

اثرات استفاده از پروتئین آبکافتی تهیه شده از اندرونه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جیره‌ی غذایی بر برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی بچه‌ماهی قزل آلائی رنگین کمان

شقایق جواهر دوست^۱، سکینه یگانه^{۱*}، عبدالصمد کرامت امیرکلایی^۱

*skyeganeh@gmail.com

۱- گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

چکیده

هدف از این تحقیق تهیه پروتئین آبکافتی (هیدرولیزی) از اندرونه (امعاء و احشاء) قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، تعیین وزن مولکولی پپتیدهای حاصله و استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره غذایی بچه‌ماهی قزل آلائی رنگین کمان برای بررسی تاثیر آن بر برخی از فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی ماهی بود. برای این منظور آبکافت اندرونه ماهی قزل آلائی رنگین کمان به وسیله آنزیم آلکالاز انجام شد. فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) پروتئین آبکافتی حاصله از اندرونه قزل آلائی رنگین کمان $85 \pm 1/6$ درصد به دست آمد. پروتئین آبکافتی با مقادیر مختلف صفر (شاهد)، $0/5$ ، 1 و 2 درصد جیره برای مرحله‌ی دوم آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. 252 قطعه بچه‌ماهی قزل آلائی رنگین کمان با وزن متوسط $9/24 \pm 0/22$ گرم به صورت تصادفی در ۴ تیمار (سه تکرار) به مدت ۶۰ روز با جیره‌های مورد نظر روزی ۳ بار تا حد سیری تغذیه شدند. وزن مولکولی پپتیدهای حاصله از آبکافت در دامنه ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون متغیر بود و در پایان آزمایش فاکتورهای خونی (تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول سفید، MCV، MCH و MCHC)، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون (پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری گلیسرید) و ایمنی (فعالیت لیزوزیم) ارزیابی شدند. افزایش مکمل پروتئین آبکافتی تا سطح ۲ درصد باعث و هموگلوبین شد ($P < 0/05$). مقدار گلبول قرمز و گلبول سفید تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد ($P > 0/05$). کمترین مقدار هماتوکریت در تیمار ۱ درصد مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین مقدار آلبومین و کلسترول در تیمار ۲ درصد مشاهده شد ($P < 0/05$). بیشترین میزان تری گلیسرید و کمترین میزان گلوکز در تیمار شاهد به دست آمد ($P < 0/05$). فعالیت لیزوزیم در تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد، به طوری که با افزایش میزان پروتئین آبکافت شده تا سطح ۲ درصد مقدار افزایش یافت و کمترین فعالیت لیزوزیم نیز در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0/05$). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد استفاده از پروتئین آبکافت شده تا میزان ۲ درصد در جیره ماهی قزل آلائی رنگین کمان می‌تواند بر برخی فاکتورهای خونی و سرمی بیان شده موثر بوده و ایمنی ماهی را بهبود بخشد.

کلمات کلیدی: پروتئین آبکافتی، قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ایمنی، سلامت

*نویسنده مسئول

مقدمه

غذاهایی که به طور موثر سبب حفظ سلامتی و بهبود فعالیت های حیاتی شده یا کاهش خطر بیماری را موجب می شوند، اغلب دارای ترکیبات زیست فعال هستند (Diplock et al., 1999). ترکیبات زیست فعال با منشاء دریایی مانند پروتئین آبکافتی، روغن ماهی، کیتوزان، فوکوئیدان و ... حاصل از ماهیان کم مصرف، صید ضمنی، ضایعات ماهیان، سخت پوستان و جلبک های دریایی می باشند (Alamed et al., 2006). تولیدات کل آبزیان شامل ماهیان، سخت پوستان، نرم تنان و گیاهان آبی روند رو به رشدی داشته و در سال ۲۰۱۶ به ۱۷۰/۹ میلیون تن رسیده است، اگرچه صید کاهش یافته است، اما آبی پروری با میزان ۸۰ میلیون تن در سال ۲۰۱۶، نسبت به سال قبل حدود ۵/۲ درصد افزایش داشته است (FAO, 2018). بدیهی است که این مقدار تولید، دارای حجم بالایی از ضایعات شامل فلس، پوست، امعاء و احشاء و استخوان ها و ستون فقرات خواهد بود (Benjakul and Morrissey, 1997). یکی از تکنیک های زیستی جهت استفاده از ضایعات و گونه های کم مصرف و دور ریز ماهیان غنی از پروتئین و مدیریت ضایعات، آبکافت آنزیمی پروتئین های ماهی است که موجب تولید پروتئین آبکافتی با فعالیت زیستی می گردد (اصغرnia و همکاران، ۱۳۹۶). پروتئین آبکافتی ماهی، حاصل از تجزیه آنزیمی و تبدیل پروتئین ها به پپتیدهای کوچکتر است. فعالیت زیستی این پروتئین های آبکافتی شامل فعالیت آنتی اکسیدانی، خواص آنتی میکروبی، کاهش کلسترول و ضد فشار خون بالا می باشد (Samaranayaka and Li-Chan, 2008; Khaled et al., 2012; Chalamaiah et al., 2012; Xiao and Zhong, 2017). این مواد به دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال و کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، قابلیت هضم بالایی دارند و می توانند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان استفاده شوند (Ovissipour et al., 2012a). همچنین مطالعات نشان داده است پپتیدهای حاصل از پروتئین آبکافت شده می تواند محرک فعالیت ایمنی و محرک ماکروفاژی باشد (Gildberg et al., 1996; Bui et al., 2014). آنزیم های مختلفی با منشا گیاهی، جانوری و میکروبی برای آبکافت مورد استفاده قرار می گیرند (Ovissipour et al., 2012a, b) که از این میان آنزیم آلکالا به دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین آبکافتی با درجه آبکافت بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه تر بیشترین توجه را بخود اختصاص داده است (Aspmo et al., 2005). خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به توالی پپتیدها، وزن مولکولی پپتیدها، خواص

شیمیایی و توانایی انتقال الکترون اسیدهای آمینه در توالی وابسته می باشد (Qian et al., 2008). افزایش تولید جهانی قزل آلائی رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی سال های ۲۰۱۶-۲۰۰۸، از ۶۷۳۷۴۱ به ۸۱۴۰۹۱ تن (FAO, 2018) و همچنین تولید این ماهی در ایران طی سال های ۹۵-۱۳۹۱، از ۱۳۱۰۰۰ به ۱۶۵۷۸۷ تن (معاونت برنامه ریزی منابع، ۱۳۹۶)، نشانگر اهمیت این ماهی در تغذیه جهانی و داخل کشور می باشد. به دلیل روی آوردن به پرورش متراکم و افزایش مواجهه با انواع بیماری ها و استرس های محیطی، افزایش مقاومت ماهیان با استفاده از محرک ها و افزودنی های غذایی مورد توجه قرار گرفته است (شیخ زاده و همکاران، ۱۳۸۸). از میان محرک های طبیعی و مصنوعی، محرک های طبیعی با توجه به خصوصیات سلامتی بخش آنها دارای اهمیت است (Citarasu, 2010). غالب محرک های طبیعی مورد استفاده در مطالعات مختلف، با منشا گیاهی می باشد (Zheng et al., 2009) که به دلیل دارا بودن خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی (Velioglu et al., 1998; Lin et al., 2010)، اثرات مفیدی را بر رشد، فاکتورهای خونی، سرمی و ایمنی ماهی در مقابل بیماری ها و استرس های محیطی ایجاد کرده اند (مهدوی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Zheng et al., 2009; Yeganeh et al., 2017). مطالعاتی در ارتباط با تهیه پروتئین آبکافتی و خصوصیات عملکردی اندرونه ماهی قزل آلائی رنگین کمان (ریحانی پول و همکاران، ۱۳۹۵ الف و ب) و ضایعات سایر ماهیان (اویسی پور و همکاران، ۱۳۸۹؛ ریحانی پول و جعفرپور، ۱۳۹۶؛ Benjakul and Morrissey, 1997; Jun et al., 2004; Aspmo et al., 2005; Ovissipour et al., 2009, 2012a,b; Chalamaiah et al., 2012; Taheri et al., 2013; Elavarasan et al., 2014; و استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره ماهیان (Duarte et al., 2006; Hermannsdottir et al., 2009; Bui et al., 2014; Khosravi et al., 2015) انجام شده است، اما تاکنون مطالعه ای با هدف بررسی تاثیر استفاده از پروتئین آبکافتی حاصل از اندرونه قزل آلائی رنگین کمان به عنوان یک افزودنی در جیره غذایی ماهی قزل آلائی رنگین کمان صورت نگرفته است. لذا، در این مطالعه پروتئین آبکافتی از امعاء و احشاء ماهی قزل آلائی رنگین کمان تهیه و وزن مولکولی آن تعیین شد و به دلیل امکان دارا بودن خصوصیات آنتی اکسیدانی و آنتی میکروبی پروتئین آبکافتی با توجه به مطالعات گذشته، از آن به عنوان افزودنی در تغذیه ماهی قزل آلائی رنگین کمان استفاده گردید و اثرات آن بر فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی سرم و فعالیت لیزوزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه پروتئین آبکافتی، تعیین وزن مولکولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا اندرونه (همه اندام‌های داخلی) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و با بافر فسفات با نسبت (2:1v/w) مخلوط و با همزن به مدت ۲ دقیقه هم‌وزن شدند و جهت غیرفعال کردن آنزیم‌های درونی در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. غلظت آنزیم آلکالاز ۱/۵ درصد، دما ۵۵ درجه و pH ۸/۵ در نظر گرفته شد. برای انجام آبکافت به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. در نهایت به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم آلکالاز، نمونه‌ها در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به منظور جداسازی مواد غیرمحلول از پروتئین‌های محلول، توسط سانتریفیوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شدند (۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g). قسمت سوپرناتانت به وسیله سمپلر جدا شد و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009). سوپرناتانت جهت تعیین خصوصیات پروتئین آبکافت شده، لیوفیلیزه (انجماد خشک) گردید. برای تعیین وزن مولکولی پروتئین آبکافتی لیوفیلیزه شده، ابتدا از نمونه پروتئینی، محلول ۱ درصد در آب مقطر دیونیزه تهیه شد و سپس به دستگاه GPC یا کروماتوگرافی ژل تراوایی (Gel Permeation Chromatography) (Agilent 1100) (series) با حلال و فاز متحرک آب دیونیزه دارای ستون PL Aquagel-OH Mixed-H و آشکارساز (RID) Refractive index detector تزریق شد. دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت شویش ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود و کالیبراسیون دستگاه با استفاده از نمونه‌های استاندارد پلی‌اتیلن گلیکول انجام شد (Jun *et al.*, 2004).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی با تعیین قدرت مهار رادیکال DPPH (DPPH¹ free radical-scavenging activity) پروتئین آبکافتی، بر طبق روش Morales و Jimenez-Perez (۲۰۰۱) اندازه‌گیری گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از این نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول DPPH (این محلول به صورت روزانه با غلظت ۷۴ میلی‌گرم بر لیتر اتانول تهیه گردید) مخلوط گردید. این مخلوط برای یک‌ساعت هم زده شد. نمونه در ۱۰۰۰۰ g به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شد و جذب سوپرناتانت در ۵۲۰ نانومتر قرائت شد قدرت مهار رادیکال DPPH (DPPH radical)

scavenging activity) به صورت درصد ناپدید DPPH بیان شد:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (1 - ([\text{DPPH}]_t / [\text{DPPH}]_{\text{H}_2\text{O}}) \times 100)$$

که $[\text{DPPH}]_{\text{H}_2\text{O}}$ = غلظت DPPH در حضور آب به جای پروتئین آبکافتی می‌باشد. مهار رادیکال به صورت AC₅₀ بیان می‌شود که به درصدی از پپتیدها (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد که قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال DPPH می‌باشند.

شرایط پرورش و جیره‌های آزمایشی

تعداد ۲۵۲ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن اولیه ۰/۲۲ ± ۹/۷۴ گرم در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۲۵۰ لیتر در سالن پرورش توزیع شد. در طول دوره‌ی پرورش تعویض آب به صورت روزانه به میزان ۹۰ درصد صورت می‌گرفت. میانگین دما به صورت روزانه بوسیله دماسنج و سایر شاخص‌های کیفی آب از قبیل اکسیژن (اکسیژن‌متر AL15-AQUA LYTIC، ساخت کشور آلمان)، pH (pH AL15-AQUA LYTIC، ساخت کشور آلمان) به صورت هفته‌ای دو بار و TDS، هدایت الکتریکی و شوری (Senciu5-Hach، ساخت کشور آمریکا) هر دو هفته یکبار اندازه‌گیری گردید و به ترتیب ۹/۲۸ ± ۲/۷۰، ۷/۵ ± ۰/۲، ۶۳۱/۱۸ ± ۲۳/۷ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۶ ± ۰/۱۰ گرم بر لیتر و ۱۰۲۱/۱۸ ± ۱۲۳ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود.

آنالیز تقریبی پروتئین آبکافتی و جیره بر اساس روش AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. اندازه‌گیری رطوبت از طریق قراردادن نمونه در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و توزین آن پس از خشک‌شدن در دسیکاتور انجام شد. تعیین مقدار پروتئین با روش کج‌دال و چربی با روش سوکسوله و حلال اتر صورت گرفت. خاکستر نمونه‌ها از طریق سوزاندن نمونه در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و توزین آن صورت گرفت. میزان پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت پروتئین آبکافتی به ترتیب ۷۹/۲۳ ± ۰/۲۸، ۲/۱ ± ۰/۰۵، ۳/۳۸ ± ۰/۵۶ و ۱۴/۳۶ ± ۰/۳۵ درصد به دست آمد و برای جیره شاهد مواد اولیه پودر ماهی، سویا، گلوتن گندم، آرد گندم، آرد

¹ 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ذرت، روغن گیاهی، مکمل ویتامینی^۱، مکمل معدنی^۲ به ترتیب، ۴۰، ۱۹، ۱۰، ۱۰، ۸، ۱۰، ۱/۵ و ۱/۵ درصد استفاده شد و به دلیل تشابه میزان پروتئین در پودر ماهی و پروتئین آبکافتی، پروتئین آبکافتی در سطوح مختلف صفر، ۱/۵، ۱ و ۲ درصد جایگزین پودر ماهی شد. مواد اولیه مورد نیاز برای ساخت هر یک از جیره‌های غذایی وزن شده در ظرف باهم مخلوط شدند و سپس پروتئین آبکافت‌شده به صورت مایع (با محاسبه ماده خشک آن) بر اساس ۱/۵، ۱ و ۲ درصد به آنها اضافه شد. پس از آن روغن گیاهی به مخلوط مواد اضافه شده و برای ۱۵ دقیقه کاملاً با هم مخلوط شدند. سپس آب بتدریج به مخلوط مواد اضافه تا حدی که مخلوط حاصل شکل خمیری بخود گرفت. سپس مخلوط حاصل به کمک چرخ گوشت به صورت رشته‌هایی با قطر ۲ میلی‌متر درآمد. رشته‌های خارج شده از چرخ گوشت در محیط آزمایشگاه با پهن کردن روی روزنامه به مدت دو روز خشک شدند. در زمان خشک شدن رشته‌های غذا بهم زده شدند تا تمام رشته‌ها به‌طور یکنواخت خشک کردند. پس از خشک شدن، جیره‌های غذایی خرد شدند تا اندازه مناسب یابند. ترکیب پروتئین، چربی و خاکستر جیره شاهد بترتیب ۴۵/۶، ۱۶/۴ و ۸/۱، تیمار ۱/۵ درصد پروتئین آبکافتی بترتیب ۴۶/۸، ۱۶/۳ و ۸/۲، تیمار ۱ درصد بترتیب ۴۴/۸، ۱۶/۲ و ۸/۶ و تیمار ۲ درصد بترتیب ۴۵/۶، ۱۶/۴ و ۸/۵ بود (AOAC, 2005). جیره‌های آماده شده در بسته‌های شماره‌گذاری شده و در پلاستیک بسته‌بندی و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همزمان با شروع فعالیت کارگاهی، مقدار غذای مورد نیاز به صورت روزانه از فریزر خارج گردیده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان در طول دوره ۶۰ روزه تا حد سیری، سه بار در روز تغذیه شدند.

بررسی فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی سرم و فعالیت لیزوزیم

در انتهای آزمایش سه قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش (فلاح‌تکار و همکاران، ۱۳۸۵) و خونگیری از ساقه دمی انجام

شد. به منظور بررسی فاکتورهای خونی، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند، تا شمارش گلبول قرمز (RBC) و شمارش گلبول سفید (WBC) بر اساس روش Hoston (۱۹۹۰)، غلظت هموگلوبین (Hb) و میزان هماتوکریت (Hct) بر اساس روش Drabkin (۱۹۴۵)، صورت گیرد. شمارش گلبول قرمز و سفید خون با استفاده از لام هماسیتومتر انجام شد. اندازه‌گیری میزان هماتوکریت خون توسط میکروهماتوکریت صورت گرفت. همچنین میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) بر اساس روابط ذیل محاسبه شد (Yeganeh et al., 2016). بررسی فاکتورهای خونی در همان روز نمونه‌گیری انجام گرفت.

$$(MCV) = (Hct \div RBC) \times 10$$

$$(MCH) = (Hb \div RBC) \times 10; (MCHC) = (Hb \div Hct) \times 100$$

برای اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم، نمونه‌های خون بدون ماده‌ی ضد انعقاد جهت جداسازی سرم سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۶۰۰۰ rpm) شد و شاخص‌های مختلف از قبیل پروتئین تام بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۲)، آلومین بر اساس روش Wotton و Freeman (۱۹۸۲)، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید بر اساس روش Trinder (۱۹۶۹) و فعالیت لیزوزیم بر اساس روش Kumari و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و هر تیمار با سه تکرار انجام شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها از طریق آزمون Shapiro Wilk، تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده به روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS ۱۷ برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

وزن مولکولی پپتیدهای پروتئین آبکافتی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی

میانگین وزن مولکولی پپتیدها (10^3 g mol^{-1} (Dalton)) $1/0.9 \times 10^3$ و میانگین وزنی وزن مولکولی $1/3.0 \times 10^3 \text{ g mol}^{-1}$ به دست آمد. احتمال ۹۰ درصد وزن مولکولی پپتیدهای حاصله 10^3 g mol^{-1} $1/15.6 \times 10^3$ و به احتمال ۵۰ درصد وزن مولکولی پپتیدهای

^۱ هر ۱۰۰ میلی‌گرم پرمیکس ویتامینی حاوی ۱۵۰۰ IU ویتامین A،

۳۰۰۰ IU ویتامین تیامین، ۵ گرم ریبوفلاوین، ۶ گرم نیاسین، ۴ گرم

پیریدوکسین، ۱ گرم اسیدفولیک، ۴ میلی‌گرم سیانوکوبالامین، ۳۰ گرم

ویتامین C، ۳ گرم ویتامین K، ۹ گرم توکوفرول

^۲ هر ۱۰۰ گرم پرمیکس معدنی ۳۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۵۰۰۰ میلی‌گرم

روی، ۱۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰ میلی‌گرم کبالت، ۳۰۰ میلی‌گرم مس،

۲۵۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰ میلی‌گرم کولین کلراید

موجود در نمونه پروتئین آبکافتی $1.0 \times 10^{-3} \text{ g mol}^{-1}$ بود و وزن مولکولی از ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون متغیر بود. بیشترین نسبت وزنی برای وزن مولکولی حدود ۱ کیلودالتون و به میزان تقریبی ۲/۱۷۵ بدست آمد. خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH) پروتئین آبکافتی حاصله از اندرونه قزل آلائی رنگین کمان $1/6 \pm 85$ درصد بود.

فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم

با توجه به داده‌های مربوط به فاکتورهای خونی که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقدار گلبول قرمز و سفید، در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار ۱ و ۲ درصد مشاهده شد که به طور معنی‌داری از تیمار شاهد و ۰/۵ درصد بیشتر بود ($P < 0.05$). میزان هماتوکریت در تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۲ درصد تفاوت معنی‌دار نشان نداد ($P > 0.05$)، اما در تیمار ۱ درصد به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). میزان MCV در تیمارهای شاهد و ۰/۵ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار ۱ و ۲ درصد بود ($P < 0.05$). میزان MCH در تیمارهای مختلف آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان نداد ($P > 0.05$). میزان MCHC در تیمارهای حاوی مکمل پروتئین آبکافتی، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد و در تیمارهای ۱ و ۲ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$). مطابق داده‌های مربوط به فاکتورهای سرمی در جدول ۲،

بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار ۱ درصد مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت ($P < 0.05$). اختلاف معنی‌داری در مقدار آلبومین سرم بین تیمار شاهد و ۰/۵ درصد نبود ($P > 0.05$) و این دو تیمار آلبومین کمتری نسبت به تیمار ۱ و ۲ داشتند ($P < 0.05$). تیمار ۲ به طور معنی‌داری بالاترین مقدار آلبومین را بین تیمارها داشت ($P < 0.05$). میزان تری‌گلیسرید در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود ($P < 0.05$)، کمترین میزان تری‌گلیسرید در تیمار ۱ درصد بدست آمد. بیشترین میزان کلسترول مربوط به تیمار ۲ درصد و کمترین آن مربوط به تیمار ۱ درصد بود. تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند ($P < 0.05$). مقدار گلوکز در تمامی تیمارهای حاوی پروتئین آبکافت‌شده بیشتر از گروه شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$), بیشترین مقدار گلوکز در تیمار ۰/۵ و ۱ درصد و پس از آن در تیمار ۲ درصد بدست آمد ($P > 0.05$).

فعالیت لیزوزیم

در تمامی تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی فعالیت لیزوزیم نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان دادند (جدول ۳)، به‌طوری‌که با افزایش میزان پروتئین آبکافت‌شده تا سطح ۲ درصد مقدار آن افزایش یافت و کمترین فعالیت لیزوزیم در تیمار شاهد مشاهده شد ($P < 0.05$).

جدول ۱: فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان قزل آلائی رنگین کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافتی
Table 1: Hematological parameters of rainbow trout juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

شاخص‌ها	تیمار	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
RBC ($\times 10^6$ در میلی‌متر مکعب)		0.99 ± 0.098^a	0.97 ± 0.30^a	1.00 ± 0.055^a	1.14 ± 0.100^a
WBC ($\times 10^3$ در میلی‌متر مکعب)		17.76 ± 1.79^a	15.20 ± 1.24^a	16.40 ± 1.20^a	16.66 ± 1.61^a
Hb (گرم بر دسی‌لیتر)		7.48 ± 0.37^b	7.59 ± 0.38^b	8.20 ± 0.14^a	8.59 ± 0.27^a
HCT (درصد)		46.75 ± 3.18^a	45.19 ± 4.00^a	37.32 ± 1.92^b	43.75 ± 1.57^a
MCV (فمتولیتر)		$47.5/41 \pm 9.78^a$	$46.5/66 \pm 3.9^a$	$37.0/86 \pm 6.35^b$	$38.3/92 \pm 7.08^b$
MCH (پیکوگرم)		77.85 ± 8.4^a	76.10 ± 2.07^a	80.94 ± 4.28^a	76.59 ± 1.64^a
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)		16.01 ± 0.93^c	17.14 ± 0.93^b	20.53 ± 0.12^a	20.38 ± 0.21^a

اعداد به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار هستند. حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد ($P < 0.05$).

جدول ۲: فاکتورهای سرمی بچه ماهیان قزل آلاي رنگين کمان تغذيه شده با سطوح مختلف پروتئين آبکافتی
Table 2: Serum biochemical parameters of rainbow trout juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

شاخص	تیمار	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
پروتئين تام (گرم بر دسی لیتر)		۶/۴۴±۰/۳۵ ^b	۶/۹۹±۰/۶۸ ^b	۸/۱۷±۰/۵۰ ^a	۷/۲۲±۰/۴۵ ^b
آلبومين (گرم بر دسی لیتر)		۱/۶۳±۰/۰۲۶ ^c	۱/۶۶±۰/۰۳۵ ^c	۱/۷۶±۰/۰۸۱ ^b	۱/۸۶±۰/۰۱۱ ^a
تری گلیسرید (میلی گرم بر دسی لیتر)		۲۲۷/۴۵±۱/۱۵ ^a	۲۱۵/۳۵±۱/۳۰ ^b	۱۴۷/۱۳±۲/۹۰ ^d	۲۱۰/۷۴±۱/۴۰ ^c
کلسترول (میلی گرم بر دسی لیتر)		۱۶۷/۱۲±۸/۶۱ ^d	۱۸۳/۱۷±۲/۴۴ ^c	۸۹/۱۷±۳/۱۷ ^b	۲۳۴/۱۴±۳/۴۳ ^a
گلوکز (میلی گرم بر دسی لیتر)		۸۸/۱۶±۰/۳۳ ^c	۱۳۳/۵۵±۰/۶۶ ^a	۱۳۶/۴۵±۴/۸۰ ^a	۱۲۳/۰۲±۲/۴۴ ^b

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵)

جدول ۳: فعالیت لیوزیم سرم در بچه ماهیان قزل آلاي رنگين کمان تغذيه شده با سطوح مختلف پروتئين آبکافتی
Table 3: Lysosyme amount in rainbow trrou juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

شاخص	تیمار	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
فعالیت لیوزیم		۱۶/۳۳±۱/۱۵ ^c	۲۴/۶۶±۱/۵۲ ^b	۲۷/۶۶±۲/۵۱ ^b	۴۱/۰۰±۳/۶۰ ^a

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت در هر ردیف نشان دهنده اختلاف معنی دار در بین تیمارها می باشد (P<۰/۰۵).

بحث

خاصیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت شده به توالی پپتیدها، وزن مولکولی پپتیدها، خواص شیمیایی و توانایی انتقال الکترون آمینواسیدها در توالی وابسته می باشد (Qian et al., 2008). بنابراین، شرایط آبکافت و نوع آنزیم مورد استفاده با تاثیر بر اندازه پپتیدها و توالی آمینواسیدها در خاصیت آنتی اکسیدانی موثر می باشد. در مطالعه حاضر، آبکافت انجام شده توسط آنزیم آلکالاز توانست پروتئین امعاء و احشاء ماهی قزل آلاي رنگين کمان را بخوبی آبکافت کند و اوزان مختلفی از آن در دامنه ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون در محلول دیده شد که در نتیجه منجر به خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH) $85 \pm 1/6$ درصد شد. در پروتئین آبکافت شده گاوماهی (Zosterisessor *ophiocephalus*) با استفاده از عصاره پروتئاز قلیایی امعاء و احشاء ماهیان مختلف، دامنه وزن مولکولی از زیر ۱۰۰، ۳۰۰-۷۰۰، ۱۰۰-۳۰۰، ۳۰۰-۷۰۰، ۷۰۰-۱۷۰۰، ۱۷۰۰-۳۰۰۰، ۳۰۰۰-۵۰۰۰ و بیش از ۵۰۰۰ دالتون بود. فعالیت آنتی اکسیدانی با اندازه پپتیدها نسبت عکس یعنی با کاهش اندازه پپتیدها (کمتر از ۳۰۰ دالتون) زیاد و با افزایش اندازه پپتیدها (بیش از ۷۰۰ دالتون) کاهش یافت، ولی با درجه آبکافت نسبت مستقیم داشت. بیشترین فعالیت آنتی اکسیدانی ۶۴/۸ و ۵۵ درصد و بیشترین درجه آبکافت ۲۸/۴ درصد بود (Nasri et al., 2013).

تعیین وزن مولکولی پپتیدهای حاصله از عضله ماهی northern whiting fish (*Sillago sihama*) با استفاده از آنزیمهای پپسین، تریپسین و آلفا کیموتریپسین با روش sodium

gel electrophoresis (SDS-PAGE)

بین ۳/۵-۴۵ کیلودالتون بوده است (Venkatesan and Nazeer, 2014). در این مطالعه نیز بیشترین خاصیت آنتی اکسیدانی در پروتئین آبکافت شده با بیشترین درجه آبکافت بدست آمد. در مطالعات مختلف ارتباط سینرجیستی مستقیمی بین زمان هضم پروتئین، درجه آبکافت و خاصیت آنتی اکسیدانی گزارش شد (Wu et al., 2003; Tanzadehpanah et al., 2012; Ko et al., 2013; Venkatesan and Nazeer, 2014). پروتئینهای آبکافتی خاصیت آنتی اکسیدانی قابل ملاحظه ای دارند (Klompong et al., 2007; Elavarasan et al., 2014). و در بعضی مواقع با آنتی اکسیدانهای سنتتیک مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHT) و بوتیل هیدروکسی تولون (BHT) برابری می کنند (Elavarasan et al., 2014). فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئینهای آبکافت شده به نوع پروتئاز (Jun et al., 2004; Elavarasan et al., 2014) و شرایط آبکافت بستگی دارد (Jao and Ko, 2002; Jun et al., 2004); و در طول آبکافت بسته به نوع آنزیم استفاده شده، دامنه وسیعی از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک روی خواص آنتی اکسیدانی پروتئینهای آبکافتی اثرگذارند (Wu et al., 2003). در مطالعه Klompong و همکاران (۲۰۰۷) خاصیت آنتی اکسیدانی پودر حاصله از آبکافت گوشت ماهی *Selaroids leptolepis* با آنزیم آلکالاز و فلاورازیم در درجه های مختلف آبکافت بررسی و مشخص شد که آنزیمهای مختلف و درجه های

ساخت آن، از دست رفتن از طریق اوره یا مدفوع و نیز افزایش کاتابولیسم آن باشد (Nguyen, 1999). افزایش آلبومین می‌تواند به علت افزایش تولید آن در کبد بواسطه تغییر در جیره غذایی باشد (Abdel-Tawwab et al., 2007; Acar et al., 2015) که در این مطالعه نتایج بدست آمده افزایش آلبومین را نشان داد. نتایجی که در مورد کلسترول بدست آمد نیز احتمالاً به دلیل اثر کاهش‌دهنده کلسترول توسط پروتئین آبکافتی بود (Kotzamanis et al., 2007).

لیزوزیم یکی از ترکیبات عمده در سیستم دفاع ایمنی مهره‌داران و بی‌مهرگان می‌باشد (Song et al., 2006). لیزوزیم به عنوان یکی از عوامل ایمنی غیر اختصاصی در برابر انگل‌ها، باکتری‌ها و عفونت‌های ویروسی عمل می‌کند و میزان آن در خون ماهیان، هنگامی که علیه عفونت فعالیت می‌کنند، بالا می‌رود (Puangkaew et al., 2004). غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد از پروتئین ماهی آبکافت‌شده در ماهی شوریده زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea* R.) توانست فعالیت لیزوزیم و کمپلمان‌های سرم، و غلظت ایمونوگلوبین M را افزایش دهد (Tang et al., 2008). همچنین در ماهی سی‌باس ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) نیز این افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان‌ها در سطوح میانه (۱۵ درصد) دیده شد (Liang et al., 2006). در مطالعات قبل، عملکردهای زیستی پروتئین‌های آبکافت‌شده را به عنوان پپتیدهای زیست‌فعال معرفی شدند (Gildberg et al., 1996; Harnedy and FitzGerald, 2012). سیستم ایمنی ماهیان می‌تواند با استفاده از مکمل‌های پروتئینی آبکافت‌شده تقویت شود (Kotzamanis et al., 2013; Zheng et al., 2007) و استفاده از پروتئین‌های آبکافت‌شده می‌تواند پاسخ ایمنی غیر اختصاصی را در ماهیان افزایش دهد. تغذیه ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) با ارگانوسم‌های غذایی زنده غنی‌شده با پپتیدها، تولید لیزوزیم و کمپلمان‌ها را تحریک می‌کند (Hermannsdottir et al., 2009). اثر مثبت معنی‌دار چندین نوع پروتئین آبکافت‌شده بر سیستم ایمنی ماهی سالمون و تریوت گزارش شده است (Murray et al., 2003; Zheng et al., 2012). وجود پروتئین آبکافت‌شده در جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش فعالیت لیزوزیم شد و لذا، نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات پیشین در فعالیت لیزوزیم همخوانی داشت. بهبود عملکرد ایمنی سلولی و خونی در مطالعات قبلی گزارش شده است (Kotzamanis et al., 2003; Liang et al., 2006; Murray et al., 2007). با این وجود، شواهد مستدلی برای حمایت از این چنین ادعایی وجود ندارد که اثرات تحریک ایمنی از طریق پروتئین‌های

مختلف آبکافت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (chelating activity, DPPH radical-scavenging activity, reducing power, metal-chelating activity) متفاوت می‌باشد و با افزایش درجه آبکافت با آنزیم آلکالاز DPPH radical-scavenging activity و reducing power کاهش یافت، اما تفاوت معنی‌داری در پروتئین آبکافت شده توسط فلاورزایم مشاهده نشد. در درجه هیدرولیز پایین پروتئین آبکافتی حاصل از آلکالاز خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH radical-scavenging activity) بیشتر و در درجه هیدرولیز بالا پروتئین آبکافتی حاصل از فلاورزایم خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH radical-scavenging activity) بیشتری نشان داد. پارامترهای خونی به‌عنوان شاخص‌های زیستی ارزشمندی هستند که نشان‌دهنده پاسخ به تنش‌های فیزیولوژیک و همچنین وضعیت سلامت عمومی می‌باشد (Rey Vázquez and Guerrero, 2007; Siwicki et al., 1994). Kader و همکاران (۲۰۱۱) و Bui و همکاران (۲۰۱۴) نشان داد که وجود پروتئین‌های آبکافتی اثر معنی‌دار منفی بر پارامترهای خونی ماهیان نوجوان سی‌بریم قرمز (*Pagrus major*) ندارد که این نشان‌دهنده تغذیه و شرایط محیطی خوب ماهیان می‌باشد. بنابراین، احتمال می‌رود که پروتئین‌های ماهیان حاوی مقادیر زیادی از توالی‌های زیست‌فعال است که می‌تواند بر شاخص‌های ایمنی خونی موثر باشد (Duarte et al., 2006). پروتئین تام و گلوکز با افزودن پروتئین آبکافتی در سرم بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش یافت و افزودن پروتئین آبکافتی (غلظت ۱ درصد) میزان تری‌گلیسرید، کلسترول و سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کمترین میزان خود بود که نشان‌دهنده کاهش این فاکتورها در سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. آبکافت آنزیمی پروتئین‌ها ممکن است منجر به تشکیل پپتیدهای زیست‌فعال شود (Korhonen and Pihlanto, 2006; Kotzamanis et al., 2010; Kim and Wijesekara, 2007) که دارای خواص فیزیکی و شیمیایی متعدد و فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خواص ایمنی و ضدباکتریایی می‌باشد که بستگی به وزن مولکولی و توالی آمینواسید دارد (Venkatesan and Nazeer, 2014; Kim and Mendis, 2006). ارزیابی پروتئین تام، آلبومین و گلوبولین به‌عنوان شاخص‌های مهم در پاسخ به استرس‌های محیطی می‌باشد، در شرایط استرس، ترکیبات اکسیداتیو به عنوان اصلی‌ترین اندام‌های سازنده آلبومین و گلوبولین، در کبد و کلیه سبب آسیب شده و میزان آنها را کاهش می‌دهند (Banaee et al., 2011; Pascual et al., 2003). آلبومین پایین می‌تواند در نتیجه وجود مشکل در

شیخزاده، ن.، سلطانی، م.، ابراهیمزاده موسوی، ح.، خسروی، ع.، باقری، ه.، فتحی، ع. و زرگر، ا. ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۶۴(۱): ۴۷-۵۴.

فلاحکار، ب.، سلطانی، م.، ابطی، ب.، کلباسی، م.ر.، پورکازمی، م. و یاسمی، م. ۱۳۸۵. تاثیر ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد، نرخ بازماندگی و شاخص کبدی در فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. *پژوهش و در امور دام و آبزیان*، ۱۹ (۳): ۹۸-۱۰۳.

معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۱-۱۳۹۵، انتشارات شیلات ایران، ۶۴ صفحه.

مهدوی، س.، یگانه، س.، فیروزبخش، ف. و جانی خلیلی، خ. ۱۳۹۵. اثرات اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم و مقاومت به استرس شوری در بچه‌ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*). *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۵ (۴): ۱-۱۷.

Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A. and Abbass, F.E. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, (*Clarias gariepinus*) (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture*, 272 (1): 335-345. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.004

Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yilmaz, S., Gültepe, N. and Türker, A. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437: 282-286. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.015

Alamed, J., McClements, D.J. and Decker, E.A. 2006. Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. *Journal of Food Chemistry*, 95(4): 585-590. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.041

آبکافت‌شده می‌تواند به عنوان بخش بالقوه‌ای از جیره برای ارتقاء مقاومت در برابر بیماری در ماهیان باشد (Khosravi et al., 2015).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه، افزودن پروتئین آبکافتی تهیه شده از اندرونه (امعاء و احشاء) ماهی می‌تواند تا میزان ۲ درصد فاکتورهای خونی هموگلوبین، هماتوکریت، MCV و MCHC و بر شاخص‌های سرمی پروتئین تام، آلبومین، تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز موثر بوده و ایمنی لیزوزوم را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهبود بخشد.

منابع

اصغر نیا، م.، یگانه، س.، جعفرپور، س.، و صفری، ر. ۱۳۹۶. استفاده از روش شیمیایی به منظور تولید پروتئین آبکافت‌شده از امعاء و احشاء فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) و استفاده از آن به عنوان محیط کشت *Listeria monocytogenes* *مجله علمی شیلات ایران*، ۲۶(۳): ۱۱-۲۳.

اویسی‌پور، م.ر.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع. و نظری، ر.م. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله با استفاده از آنزیم‌های تجاری (*Thunnus albacares*). *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، ۶(۱): ۶۸-۷۶.

ریحانی‌پول، 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*، ۶۸ (۱۴): ۱۱۳-۱۲۴.

ریحانی‌پول، س.، جعفرپور، س.ع. و صفری، ر. و ۱۳۹۵ الف. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نتوتراز. *نشریه پژوهش‌های علوم صنایع غذایی ایران*، ۱۴: ۱۶۲-۱۷۶.

ریحانی‌پول، س.، جعفرپور، س.ع. و صفری، ر. ۱۳۹۵ ب. خواص کارکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش آنزیمی. *مجله علوم و فنون شیلات*، ۵(۴): ۱۳-۲۸.

- AOAC. 2005.** *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G. 2005.** Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, 40(5): 1957-1966. DOI: 10.1016/j.procbio.2004.07.011
- Banaee, M., Surede, A., Mirvaghefi, A.R. and Rafei, G.R. 2011.** Effects of longterm siltymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 887-896. DOI: 10.1007/s10695-011-9486-z.
- Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997.** Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9): 3423-3430. DOI: 10.1021/jf970294g
- Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M. and Lee, K.J. 2014.** Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418: 11-16. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.046
- Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. 2012.** Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Journal of Food Chemistry*, 135(4): 3020-3038. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100.
- Citarasu, T. 2010.** Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3): 403-414.
- Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. and Roberfroid, M.B. 1999.** Scientific concept of functional foods in Europe, *Consensus document. British Journal of Nutrition*, 81(1): 1-27.
- Drabkin, D.L. 1945,** January. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin-a proposal for the standardization of hemoglobin. In *American journal of the medical sciences* (vol. 209, no. 2, pp. 268-270). 227 east washington sq, philadelphia, pa 19106: lippincott williams & wilkins.
- Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdígón, G. and Matar, C. 2006.** Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211(5): 341-350. DOI:10.1016/j.imbio.2005.12.002.
- 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
- FAO, 2018.** The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization 414 of the United Nations. Pp. 108.
- Gildberg, A., Bøgwald, J., Johansen, A. and Stenverg E. 1996.** Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114B: 97-101. DOI: 10.1016/0305-0491(96)00011-9
- Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J. 2012.** Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4: 6-24. DOI: 10.1016/j.jff.2011.09.001
- Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B.K. and Bjornsdottir, R. 2009.** Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development,

- innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish and shellfish immunology*, 27(5): 595-602. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.05.007
- Hoston, A.H. 1990.** Blood and circulation. In: Shreck CB, Moyle PB. *Methods in fish biology*. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 273-335.
- Jao, C-L. and Ko, W-C. 2002.** 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2): 430-435. DOI:10.1046/j.1444-2906.2002.00442.x.
- Jun, Sh-Y., Park, P-J., Jung, W-K. and Kim, S-K., 2004.** Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219(1): 20-26. DOI:10.1007/s00217-004-0882-9.
- Kader, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M., Honda, Y., Mamauag, R.E. and Laining, A., 2011.** Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and element composition of juvenile red sea bream (*Pagrus major*) fed with fermented soybean meal and scallop by-product blend as fishmeal replacement. *Fisheries Science*, 77: 119-128. DOI: 10.1007/s12562-010-0312-9
- Khaled, H.B., Ghilissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M.A., Barkia, A., Sahnoun, Z. and Nasri, M., 2012.** Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International*, 45(1): pp.60-68. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.10.003
- Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V, Kim, S, Jeong, J. and Lee, K.-J. 2015.** Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 435: 371-376. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.019
- Kim, S.-K. and Mendis, E. 2006.** Bioactive compounds from marine processing byproducts — a review. *Food Research International*, 39: 383-393. Doi: 10.1016/j.foodres.2005.10.010
- Kim, S.-K. and Wijesekara, I. 2010.** Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*, 2: 1-9. DOI: 10.1016/j.jff.2010.01.003
- Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007.** Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4): 1317-1327. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.016
- Ko, J-Y., Lee, J-H., Samarakoon, K., Kim, J-S. and Jeon, Y-J. 2013.** Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52:113-120. DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.058
- Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006.** Review: bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945-960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012
- Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Infante, J.Z. and Cahu, C. 2007.** Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to *Vibrio anguillarum* in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular*

- and Integrative Physiology, 147(1): 205-214. Doi: 10.1016/j.cbpa.2006.12.037
- Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K. and Mohanty, B.R. 2006.** Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture, 252(2-4): 121-127. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.025
- Liang, M., Wang, J., Chang, Q. and Mai, K. 2006.** Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, (*Lateolabrax japonicus*) (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquaculture Research, 37: 102-106. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2005.01392.x
- Lin, C-M., Sheu, S-R., Hsu, S-C. and Tsai, Y-H. 2010.** Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. Food Control, 21: 1710-1715. Doi: 10.1016/j.foodcont.2010.06.008
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1952.** Protein measurement with folin phenol reagent. Biological Chemistry, 193-256.
- Morales, F.J. and Jimenez-Perez, S. 2001.** Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chemistry, 72 (1): 119-125. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00239-9
- Murray, A.L., Pascho, R.J., Alcorn, S.W., Fairgrieve, W.T., Shearer, K.D. and Roley, D. 2003.** Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 220: 643-653. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00426-X
- Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Nasri, M. and Karra-Châabouni, M. 2013.** ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterisessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. Food Research International, 54: 552-561. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.07.001
- Nguyen, H.T. 1999.** Transport proteins, In: Loeb, W.F., Quimby, F.W. (Eds.), The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, Second Edition. Taylor and Francis, Philadelphia, PA, USA, pp. 309-335.
- Ovissipour, M., Safari R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E. and Mola. A.E. 2009.** Use of hydrolysates from yellowfin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research, 1: 73-77.
- Ovissipour, M., Kenari A.A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M. 2012a.** Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioprocess Technology, 5: 696-705. DOI: 10.1080/10498850.2010.548910
- Ovissipour, M., Safari R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B. 2012b.** Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food and Bioprocess Technology, 5: 460-465. Doi: 10.1007/s11947-009-0284-x
- Pascual, P., Pedrajas, J.R., Toribio, F., LópezBerea, J. and Peinado, J. 2003.** Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chemico-Biological Interactions, 145: 191-199. DOI: 10.1016/S0009-2797(03)00002-4
- Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. and Watanabe, T. 2004.** Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*W) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids.

- Fish and Shellfish Immunology, 16 (1): 25-39. DOI:10.1016/S1050-4648(03)00028-7.
- Qian, Z.J., Jung, Q.K. and Kim, S.K. 2008.** Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresource Technology, 99: 1690–1698. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.005
- Rey Vázquez, G. and Guerrero, G.A. 2007.** Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell, 39: 151-160. Doi: 10.1016/j.tice.2007.02.004
- Samaranayaka, A.G. and Li-Chan, E.C. 2008.** Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*). Journal of Food chemistry, 107(2): 768-776. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.076
- Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994.** Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 125-139. DOI: 10.1016/0165-2427(94)90062-0
- Song, Z., Wu, T., Cai, L., Zhang, L. and Zheng, X., 2006.** Effects of dietary supplementation with *Clostridium butyricum* on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. Journal of Zhejiang University Science, B, 7(7): 596-602. DOI:10.1631/jzus.2006.B0596.
- Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari H. and Fogliano, V. 2013.** Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(1) 154-169.
- Tang, H.G., Wu, T.X., Zhao, Z.Y. and Pan, X.D. 2008.** Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Journal of Zhejiang University Science, B, 9(9): 684-690. DOI: 10.1631/jzus.B0820088.
- Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A. and Chamani, J. 2012.** An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. Food Research International, 49: 105–111. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.08.022
- Trinder, P. 1969.** Determination of glucose concentration in the blood. Ann. Clin. Biochem, 6, p.24.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. 1998.** Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10): 4113-4117. DOI: 10.1021/jf9801973
- Venkatesan, K. and Nazeer, R.A. 2014.** Antioxidant activity of purified protein hydrolysates from northern whiting fish (*Sillago sihama*) muscle. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 20: 209–219. DOI: 10.1007/s10989-013-9384-6
- Wotton, I.D. and Freeman, H. 1982.** Microanalysis in Medical Biochemistry. Churchill, New York, USA
- Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. 2003.** Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949–957. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00104-2
- Xiao, J. and Zhong, Q. 2017.** Suppression of retrogradation of gelatinized rice starch by anti-listerial grass carp protein hydrolysate. Food Hydrocolloids, 72: 338-345. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.06.016
- Yeganeh, S., Adel, M., Ahmadvand, Sh., Ahmadvand, Sh. and Velisek, J., 2016.**

- Toxicity of organic selenium (Selemax) and its effects on haematological and biochemical parameters and histopathological changes of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). *Toxin Reviews*, 207-213. DOI:10.1080/15569543.2016.1213749.
- Yeganeh, S., Sotoudeh, A. and Movaffagh, A.N. 2017.** Effects of *Tribulus terrestris* extract on growth and reproductive performance of male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17: 1003–1007. DOI: 10.4194/1303-2712-v17_5_15
- Zheng, Z.L., Tan, J.Y. W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X. and Wang, K.Y. 2009.** Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant effect and resistance against *Aeromonas hydrophila* in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Aquaculture*, 229: 214–218. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.04.025
- Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J. and Chang, Q. 2012.** Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I level of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture Nutrition*, 18: 297-303. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00896.x
- Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J. and Chang, Q. 2013.** Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmus maximus* L.). *Aquaculture Research*, 44: 895–902. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03094.x

Effects of dietary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera protein hydrolysate on some hematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout juvenile

Javaherdoust Sh.¹; Yeganeh S.^{1*}; Keramat Amirkolaie A.¹

*skyeganeh@gmail.com

1- Department of Fisheries, Faculty of Animal Sciences and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.

Abstract

The aim of this study was to prepare rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) visceral protein hydrolysate (VPH), determine the peptide molecular weight and using rainbow trout visceral protein hydrolysate in diet of rainbow trout juvenile to investigate its effects on some hematological and blood serum biochemical parameters. The viscera of rainbow trout were hydrolyzed by alcalase enzyme and Antioxidant activity of protein hydrolysate was obtained 85 ± 1.6 %. The protein hydrolysate was used for the second phase of the experiment. For this purpose, four diets were prepared including VPH free as the control and three diets with 0.5, 1, and 2 percent VPH inclusions. Juvenile rainbow trout ($n = 252$; 9.74 ± 0.22 g) were randomly distributed in the treatments (with three replicates) and fed with the prepared diets based on satiation, 3 times a day for 60 days. Peptide molecular weight ranged from 700 D to 2 KD. Final evaluated parameters were hematological (RBC, hemoglobin, hematocrit, WBC, MCV, MCH and MCHC), serum biochemical (total protein, albumin, glucose, cholesterol and triglyceride) indices and lysosyme. Increasing the VPH up to 2 % caused to increase hemoglobin ($P < 0.05$). RBC and WBC showed no significant differences among treatments ($P > 0.05$). The lowest hematocrit was observed in 1 % treatment ($P < 0.05$). The highest amounts of albumin and cholesterol were observed in 2 % treatment and the highest amount triglyceride and the lowest amount of glucose were observed in control group ($P < 0.05$). All VPH-containing treatments had higher amount Lysosyme activity than control as such with increasing VPH up to 2 % caused to increase the lysosyme activity and the lowest amount of that was observed in control ($P < 0.05$). The results indicate that a diet containing 2 % of VPH cause to affect on some mentioned haematological and serum biochemical parameters and could improve immunity in juvenile rainbow trout.

Keywords: Protein hydrolysate, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Immunity, Health

*Corresponding author