نمود که بهترین دما برای فعالیت آنزیم بین ۵۰ تا ۵۷ درجه سانتی‌گراد بوده ولی این آنزیم قادر به فعالیت در دماهای پایین‌تر و بالاتر و هم‌چنین دامنه PH ۷-۸/۵ نیز می‌باشد. در مطالعه Yasemi و همکاران، بیشینه دو شاخص دما و زمان برای آنزیم آلکالاز به‌منظور هیدرولیز امعا و احشا کپور سرگنده در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و در زمان ۶۰ دقیقه و کمینه آن‌ها در دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد ۱۵ دقیقه حاصل شد. در واقع سینتیک بازیافت پروتئینی در طی هیدرولیز آنزیمی به دو قسمت تقسیم می‌شود؛ یک واکنش اولیه سریع که در آن زنجیره‌های پپتیدی با باندهای ضعیف از ذرات پروتئینی نامحلول جدا می‌شوند و یک واکنش اولیه آهسته‌تر که در آن پروتئین‌های مرکزی زنجیره شکسته می‌شوند. بنابراین کل بازیافت پروتئینی مربوط به کاهش

فعالیت آنزیمی، اشباعیت سوبسترا یا بازدارنده محصول می‌باشد. به طور کلی آنزیم‌ها با منشا میکروبی از جمله آلکالاز دارای مزیت‌های بیش‌تری هستند که می‌توان به پایداری بیش‌تر در برابر حرارت و PH بالا و خصوصیات پروتئولیتیکی اشاره کرد (۳۲). مطالعه حاضر نیز نشان‌دهنده برتری آنزیم آلکالاز در مقایسه با آنزیم فلاورزایم می‌باشد. در این تحقیق مهار رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا، استرپتوکوکوس آگالاکتیه، استرپتوکوکوس اینیه و یرسینیا راکری توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده کم‌تر از ۳ کیلو دالتون فانوس ماهیان دیده شد. بیش‌ترین میزان MIC و MBC در پپتیدهای جدا شده با آنزیم آلکالاز (BPHA) در برابر باکتری *Y. ruckeri* به‌ترتیب ۶۴ و ۱۲۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین میزان در پپتیدهای جدا شده با آنزیم فلاورزایم (BPHF) در برابر باکتری *S. iniae* به ترتیب ۱۶ و ۳۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود. در مطالعه Cerrato و همکاران، اثرات ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده ماهی Yellowfin tuna علیه باکتری آئروموناس هیدروفیلا با روش MIC و MBC انجام شد. این بررسی نشان داد که پپتیدهای مذکور می‌توانند باعث مهار رشد باکتری آئروموناس هیدروفیلا گردد (۳۳). Payam و همکاران، گزارش کردند که عصاره‌های متانولی گناد و عضله خیار دریایی به عنوان مواد زیست فعال اثرات بازدارندگی و کشندگی مشابهی علیه باکتری *A. hydrophyla* نشان دادند و حداقل غلظت بازدارندگی ۶۲/۵ mg/ml را گزارش نمودند که هم‌سو با نتایج مطالعه حاضر می‌باشد (۳۴). در بررسی حاضر بیش‌ترین میزان قطر هاله عدم رشد پپتیدهای زیست فعال فانوس ماهیان جدا شده با آنزیم آلکالاز علیه باکتری‌های استرپتوکوکوس آگالاکتیه به‌میزان ۱۱ میلی‌متر مشاهده شد. در بررسی که توسط Salavati Khoshghalb و همکاران، اثرات ضدباکتریایی همولف دوکفه‌ای، *Didacna* و *Cerastoderma* به‌عنوان ترکیبات فعال زیستی با استفاده از اندازه‌گیری قطر هاله عدم رشد بررسی گردید، بیش‌ترین میزان را به‌ترتیب ۱۷ و ۱۵ میلی‌متر گزارش نمودند (۳۵). در بررسی که توسط Baco و همکاران، انجام شد، پپتیدهای ضد باکتریایی شناسایی شده با عنوان Fpigmgshsrpa که شامل ۱۲ اسید آمینه می‌باشند، می‌توانند سبب جلوگیری از رشد باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی شوند (۳۶). مکانیسم اثر پپتیدهای ضدباکتریایی با زنجیره آمینواسیدی کم‌تر از ۳ کیلودالتون براساس ویژگی‌های بیوشیمیایی مثل بار خالص به‌دو گروه پپتیدهای کاتیونی و پپتیدهای آنیونی تقسیم می‌شوند. اغلب پپتیدهای ضد میکروبی کاتیونی هستند (۳۷). هرچند مکانیسم دقیق عملکرد آن‌ها هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است ولی تصور بر آن است که این پپتیدهای باردار مثبت، پوشش سلولی باکتریایی که بار منفی دارد را هدف قرار می‌دهند. سپس با نفوذ به درون غشای سلول، ساختار

8. Ucak, I., Afreen, M., Montesano, D., Carrillo, C., Tomasevic, I., Simal-Gandara, J. and Barba, F.J., 2021. Functional and bioactive properties of peptides derived from marine side streams. *Mar Drugs*. 19(2): 71. doi: <https://doi.org/10.3390/md19020071>
9. Rabiei, S., Nikoo, M., Rezaei, M. and Rafieian-Kopaei, M., 2018. A review on therapeutic effects of marine bioactive peptides in animal models and human. *Iranian Journal of Physiology and Pharmacology*. 2(4): 213-201.
10. Javaherdoust, S., Yeganeh, S. and Keramat Amirkolaie, A., 2019. Effects of dietary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera protein hydrolysate on some hematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout juvenile. *Iran Fish Sci J*. 28(2): 71-83. doi: 10.22092/ISFJ.2019.118925
11. Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *J Mol Catal B Enzym*. 19: 489-498. doi: [https://doi.org/10.1016/S1381-1177\(02\)00203-5](https://doi.org/10.1016/S1381-1177(02)00203-5)
12. Bi, J., Tian, C., Jiang, J., Zhang, G.L., Hao, H. and Hou, H.M., 2020. Antibacterial activity and potential application in food packaging of peptides derived from turbot viscera hydrolysate. *J Agric Food Chem*. 68(37): 9968-9977. doi: <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.0c03146>
13. Anil, K.T. and Sunil, K., 2016. Biochemical characterisation and antibacterial properties of fish skin mucus of freshwater fish (*Hypophthalmichthys nobilis*). *Int J Pharm Pharm Sci*. 8(6): 6-10.
14. Robert, M., Zatylny-Gaudin, C., Fournier, V., Corre, E., Le Corguillé, G., Bernay, B. and Henry, J., 2015. Molecular characterisation of peptide fractions of a Tilapia (*Oreochromis niloticus*) byproduct hydrolysate and in vitro evaluation of antibacterial activity. *Process Biochem*. 50(3): 487-92. doi: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2014.12.022>
15. 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 Sci Technol*. 55(1): 183-188. doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.07.021>
16. Valinassab, T., Pierce, J. and Johannesson, K., 2006. Lantern fish (*Benthosema pterotum*) resources as a target for commercial exploitation in the Oman Sea. *J Appl Ichthyol*. 23(5): 573-577. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1439-0426.2007.01034.x>
17. Zahuranec, B., Karuppasamy, P.K., Valinassab, T., Kidwai, S., Bernardi, J. and Bernardi, G., 2012. Cryptic speciation in the mesopelagic environment: Molecular phylogenetics of the lanternfish genus *Benthosema*. *Mar Genom*. 7: 7-10. doi: <https://doi.org/10.1016/j.margen.2012.05.001>
18. Chai, H.J., Chan, Y.L., Li, T.L., Chen, Y.C., Wu, C.H., Shiau, C.Y. and Wu, C.J., 2012. Composition characterization of Myctophids (*Benthosema pterotum*): Antioxidation and safety evaluations for Myctophids protein hydrolysates. *Int Food Res J*. 46(1): 118-126. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.12.008>
19. Shaviklo, A. and Moradi, Y., 2019. Supplying nutritional needs of livestock and humans from lanternfishes. *Iran Fish Sci J*. 28(4): 90-96. doi: 10.22092/ISFJ.2019.119466
20. Asgarzadeh, F., Ataei, M. and Choobkar, N., 2020. Comparative comparison of physicochemical properties

سلولی را تخریب کرده و منجر به تراوش اجزای سیتوپلاسم به بیرون و نهایتاً مرگ سلولی می‌شوند (۳۸). درحالی‌که پپتیدهای ضد میکروبی آنیونی، گیرنده‌های ویژه‌ای را هدف قرار داده و به‌عنوان بازدارنده‌های اصلی مسیرهای متابولیکی رفتار می‌کنند (۳۹). همچنین این پپتیدها می‌توانند بدون لیز غشایی، با تغییر متابولیسم سلول باکتری و تراوش مواد به داخل سلول باعث از بین رفتن باکتری گردند. بنابراین می‌توان از پپتیدهای ضد باکتریایی برای ساخت آنتی‌بیوتیک‌های جدید در صنایع دارویی و صنایع غذایی استفاده کرد (۴۰). با توجه به نتایج به‌دست آمده در بررسی حاضر نشان داده شد که اولاً حساسیت باکتری‌های مورد مطالعه به پپتیدهای زیست فعال بسیار متفاوت است ولی با توجه به نوع باکتری، استفاده از این پپتیدها در درمان و پیشگیری از بیماری‌های باکتریایی ماهی نیاز به بررسی‌های مورد ارزیابی قرار گیرد.

منابع

1. Gao, R., Yu, Q., Shen, Y., Chu, Q., Ge, C., Fen, S., Yang, M., Yuan, L., McClements, D.J. and Sun, Q., 2021. Production, bioactive properties, and potential applications of fish protein hydrolysates: Developments and challenges. *Trends Food Sci Technol*. 110: 687-699. doi: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.02.031>
2. Adel, M., Pourgholam, R., Zorriezhahra, S.J., Safari, R. and Ghiasi, M., 2015. The effect of different level of *Mentha piperita* on growth performance, body composition, Intestinal bacteria and survival rate of *Oncorhynchus mykiss* in challenging with *Yersinia ruckeri*. *Aquat Ecol*. 4(4): 70-62.
3. Mortazi, M., Omidzahir, S. and Akhoundian, M., 2021. Study the occurrence of *Aeromonas hydrophila* septicemia in *Carassius gibelio* of Shazde River of Babolsar. *Veterinary Researches & Biological Products*. 34(1): 140-147. doi: 10.22092/VJ.2020.128309.1645
4. Zorriezhahra, M.J., Adel, M. and Torabi Delshad, S., 2017. Enteric redmouth disease: Past, present and future: A review. *Iran J Fish Sci*. 17(4): 1135-1156. doi: 10.22092/IJFS.2018.114726
5. Sepahdari, A., Saeedi, A.S., Kakoulaki, S., Habibi Kotanaee, F. and Babaalian, A.R., 2014. Incidence of streptococcus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Haraz River in Mazandaran Province, Iran. *Iran J Fish Sci*. 22(4): 41-50. doi: 20.1001.1.10261354.1392.22.4.4.9
6. Zorriezhahra, M.J., Mehrabi, M. and Rezvani, S., 2014. Introducing of the most important rearing Tilapia infectious diseases (bacterial and viral) in hatchery phase till offer to the market (Grow out phase). *J Ornament Aquat*. 1(3): 9-20. doi: 20.1001.1.24234575.1393.1.3.2.1
7. Harikrishnan, R., Nisha, M.R. and Balasundaram, C., 2003. Hematological and biochemical parameters in common carp, *Cyprinus carpio*, following herbal treatment for *Aeromonas hydrophila* infection. *Aquaculture*. 221 (1-4): 41-50. doi: [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00023-1](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00023-1)

33. Cerrato, A., Capriotti, A.L., Capuano, F., Cavaliere, C., Montone, A.M.I., Montone, C.M., Piovesana, S., Zenezini Chiozzi, R. and Laganà, A., 2020. Identification and antimicrobial activity of medium-sized and short peptides from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) simulated gastrointestinal digestion. *Foods*. 9(9): 1185. doi: <https://doi.org/10.3390/foods9091185>
34. Payam, B., Soltani, M., Shamsaie Mehrgan, M., Rajabi Islami, H. and Nazemi, M., 2021. Antibacterial activity of sea cucumber (*Holothuria leucospilota*) extracts on *Lactococcus garvieae* and *Aeromonas hydrophila*. *J Anim Environ*. 13(3): 307-314. doi: 10.22034/AEJ.2020.254363.2387 (In Persian)
35. Salavati Khoshghalb, M., Moshfegh, A. and Setorki, M., 2020. Evaluation of Antibacterial Characteristics of Hemolymph of Cerastoderma and Didacna Bivalves in the southern Coasts of Caspian Sea. *J Anim Environ*. 12(1): 369-374. doi: 10.22034/AEJ.2020.105614 (In Persian)
36. Baco, N., Oslan, S.N.H., Shapawi, R., Mohhtar, R.A.M., Noordin, W.N.M. and Huda, N., 2022. Antibacterial activity of functional bioactive peptides derived from fish protein hydrolysate. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci*. 967(1): 012019. doi: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/967/1/012019>
37. Marshall, S.H. and Arenas, G., 2003. Antimicrobial peptides: A natural alternative to chemical antibiotics and potential for applied biotechnology. *Electron J Biotechnol*. 6(3): 96-109.
38. Bagley, C.P., 2014. Potential role of synthetic antimicrobial peptides in animal health to combat growing concerns of antibiotic resistance, a review. *Wyno Academic Journal of Agricultural Sciences*. 2(2): 19-28.
39. Cotter, P.D., Ross, R.P. and Hill, C., 2013. Bacteriocins -a viable alternative to antibiotics? *Nat Rev Microbiol*. 11(2): 95-105. doi: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2937>
40. Pezeshk, S., Ojagh, S.M., Rezaei, M. and Shabanpour, B., 2019. Fractionation of protein hydrolysates of fish waste using membrane ultrafiltration: investigation of antibacterial and antioxidant activities. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 11(3): 1015-1022. doi: <https://doi.org/10.1007/s12602-018-9483-y>
21. Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 2002. Official Methods of Analysis Chemists 14th ed. Washington DC.
22. Ojagh, S.M., Abdollahzadeh, E., Shabanpour, B., Kordjazi, M. and Khosravi, G.R., 2017. Effectiveness of bioactive compounds produced by *Lactobacillus lactis* in combination with essential oils, salts and acetic acid to control *Listeria monocytogenes* in liquid model and minced meat of *hypophthalmichthys molitrix*. *Aquatic Physiology and Biotechnology*. 4(4): 89-110. doi: 10.1001.1.23453966.1395.4.4.7.0
23. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193(1): 265-275.
24. Raghavan, S. and Kristinsson, H.G., 2008. Antioxidative efficacy of alkali-treated tilapia protein hydrolysates: A comparative study of five enzymes. *J Agric Food Chem*. 56(4): 1434-1441. doi: <https://doi.org/10.1021/jf0733160>
25. Azizi, R., Motallebi, A., Nazemi, M., Sharifruhani, M. and Afsharnasab, M., 2020. Survey of antibacterial properties of extracts of green algae ulva fasciata collected from Persian Gulf. *J Anim Environ*. 12(3): 469-474. doi: 10.22034/AEJ.2020.121633 (In Persian)
26. Ghotaslou, R., Saghati, H., Dehnad, A. and Salahi Eshlaghi, B., 2016. Antibacterial effects of Azerbaijan honey on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Iran J Med Microbiol*. 9(4): 40-46.
27. Siddik, M.A., Howieson, J., Fotedar, R. and Partridge, G.J., 2021. Enzymatic fish protein hydrolysates in finfish aquaculture: a review. *Rev Aquac*. 13(1): 406-430. doi: <https://doi.org/10.1111/raq.12481>
28. Montesano, D., Gallo, M., Blasi, F. and Cossignani, L., 2020. Biopeptides from vegetable proteins: New scientific evidences. *Curr Opin Food Sci*. 31: 31-37. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.10.008>
29. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M., 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *J Sci Food Agric*. 93(7): 1718-1726. doi: <https://doi.org/10.1002/jsfa.5957>
30. Henriques, A., Vázquez, J.A., Valcarcel, J., gério Mendes, R.O., Bandarra, M.N. and Pires, C., 2021. Characterization of protein hydrolysates from fish discards and by-products from the North-West Spain fishing fleet as potential sources of bioactive peptides. *Mar Drugs*. 19(6): 338. doi: <https://doi.org/10.3390/md19060338>
31. Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Accipenser persicus*) viscera. *Food Chem*. 115(1): 238-242. doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.12.013>
32. Yasemi, M., Ghomi Marzdashti, M.R., Darnahal, T., Mohammadzadeh, B. and Amini, H., 2013. Yield of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) by using enzymes. *Iran Fish Sci J*. 22(1): 149-156. doi: <http://hdl.handle.net/1834/36758>