

## پایداری میکروکپسول تولید شده از روغن ماهی کیلکا با استفاده از خواص عملکردی هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*)

سید حسن جلیلی<sup>۱</sup>، رضا فرهوش<sup>۱\*</sup>، آرش کوچکی<sup>۱</sup>، عباسعلی مطلبی<sup>۲</sup>

\*rfarhoosh@um.ac.ir

- ۱- گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران.
- ۲- پژوهشکده آبی‌پروری آبهای داخلی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور، سازمان تحقیقات آموزش و ترویج کشاورزی، بندر انزلی، ایران.
- ۳- سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، وزارت جهاد کشاورزی، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷

تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

### چکیده

پوست ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) به عنوان پسماند فرآوری در کارخانه‌های تولید فرآورده‌های گوشت چرخ‌شده، با بهایی پایین در دسترس می‌باشد. روغن ماهی کیلکا (جنس *Clupeonella*) نسبت به روغن سایر ماهیان دریای خزر دارای امگا-۳ بیشتر و ارزش غذایی بالاتر می‌باشد. در پژوهش حاضر، پوست کپور نقره‌ای جمع‌آوری و پس از هیدرولیز با آنزیم آلکالاز، خواص عملکردی آن جهت پایداری میکروکپسول تولید شده از روغن خالص شده کیلکا در pH های ۳/۴ و ۶/۸ بررسی شد. نتایج نشان داد تغییرات میزان اسیدهای آمینه پس از ۶ ساعت هیدرولیز قابل ملاحظه بود ( $p < 0.05$ ). مجموع اسیدهای آمینه آبگریز از ۳۲/۰۸ درصد در زمان ۰/۲۵ ساعت به ۲۴/۸۸ درصد پس از ۶ ساعت هیدرولیز رسید. فعالیت مهارکنندگی رادیکال دی‌فنیل‌پیکریل‌هیدرازیل (DPPH) و قدرت احیای آهن محلول‌های هیدرولیزی، طی ساعت اول افزایش قابل توجهی داشت، در ۴ ساعت به اوج رسید و پس از آن به آرامی کاهش یافت. پایداری امولسیون در برابر دو فاز شدن و تشکیل خامه در pH ۶/۸ نسبت به pH ۳/۴ بیشتر بود و اختلاف معنی‌داری را در غلظت‌های ۲ تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر محلول هیدرولیزی نشان داد ( $p < 0.05$ ). به عنوان یک نتیجه کلی، استفاده از عمل هیدرولیز پوست کپور نقره‌ای و نقش آنتی‌اکسیدانی آن در تولید امولسیون‌های پایدار حاوی میکروکپسول‌های روغن کیلکا، پروسه‌ای با ارزش جهت غنی‌سازی انواع غذاها می‌باشد.

**لغات کلیدی:** پوست ماهی کپور نقره‌ای، روغن ماهی کیلکا، هیدرولیز آنزیمی، خواص عملکردی، پایداری امولسیون

\*نویسنده مسئول

## مقدمه

پروتئین‌ها، منبع مهمی از پپتیدهایی با فعالیت زیستی هستند که درون توالی پروتئین مادری، غیرفعال می‌باشند. اما هنگامی که پپتیدهای زیست‌فعال آزاد می‌گردند قادرند عملکردهای مختلفی مانند خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی و شبه هورمونی از خود بروز دهند (Tahergorabi et al., 2012). بر اساس مطالعات سال‌های اخیر، پپتیدهای حاصل از ژلاتین ماهی در مقایسه با پپتیدهای به دست آمده از پروتئین گوشت، به دلیل داشتن درصد بالاتری از اسیدهای آمینه‌ای چون گلیسین و پرولین، فعالیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری را نشان می‌دهند. در واقع، ترکیب و توالی اسیدهای آمینه، تعیین‌کننده خواص عملکردی پپتیدها می‌باشد که به منشاء پروتئین، شرایط آماده‌سازی و توزیع وزن مولکولی محصولات هیدرولیز شده بستگی دارد (Gómez-Guillén et al., 2011). همچنین، نوع آنزیم و شرایط هیدرولیز آنزیمی شامل نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، زمان و pH می‌توانند بر طول زنجیره پپتیدها (۲۰-۲ اسید آمینه) و خواص عملکردی هیدرولیزهای پروتئینی موثر باشند (Chi et al., 2014). علاوه بر فعالیت‌های زیستی پپتیدها، پروتئین‌ها با کاهش کشش سطحی باعث ایجاد لایه ویسکوالاستیکی شده و از به هم پیوستن قطرات روغن جلوگیری می‌کنند (Dickinson, 2006). بنابراین نقش آن‌ها در تشکیل و پایداری امولسیون متفاوت است و به ساختمان، آرایش فضایی، و حالت تجمع‌ی بستگی دارد. آنزیم آلکالاز به دلیل اندوپپتیداز بودن و پایداری در برابر تغییرات pH، آزادسازی پپتیدها با قابلیت بازدارندگی اکسایش روغن‌ها و قیمت نسبتاً پایین، گزینه مناسبی برای تولید صنعتی هیدرولیزهای پروتئینی معرفی شده است (Alemán et al., 2011, Dong et al., 2008, Yi et al., 2017). از سوی دیگر، انتخاب ترکیبات مواد دیواره‌ای میکروامولسیون‌ها بر خواص امولسیون و ویژگی‌های ذرات طی زمان نگهداری بسیار موثر است (Jafari et al., 2008). زیرا ریزپوشانی صحیح، منجر به حداقل رسیدن روغن سطحی و حداکثر بازماندگی ماده فعال می‌گردد (Carneiro et al., 2012). همچنین

مطالعات نشان داده است که با مصرف انواع مختلف غذاهای غنی شده با روغن ماهی، غلظت اسیدهای چرب چند غیر اشباع (PUFA) جمع شده در لیپیدهای پلاسما، ۱۰ برابر بالاتر از کپسول‌های رایج روغن ماهی است (Mu, 2008). بنابراین توسعه روش‌هایی برای بهبود قابلیت دسترسی PUFA ها در صنعت غذا، امری حیاتی است (Carneiro et al., 2012).

ماهی کیلکا از جمله ذخایر ارزشمند و از گونه‌های مهم شیلاتی دریای خزر به شمار می‌رود که متأسفانه به دلیل ریزپیکر و استخوانی بودن از بازارپسندی مناسبی برخوردار نیست و در زمره ماهیان صنعتی قرار می‌گیرد. روغن ماهی کیلکا نیز نسبت به روغن سایر ماهیان، دارای نسبت امگا ۳ به امگا ۶ بیشتری است و مصرف مستمر آن‌ها به سلامت انسان کمک می‌کند (Pirestani et al., 2010). به همین دلیل امروزه روغن ماهی وارداتی به اشکال مختلف با بسته‌بندی و نام‌های تجاری متنوع در داروخانه‌ها به عنوان دارو و یا مکمل‌های رژیمی در دسترس عموم است و به رغم گرانی از استقبال خوبی نیز برخوردار می‌باشد. در حال حاضر بیش از ۲۰۰ هزار تن ماهیان گرمابی در استان‌های مختلف ایران پرورش داده می‌شود که بیش از ۵۰ درصد آن را ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) تشکیل می‌دهد (سامانه سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۷). طی دو دهه گذشته با احداث کارخانجات جدید و استفاده از ماشین آلات مدرن، بخشی از این ماهیان به گوشت چرخ‌شده و فرآورده‌های فرموله آماده طبخ نظیر ناگت تبدیل می‌شوند و بخش قابل ملاحظه‌ای از فرآورده‌های جانبی این آبرزی تولید می‌گردد. مجموع پوست و استخوان باقیمانده پس از گوشتگیری با دستگاه استخوانگیر برای ماهی کپور نقره‌ای با میانگین وزن یک کیلوگرم، حدود ۲۰ درصد است. پوست شستشو و تمیز شده حدود ۳/۵ درصد از وزن کل لاشه را شامل می‌شود (جلیلی، ۱۳۹۰). عدم استفاده و یا استفاده ناکارآمد از این مواد، علاوه بر هدررفت سرمایه‌ها و منابع غنی تغذیه‌ای، مشکلات زیست‌محیطی و بهداشتی را در پی دارد.

با توجه به مطالب فوق، در پژوهش حاضر سعی گردید پس از هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای با آنزیم آلکالاز، تغییر ترکیب اسیدهای آمینه و خواص ضد اکسایشی پپتیدهای حاصل در آن‌ها، سنجش گردد و سپس از بهترین تیمار، در پایداری امولسیون روغن ماهی کیلکای ریزپوشانی شده، استفاده و مورد ارزیابی قرار گیرد.

### مواد و روش کار

آنزیم آلکالاز حاصل از *Bacillus licheniformis* (2.4 L)، مالتودکسترین (DE= 4.0-7.0)، و ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) از شرکت سیگما (Sigma Chemical Co.; St. Louis, MO, USA) خریداری گردید. سایر مواد شیمیایی لازم در این مطالعه، از شرکت مرک (Merck, Darmstadt, Germany) و با درجه آزمایشگاهی تهیه گردید. روغن خام ماهی کیلکا به صورت کاملاً تازه از شرکت آرد ماهی تدبیر در شهرستان بندر انزلی تهیه شد.

### تهیه ماهی و آماده سازی

ماهیان کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) در یک نوبت، به صورت تازه با وزن ۱۳۰۰-۹۳۰ گرم از مزرعه پرورش ماهیان گرمابی اطراف شهرستان رشت، استان گیلان خریداری گردید. درون جعبه‌های عایق با نسبت ۱ به ۲ ماهی به یخ، به بخش تحقیقات فرآوری آبزیان پژوهشکده آبی‌پروری آب‌های داخلی - بندر انزلی منتقل شد. ابتدا فلس و سپس پوست ماهی‌ها به صورت دستی جدا گردید. پوست‌ها با آب شرب خنک و با استفاده از بُرس تا جداسازی کامل گوشت‌های باقی‌مانده، تمیز شدند. سپس به قطعات ۵ سانتی‌متری برش خورده و تا زمان آزمایش درون فریزر (۱۸- درجه سلسیوس) نگهداری شدند.

### پالایش روغن خام ماهی کیلکا

پالایش و حذف ناخالصی‌های روغن خام ماهی کیلکا با استفاده از کروماتوگرافی ستونی چندلایه (آلومینا-سیلیکاژل فعال شده)، طبق روش گزارش شده توسط پژوهان‌مهر (۱۳۹۵)، با اصلاحات جزئی، انجام شد. انتهای

ستون شیشه‌ای کروماتوگرافی با قطر داخلی ۳ سانتیمتر و طول ۶۰ سانتیمتر به ارلن بوخنر متصل به پمپ خلا وصل گردید. پس از پر کردن یکنواخت ستون به ترتیب با ۶۰ گرم آلومینا و ۸۰ گرم سیلیکاژل، صد گرم روغن خام ماهی کیلکا از ستون عبور داده شد. بالای ستون، بادکنکی حاوی گاز ازت متصل گردید. اطراف آن و همچنین ارلن بوخنر با ورقه آلومینیومی پوشانیده شد. با قرار دادن ارلن در ظرف حاوی یخ خرد شده، خنک گردید. روغن خروجی از ستون، بلافاصله درون لوله‌های درپوش‌دار، با تزریق گاز ازت، بسته‌بندی و در تاریکی و دمای ۱۸- درجه سلسیوس نگهداری گردید.

### هیدرولیز آنزیمی پوست ماهی کپور نقره‌ای

پوست کپور نقره‌ای قبل از هیدرولیز به روش Ketnawa و همکاران، (۲۰۱۷) با اندکی اصلاح، پیش‌تیمار گردید. خیساندن اولیه با استفاده از NaOH (۰/۱ مولار) و نسبت پوست به قلیای ۱ به ۸ در دمای  $4 \pm 1$  درجه سلسیوس، به مدت ۳ ساعت انجام شد. مخلوط به‌صورت دوره‌ای و ملایم هم‌زده شد. پوست قلیایی شده با آب شرب، چندین مرتبه آبکشی شد تا pH آب شستشو به کمتر از ۷/۵ برسد. سپس خیساندن در اسید استیک (۰/۱ مولار) با همان نسبت پوست به اسید در دمای محیط به مدت ۲ ساعت انجام شد. پوست تیمار شده با اسید تا خنثی شدن آب خروجی، همانند مرحله قبل کاملاً شستشو گردید. پوست شفاف و متورم شده در این مرحله در خشک‌کن انجمادی (OPERON, OPR-FDB-5503, Korea) تا رطوبت کمتر از ۱۰ درصد، خشک شد. هنگام هیدرولیز، در آب مقطر با نسبت ۱ به ۲۰ (وزنی/ حجمی) در طول شب در دمای یخچال خیسانده شد. پس از این زمان، آن‌ها توسط همزن دستی تیغه‌ای (گوشت‌کوب برقی شرکت فیلیپس) کاملاً همگن شدند. pH آن به کمک محلول هیدروکسید سدیم (۰/۱ نرمال) بالاتر از ۷/۰ تنظیم و قبل از افزودن آنزیم، دمای آن به ۵۰ درجه سلسیوس رسانده شد. پروتئولیز با آنزیم آلکالاز (یک درصد) به مدت ۶ ساعت با هم‌زدن مستمر ملایم انجام شد. پس از ۳ ساعت، مجدد آنزیم به محلول اضافه گردید. ۶۹

$A_{\text{control}}$  = مقدار جذب شاهد بدون نمونه و  $A_{\text{sample}}$  =  
مقدار جذب نمونه‌ها می‌باشد.)

$$\text{DPPH} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

این آزمون با سه تکرار بر هر یک از نمونه‌های هیدرولیز انجام شد و نتایج برحسب درصد رادیکال DPPH مهار شده آمده است.

### قدرت احیاء آهن نمونه هیدرولیز شده

قدرت احیاء آهن با استفاده از روش Sun و همکاران (۲۰۱۶) محاسبه گردید. مقدار ۳۰۰ میلی‌مول محلول بافر اسید استیک (pH=۳/۶) با ۱۰ میلی‌مول ۴، ۲ و ۶ - تری پریدیل - اس - تریازین و ۲۰ میلی‌مول  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  به نسبت‌های ۱۰:۱:۱۰ مخلوط گردید. مخلوط حاصل در حمام آب‌گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس قرار داده شد (تولید معرف). مخلوط ۱۵۰ میکرولیتر نمونه و ۴/۵ میلی‌لیتر معرف برای مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب‌گرم با دمای ۳۷ درجه سلسیوس واکنش داده شد. پس از آن میزان جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۹۳ نانومتر قرائت گردید. ۱۵۰ میکرولیتر آب مقطر به جای نمونه، در شاهد مورد استفاده قرار گرفت. برای رسم منحنی استاندارد، از غلظت‌های مختلف محلول  $\text{FeSO}_4$  (۵۰۰-۰ میکرومول بر میلی‌لیتر) و خواندن در طول موج ۵۹۳ نانومتر استفاده شد. این آزمون با سه تکرار بر هر یک از نمونه‌های هیدرولیز انجام شد و نتایج برحسب میکرومول  $\text{FeSO}_4$  بر میلی‌لیتر نمونه بیان شده است.

### ریزپوشانی روغن ماهی کیلکا

براساس آزمون و خطاهای اولیه و روش گزارش شده توسط Carneiro و همکاران (۲۰۱۲)، امولسیون با ۳۱/۲۵ درصد ماده خشک تهیه گردید. ۲۵ درصد مواد دیواره (با نسبت‌های مساوی)، روغن ماهی ۲۵ درصد و نمونه هیدرولیز شده در زمان ۴ ساعت (نمونه هیدرولیز ۴ ساعته به دلیل داشتن بالاترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی در این مطالعه، انتخاب شده است) برای تهیه تیمارهای ۰، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر روغن ماهی مورد

نمونه‌برداری در زمان‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت صورت گرفت. بلافاصله پس از هر نمونه‌برداری، با قرار دادن نمونه در حمام آب جوش به مدت ۱۵ دقیقه، آنزیم غیرفعال گردید. پس از سانتریفوژ نمودن در ۴۵۰۰ و ۱۳۰۰۰ گرم (تا شفاف شدن کامل) به مدت ۲۰ دقیقه، مایع سطح (حاوی پپتیدها) جمع‌آوری و برای آزمون‌های پیش‌بینی شده مورد استفاده قرار گرفت. هر یک از نمونه‌های هیدرولیز در سه تکرار جداگانه تهیه گردید.

### تعیین پروفایل اسیدهای آمینه نمونه هیدرولیز شده

برای تعیین پروفایل اسیدهای آمینه نمونه‌های هیدرولیز شده پوست کپور نقره‌ای، از اسید کلریدریک ۶ نرمال در دمای ۱۱۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت استفاده شد. قبل از تزریق نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Knauer, Germany)، مشتق‌سازی اسیدهای آمینه طبق روش گزارش شده توسط Ovissipour و همکاران (۲۰۱۰) با ارتو- فتاللدئید صورت گرفت. از ستون نوع C18 با سرعت جریانی ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و آشکارگر فلوئورسانس (RF-530, Knauer, Germany) استفاده شد. این آزمون در سه تکرار بر روی هریک از نمونه‌های هیدرولیز انجام گرفت.

### فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH نمونه هیدرولیز شده

فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH طبق روش Ghanbari و همکاران (۲۰۱۵) با تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، مقدار ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول DPPH (۰/۱ میلی‌مولار در اتانول ۹۵ درصد) با ۱/۵ میلی‌لیتر از نمونه (۵ میلی‌گرم بر میلی‌مول) مخلوط گردید. مخلوط برای مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق و در شرایط تاریکی قرار داده شد. بلافاصله پس از این مدت، جذب نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Perkin-Elmer Lambda 1, USA) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت گردید. برای شاهد، از اتانول ۹۵ درصد به جای نمونه استفاده شد. معادله ذیل برای محاسبه فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH (درصد) استفاده شد:

اين آزمون نيز با سه تکرار بر روی هریک از نمونه‌های میکرومولسیون انجام شد و نتایج برحسب درصد جدا شدن امولسیون آورده شده است.

### تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از برنامه کامپیوتری SPSS 17.0 (SPSS Statistical Software, Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. آزمون چند دامنه‌ای دانکن (Duncan's multiple range test) در سطح معنی‌دار بودن  $p < 0.05$  مورد استفاده قرار گرفت. داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار (حاصل از ۳ تکرار) گزارش شده است.

### نتایج و بحث

#### تغییرات پروفایل اسیدهای آمینه در محلول پوست هیدرولیز شده

هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای با استفاده از آنزیم آلکالاز طی ۶ ساعت، آثار متفاوتی بر میزان برخی اسیدهای آمینه و همچنین مجموع اسیدهای آمینه آبریز و آبدوست داشت (جدول ۱). نتایج نشان داد هیدرولیز به مدت ۲ ساعت و کمتر از آن، تغییر قابل ملاحظه‌ای را در نسبت وزنی اسیدهای آمینه مختلف ایجاد نمی‌کند. اما با طولانی‌تر شدن زمان هیدرولیز، مقدار مجموع اسیدهای آمینه آبریز کاهش و مجموع اسیدهای آمینه آبدوست افزایش یافت. مجموع اسیدهای آمینه آبریز از  $32/08 \pm 1/97$  درصد در زمان ۰/۲۵ ساعت به  $24/88 \pm 1/08$  درصد پس از ۶ ساعت هیدرولیز رسید. از بین اسیدهای آمینه آبریز، Leu، Ile و Val، بیشترین میزان کاهش نسبی را طی ۶ ساعت هیدرولیز نشان دادند. اسیدهای آمینه Gly و Hyp نیز کاهش جزئی پس از ۶ ساعت هیدرولیز داشتند. در مقابل مجموع اسیدهای آمینه آبدوست عمده پس از ۶ ساعت هیدرولیز، از  $31/41 \pm 1/43$  درصد در زمان ۰/۲۵ ساعت به  $40/46 \pm 1/90$  درصد رسید که بیش از ۱۷ درصد افزایش داشت و اختلاف مشاهده شده از حیث آماری معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ).

استفاده قرار گرفت. بافرهایی با دو pH ۶/۸ و ۳/۴ به عنوان فاز آبی، با استفاده از اسید سیتریک (۰/۱ مولار) و دی‌سدیم فسفات (۰/۲ مولار) طبق روش Taherian و همکاران (۲۰۱۱) تهیه شد. تنظیم pH نهایی توسط اسید کلریدریک و هیدروکسید سدیم ۰/۱ نرمال صورت گرفت. مواد دیواره و هیدرولیز پروتئینی، به همراه سدیم آزید به میزان ۰/۰۲ درصد، توزین و به آهستگی به حجم معین بافر (در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) در حال همزدن، اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه توسط مگنت، همگن گردید. پس از آن به بطری‌های درپوش‌دار منتقل و به منظور جذب کامل آب در طول شب، در یخچال قرار داده شد (Taherian et al., 2011). روز بعد، پس از هم‌دمایی با محیط و همگن‌سازی مجدد فاز آبی، نسبت تعیین شده روغن خالص شده کیلکا به آرامی و حین همزدن به آن‌ها افزوده گردید. امولسیون اولیه ابتدا با استفاده از اولتراتوراکس IKA مدل T25 digital (ساخت کشور آمریکا) با ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۳ دقیقه و سپس توسط هموژنایزر پیستونی مدار بسته HSTO مدل KL1,2 (ساخت کشور آلمان)، تحت فشار ۳۵۰ بار و ۵ مرتبه عبور، به میکرومولسیون تبدیل گردید. در نهایت نمونه‌ها درون بطری‌های تیره درپوش‌دار استریل بسته‌بندی شدند. تهیه هریک از نمونه‌های روغن کیلکای ریزپوشانی شده در سه تکرار صورت گرفته است.

#### پایداری امولسیون

پایداری امولسیون با اندکی اصلاحات، طبق روش گزارش شده توسط Carneiro و همکاران (۲۰۱۲) با آزمایش تشکیل خامه محاسبه گردید. بلافاصله پس از تهیه امولسیون، مقدار ۲۵ میلی‌لیتر از هر نمونه درون لوله‌های مدرج درپوش‌دار ریخته شد. پس از دربندی به مدت یک هفته در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. حجم فاز فوقانی جدا شده محاسبه و درصد جدا شدن امولسیون با استفاده از فرمول زیر محاسبه گردید: (در آن  $H_0$  = بیانگر حجم اولیه امولسیون و  $H_1$  = نشان‌دهنده فاز فوقانی جدا شده می‌باشد).

$$\text{جدا شدن امولسیون (درصد)} = (H_1/H_0) \times 100$$

جدول ۱: میزان اسیدهای آمینه (گرم بر ۱۰۰ گرم پروتئین) در نمونه هیدرولیز شده پوست ماهی کپور نقره‌ای با آلکالاز در زمان‌های مختلف<sup>۱</sup>.

Table 1: Amino acid profiles of hydrolysates of silver carp skin hydrolyzed by Alcalase at different hydrolysis time (g/100 g protein).

| اسید آمینه                                   | ۶ ساعت                  | ۴ ساعت                   | ۲ ساعت                   | ۱ ساعت                   | ۰/۲۵ ساعت               |
|----------------------------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| گلیسین                                       | ۲۲/۷۳±۰/۹۷ <sup>a</sup> | ۲۳/۵۶±۱/۴۱ <sup>a</sup>  | ۲۴/۰۳±۱/۲۰ <sup>a</sup>  | ۲۴/۶۰±۱/۲۳ <sup>a</sup>  | ۲۴/۷۹±۱/۴۹ <sup>a</sup> |
| پرولین                                       | ۸/۹۹±۰/۳۶ <sup>b</sup>  | ۹/۵۴±۰/۳۹ <sup>ab</sup>  | ۱۰/۸۳±۰/۵۴ <sup>a</sup>  | ۱۱/۴۵±۰/۵۷ <sup>a</sup>  | ۱۱/۵۵±۰/۶۹ <sup>a</sup> |
| آلانین                                       | ۸/۵۲±۰/۳۴ <sup>a</sup>  | ۹/۶۱±۰/۵۸ <sup>a</sup>   | ۹/۶۴±۰/۴۸ <sup>a</sup>   | ۹/۹۱±۰/۵۰ <sup>a</sup>   | ۹/۴۹±۰/۵۷ <sup>a</sup>  |
| والین                                        | ۱/۳۱±۰/۰۵ <sup>c</sup>  | ۱/۳۷±۰/۰۷ <sup>bc</sup>  | ۱/۶۶±۰/۰۸ <sup>ab</sup>  | ۱/۹۳±۰/۱۰ <sup>a</sup>   | ۱/۹۵±۰/۱۲ <sup>a</sup>  |
| متیونین                                      | ۱/۸۳±۰/۰۷ <sup>b</sup>  | ۱/۹۵±۰/۱۲ <sup>ab</sup>  | ۲/۱۹±۰/۱۱ <sup>ab</sup>  | ۲/۳۲±۰/۱۲ <sup>a</sup>   | ۲/۴۰±۰/۱۴ <sup>a</sup>  |
| ایزولوسین                                    | ۰/۶۵±۰/۰۳ <sup>c</sup>  | ۰/۸۹±۰/۰۵ <sup>b</sup>   | ۱/۴۳±۰/۰۷ <sup>a</sup>   | ۱/۴۷±۰/۰۷ <sup>a</sup>   | ۱/۳۶±۰/۰۸ <sup>a</sup>  |
| لوسین                                        | ۱/۷۶±۰/۰۷ <sup>c</sup>  | ۱/۹۲±۰/۱۲ <sup>b</sup>   | ۲/۸۸±۰/۱۵ <sup>a</sup>   | ۲/۸۹±۰/۱۴ <sup>a</sup>   | ۳/۰۷±۰/۱۸ <sup>a</sup>  |
| فنیل آلانین                                  | ۱/۸۲±۰/۰۹ <sup>c</sup>  | ۲/۱۱±۰/۱۲ <sup>bc</sup>  | ۲/۶۹±۰/۱۳ <sup>a</sup>   | ۲/۸۱±۰/۱۴ <sup>a</sup>   | ۲/۲۶±۰/۱۲ <sup>ab</sup> |
| هیدروکسی پرولین                              | ۶/۷۴±۰/۲۷ <sup>a</sup>  | ۶/۸۳±۰/۴۱ <sup>a</sup>   | ۷/۱۱±۰/۳۶ <sup>a</sup>   | ۷/۰۹±۰/۳۵ <sup>a</sup>   | ۷/۳۸±۰/۴۴ <sup>a</sup>  |
| اسید آسپارتیک                                | ۱۶/۴۱±۰/۶۱ <sup>b</sup> | ۱۵/۵۲±۰/۹۳ <sup>ab</sup> | ۱۳/۱۸±۰/۶۶ <sup>a</sup>  | ۱۲/۰۷±۰/۶۰ <sup>a</sup>  | ۱۲/۵۴±۰/۷۵ <sup>a</sup> |
| اسید گلوتامیک                                | ۶/۶۳±۰/۲۷ <sup>b</sup>  | ۵/۷۶±۰/۳۵ <sup>b</sup>   | ۳/۷۳±۰/۱۹ <sup>a</sup>   | ۳/۵۲±۰/۱۸ <sup>a</sup>   | ۳/۵۹±۰/۲۲ <sup>a</sup>  |
| سرین                                         | ۳/۱۰±۰/۱۲ <sup>b</sup>  | ۲/۹۱±۰/۱۷ <sup>ab</sup>  | ۲/۷۹±۰/۱۴ <sup>ab</sup>  | ۲/۷۵±۰/۱۴ <sup>ab</sup>  | ۲/۴۳±۰/۱۸ <sup>a</sup>  |
| سیستئین                                      | ۰/۷۲±۰/۰۳ <sup>c</sup>  | ۰/۶۱±۰/۰۴ <sup>bc</sup>  | ۰/۵۸±۰/۰۳ <sup>ab</sup>  | ۰/۴۹±۰/۰۳ <sup>ab</sup>  | ۰/۳۵±۰/۰۴ <sup>a</sup>  |
| لیزین+هیدروکسی لیزین                         | ۴/۹۷±۰/۲۰ <sup>a</sup>  | ۴/۵۲±۰/۲۸ <sup>a</sup>   | ۴/۳۸±۰/۲۵ <sup>a</sup>   | ۴/۱۸±۰/۲۲ <sup>a</sup>   | ۴/۳۳±۰/۲۶ <sup>a</sup>  |
| تیروزین                                      | ۰/۶۵±۰/۰۶ <sup>a</sup>  | ۰/۶۱±۰/۰۷ <sup>a</sup>   | ۰/۵۸±۰/۰۴ <sup>a</sup>   | ۰/۵۹±۰/۰۴ <sup>a</sup>   | ۰/۴۹±۰/۰۳ <sup>a</sup>  |
| آرژنین                                       | ۹/۳۵±۰/۳۹ <sup>a</sup>  | ۸/۵۹±۰/۵۲ <sup>a</sup>   | ۸/۶۵±۰/۴۳ <sup>a</sup>   | ۸/۵۸±۰/۴۷ <sup>a</sup>   | ۸/۵۲±۰/۵۱ <sup>a</sup>  |
| تره‌آونین                                    | ۳/۱۷±۰/۱۴ <sup>a</sup>  | ۳/۰۷±۰/۲۰ <sup>a</sup>   | ۳/۱۰±۰/۱۸ <sup>a</sup>   | ۲/۸۱±۰/۱۶ <sup>a</sup>   | ۲/۹۳±۰/۱۹ <sup>a</sup>  |
| هیستیدین                                     | ۰/۶۵±۰/۰۵ <sup>a</sup>  | ۰/۶۳±۰/۰۴ <sup>a</sup>   | ۰/۵۵±۰/۰۳ <sup>a</sup>   | ۰/۵۴±۰/۰۴ <sup>a</sup>   | ۰/۵۷±۰/۰۳ <sup>a</sup>  |
| مجموع اسیدهای آمینه آبگریز <sup>۳</sup>      | ۲۴/۸۸±۱/۰۸ <sup>b</sup> | ۲۷/۳۹±۱/۷۵ <sup>ab</sup> | ۳۱/۳۲±۱/۵۷ <sup>a</sup>  | ۳۲/۷۸±۱/۶۵ <sup>a</sup>  | ۳۲/۰۸±۱/۹۷ <sup>a</sup> |
| مجموع اسیدهای آمینه آبدوست عمده <sup>۴</sup> | ۴۰/۴۶±۱/۹۰ <sup>c</sup> | ۳۷/۳۰±۱/۷۳ <sup>bc</sup> | ۳۲/۷۳±۱/۶۵ <sup>ab</sup> | ۳۱/۱۰±۱/۳۸ <sup>ab</sup> | ۳۱/۴۱±۱/۴۳ <sup>a</sup> |

۱. میانگین ± انحراف معیار حاصل از سه تکرار

1. Determinations were performed in triplicate and data correspond to mean values ± Standard deviations.

۲. حروف متفاوت لاتین بالای اعداد نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار آماری در هر ردیف می‌باشد ( $p < 0.05$ ).

2. Mean values within each row with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

۳. مجموع اسیدهای آمینه آبگریز: Ala + Val + Met + Leu + Ile + Phe + Pro

3. Total Hydrophobic amino acids: Ala + Val + Met + Leu + Ile + Phe + Pro.

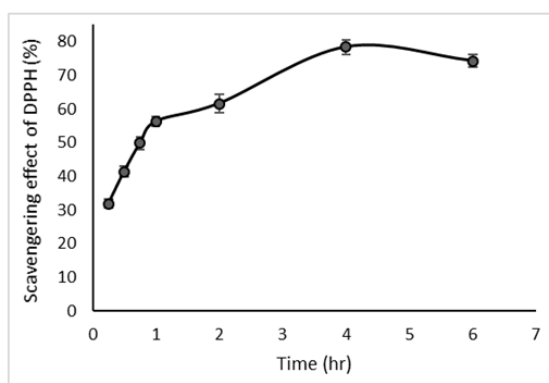
۴. مجموع اسیدهای آمینه آبدوست عمده: Asp + Glu + Arg + Lys + Hly + Ser + Tyr

4. Total major Hydrophilic amino acids: Asp + Glu + Arg + Lys + Hyl + Ser.

بود. این تغییرات طی ۴ ساعت اولیه با شیب ملایم‌تر و سپس ۴-۶ ساعت با سرعت قابل ملاحظه‌ای همراه بود (جدول ۱). اسیدهای آمینه Pro، Met، Val، Ile، Leu، Asp، Glu و His بیشترین میزان تغییرات را پس از ۴ ساعت، نسبت به ۲ ساعت هیدرولیز داشتند. اسیدهای آمینه Gly، Ala، Phe، Ser، Cys، Tyr، Arg و Thr نیز

اسید آمینه Cys بیشترین میزان افزایش نسبی را نشان داد که پس از ۶ ساعت هیدرولیز، مقدار آن بیش از دو برابر گردید. پس از آن اسیدهای آمینه Glu و Tyr، Asp و Ser به ترتیب با ۸۴/۷، ۳۲/۶، ۳۰/۷ و ۲۷/۶ درصد افزایش نسبی داشتند. میزان تغییرات هریک از اسیدهای آمینه طی فواصل زمانی مختلف نمونه‌برداری نیز متفاوت

آماري نیز معنی‌دار بود ( $p < 0.05$ ). همچنین شتاب افزایش قدرت ضد رادیکالی آن‌ها در زمان‌های مختلف نیز متفاوت بود. فعالیت ضد رادیکالی هیدرولیزهای آنزیمی طی یک ساعت اول، افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت، به طوری که در ۴ ساعت به اوج رسید و پس از آن کاهش مختصری نشان داد.



شکل ۱: ظرفیت مهارکنندگی رادیکال DPPH در پوست هیدرولیز شده ماهی کپور نقره‌ای طی زمان‌های مختلف هیدرولیز با آنزیم آلکالاز (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

Figure 1: DPPH radical scavenging capacity of silver carp skin hydrolysates at different hydrolysis time by Alcalase (Mean  $\pm$  SD).

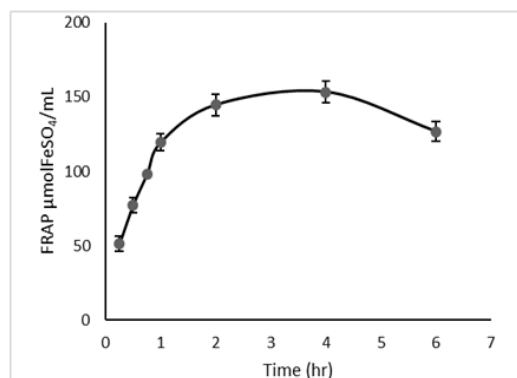
اندازه‌گیری قدرت احیای آهن نیز عموماً برای ارزیابی توانایی یک آنتی‌اکسیدان به عنوان دهنده الکترون یا هیدروژن مورد استفاده قرار می‌گیرد (Chalamaiah et al., 2015). پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی موجود در هیدرولیز پروتئینی پوست ماهی کپور نقره‌ای قادر بودند تا  $Fe^{3+}$  موجود در ترکیب سیانید فریک را به  $Fe^{2+}$  احیا نمایند (شکل ۲). روند تغییرات در قدرت احیای آهن محلول‌های هیدرولیز شده حاصل از زمان‌های مختلف هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای با آنزیم آلکالاز نیز مشابه روندهای مشاهده شده برای قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH بود. بطوریکه قدرت احیای آهن نمونه‌ها طی زمان‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت با اختلاف قابل ملاحظه ( $p < 0.05$ )، بترتیب  $51.3 \pm 5.2$ ،  $77.5 \pm 5.1$ ،

بیشترین میزان تغییرات را طی دو ساعت پایانی هیدرولیز داشتند. اما مطالعه Dong و همکاران (۲۰۰۸) نشان داد که هیدرولیز گوشت ماهی کپور نقره‌ای با آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم در زمان‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱/۵ و ۴ ساعت، تغییرات قابل ملاحظه‌ای بر روی نسبت اغلب اسیدهای آمینه ایجاد نمی‌نماید. در عین حال میزان اسیدهای آمینه سولفوردار (Cys و Met) در محلول‌های هیدرولیزی حاصل، ۱ تا ۳ برابر افزایش داشت. در نتایج آن‌ها افزایش جزئی در میزان اسید آمینه Pro نیز گزارش شده است که با نتایج حاصل از این مطالعه تا حدودی متفاوت است (جدول ۱). تفاوت مشاهده شده ممکن است ناشی از تفاوت در ترکیب اسیدهای آمینه منابع پروتئینی مورد استفاده و همچنین شرایط هیدرولیز باشد.

#### ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی

مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد مکانیسم اصلی است که توسط آن آنتی‌اکسیدان‌ها مانع پیشرفت فرایند اکسایش می‌گردند (Zhong et al., 2011). قدرت مهارکنندگی رادیکال‌های آزاد هیدرولیزهای حاصل از پوست ماهی کپور نقره‌ای نشان داد هنگامی که رادیکال‌های آزاد DPPH در مواجهه با یک ترکیب‌دهنده پروتون نظیر آنتی‌اکسیدان قرار می‌گیرند، مهار می‌شوند و میزان جذب با تغییر رنگ محلول کاهش می‌یابد (Chalamaiah et al., 2015). در واقع با هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای توسط آنزیم آلکالاز، ترکیبات الکترون دهنده‌ای تولید می‌شود که قادرند رادیکال‌های آزاد DPPH را به شکل پایدار تبدیل نمایند و از توسعه واکنش‌های زنجیره‌ای اکسایش ممانعت کنند (شکل ۱). قدرت مهارکنندگی محلول‌های هیدرولیزی حاصل از زمان‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱، ۲، ۴ و ۶ ساعت برای رادیکال DPPH به ترتیب  $31.8 \pm 1.28$ ،  $41.4 \pm 1.5$ ،  $49.8 \pm 1.86$ ،  $56.3 \pm 1.37$ ،  $61.6 \pm 2.63$ ،  $78.4 \pm 2.24$  و  $74.3 \pm 1.75$  درصد به دست آمد. همانگونه که ملاحظه می‌گردد محلول‌های هیدرولیزی، میزان فعالیت مهارکنندگی متفاوتی را برای رادیکال‌های آزاد در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های مختلف هیدرولیز از خود نشان دادند که از حیث

مجموع اسیدهای آمینه آبگریز و خواص آنتی اکسیدانی یافت نکرده‌اند.



شکل ۲: قدرت احیاء آهن (FRAP) در پوست هیدرولیز شده ماهی کپور نقره‌ای طی زمان‌های مختلف هیدرولیز با آنزیم آلكالاز (میانگین  $\pm$  انحراف معیار)

**Figure 2: Fe reducing antioxidant power (FRAP) of silver carp skin hydrolysates at different hydrolysis time by Alcalase (Mean  $\pm$  SD)**

### ارزیابی پایداری میکروامولسیون

پایداری امولسیون در برابر دو فاز شدن و تشکیل خامه در pH ۶/۸ نسبت به pH ۳/۴ بیشتر بود (جدول ۲) و اختلاف معنی‌داری را در غلظت‌های ۲ تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر نشان داد ( $p < 0.05$ ). در pH ۶/۸ استفاده از غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش قابل ملاحظه پایداری امولسیون نسبت به تمامی تیمارهای مورد بررسی گردید و در نتیجه کمترین میزان جدا شدن امولسیون مشاهده شد. در pH ۳/۴ نیز اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های ۴ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از حیث پایداری امولسیون مشاهده نگردید ( $p > 0.05$ ). در عین حال تنها این تیمارها، اختلاف معنی‌دار آماری با تیمار شاهد نشان دادند. ادعا شده است اندازه کوچک‌تر ذرات امولسیون در شرایط یکسان همگن‌سازی ممکن است موجب بهبود پایداری در برابر به هم پیوستن، به دلیل افزایش نیروهای دافعه و کاهش نیروهای جاذبه بین قطرات، و همچنین کاهش گرایش به جدا شدن ثقلی و تشکیل خامه، گردد (Zhu et al., 2018).

۹۸/۱۵/۸، ۱۱۹/۶۵/۶، ۱۴۴/۷۵/۳، ۱۵۳/۳۵/۵ و ۱۲۶/۸۵/۴ میکرومول  $\text{FeSO}_4$  بر میلی‌لیتر بدست آمد. نتایج گویای آن بود که توان احیاء آهن محلول‌های هیدرولیزی طی یک ساعت اول افزایش قابل ملاحظه‌ای داشت، اما با گذشت زمان در ۴ ساعت به حداکثر رسید و پس از آن کاهش یافت. برخی تحقیقات نیز نشان داده‌اند که با پیشرفت هیدرولیز و افزایش درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای پروتئینی با منشاء دریایی افزایش می‌یابد (Kittiphattanabawon et al., 2012). در عین حال، Yi و همکاران (۲۰۱۷) و Giménez و همکاران (۲۰۰۹) نتایجی مشابه تحقیق حاضر گزارش نموده‌اند. Klompong و همکاران (۲۰۰۷) نیز گوشت چرخ‌شده ماهی تروالی نوار زرد (Yellow stripe trevally) را توسط آنزیم آلكالاز، هیدرولیز و بالاترین فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH را گزارش نمودند و نتیجه گرفتند که این فعالیت با افزایش زمان هیدرولیز، کاهش می‌یابد. از سوی دیگر، Cheung و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که هیدرولیز یک ساعته گوشت ماهی هیک اقیانوس آرام توسط آنزیم‌های متعددی چون آلكالاز و فلاورزایم، نسبت به هیدرولیزهای تهیه شده با زمان هیدرولیز طولانی‌تر، فعالیت آنتی اکسیدانی بیشتری از خود نشان داده است. همچنین، Dong و همکاران (۲۰۰۸) نتیجه گرفته‌اند فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده ماهی کپور نقره‌ای به درجه هیدرولیز، زمان هیدرولیز و وزن مولکولی پپتیدها بستگی دارد. از طرف دیگر، نتایج حاصل از این مطالعه نشان داد که با شکسته شدن بیشتر پیوندها و تولید پپتیدهای ریزتر، فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزهای حاصل کاهش یافت که پدیده اخیر را می‌توان به کاهش نسبت مجموع اسیدهای آمینه آبگریز نسبت داد. محققین بسیاری نیز بر این عقیده‌اند که فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها را نمی‌توان به یک مکانیسم نسبت داد؛ احتمالاً به این خاطر که در ساختارهای متنوع پپتیدهای آنتی اکسیدان، اسیدهای آمینه مختلف و با ویژگی‌های متنوع حضور دارند (Gómez-Guillén et al., 2011). Alemán و همکاران (۲۰۱۱) نیز ادعا نمودند که همبستگی بین



جدول ۲: ارزیابی پایداری میکروکپسول تولید شده از روغن ماهی کیلکا با استفاده از خواص عملکردی هیدرولیز پوست ماهی کپور نقره‌ای در pHهای ۶/۸ و ۳/۴.

Table 2: Evaluation of the stability of microemulsion prepared by Kilk fish oil using silver carp skin hydrolysate at pH 6.8 and 3.4.

| شاخص             | pH  | شاهد                    | ۱ mg/mL                 | ۲ mg/mL                 | ۳ mg/mL                 | ۴ mg/mL                 | ۵ mg/mL                |
|------------------|-----|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------|
| تیمار            |     |                         |                         |                         |                         |                         |                        |
| جدا شدن امولسیون | ۶/۸ | ۳/۸±۰/۲۷ <sup>Aa*</sup> | ۲/۹±۰/۳۱ <sup>Aab</sup> | ۲/۲±۰/۱۹ <sup>Abc</sup> | ۲/۱±۰/۲۶ <sup>Abc</sup> | ۱/۶±۰/۱۷ <sup>Ac</sup>  | ۰/۸±۰/۱۲ <sup>Ad</sup> |
| (درصد)           | ۳/۴ | ۴/۵±۰/۳۴ <sup>Aa</sup>  | ۳/۷±۰/۲۸ <sup>Aa</sup>  | ۳/۵±۰/۳۳ <sup>Bab</sup> | ۳/۴±۰/۳۱ <sup>Bab</sup> | ۲/۵±۰/۲۱ <sup>Bbc</sup> | ۲/۰±۰/۱۸ <sup>Bc</sup> |

\*حروف بزرگ در هر ستون و حروف کوچک در هر ردیف نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار آماری می‌باشند ( $p < 0.05$ ).

\*Different letters on the same column (A, B) and row (a, b ...) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ).

بدین ترتیب بنظر می‌رسد که عامل تغییرات بار الکتریکی ناشی از تفاوت pH بر پایداری امولسیون در برابر دوفاز شدن موثر واقع گردیده است. زیرا pH ایزوالکتریک اغلب پپتیدها بین ۴/۵ تا ۵/۵ بوده و بدین ترتیب افزایش pH از ۳/۴ به ۶/۸، موجب تغییر بار الکتریکی خالص پپتیدها از مثبت به منفی خواهد گردید. و از آنجا که در حوالی pH ایزوالکتریک، تعداد گروه‌های با بار مثبت و منفی برابر گردیده و برآیند بار الکتریکی مولکول صفر یا خنثی می‌شود؛ افزایش pH پس از این نقطه موجب القای بار الکتریکی منفی و افزایش تعداد گروه‌های آنیونی و کاهش گروه‌های کاتیونی خواهد شد (Taherian et al., 2011). از سوی دیگر، بار منفی پپتیدهای قرار گرفته در سطح بینابینی در pH ۶/۸ در این تحقیق، ممکن است موجب تشدید برهم‌کنش‌های بین پپتید- روغن ماهی- مواد دیواره‌ای گردد و در نتیجه منجر به پایداری بیشتر امولسیون شود.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان بر خود لازم می‌دانند که از دانشگاه فردوسی مشهد، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور و موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی - مشهد در زمینه حمایت‌های مالی و در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر کنند.

### منابع

پژوهان‌مهر، س.، ۱۳۹۵. سینتیک اکسایش روغن ماهی کیلکا در حضور فراکسیونهای فعال آنتی اکسیدانی

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج پژوهش حاضر نشان داد که استفاده از روش‌های موثر و ترکیبی، از جمله ریزپوشانی روغن ماهی کیلکا با افزودن ترکیبات آنتی‌اکسیدانی طبیعی حاصل از هیدرولیز آزمی پوست ماهی کپور نقره‌ای، می‌تواند القاء‌کننده خواص ضداکسایشی و ضدرادیکالی مناسب در آن شود. از سویی دیگر، نتایج حاصل از این مطالعه اثبات نمود که با طولانی شدن زمان هیدرولیز و تغییر پروفایل اسیدهای آمینه، کاهش نسبی مجموع اسیدهای آمینه آبگریز و

- peptide fractions from pacific hake (*Merluccius Productus*) hydrolysates. *Food Chemistry*, 134:1297–1306.  
DOI:10.1016/j.foodchem.2012.02.215.
- Chi, C.F., Cao, Z.H., Wang, B., Hu, F.Y., Li, Z.R. and Zhang, B., 2014.** Antioxidant and functional properties of collagen hydrolysates from Spanish mackerel skin as influenced by average molecular weight. *Molecules*, 19:11211–11230.  
DOI:10.3390/molecules190811211.
- Dickinson, E., 2006.** Structure formation in casein-based gels, foams and emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 288:3–11.  
DOI:10.1016/j.colsurfa.2006.01.012.
- Dong, S., Zeng, M., Wang, D., Liu, Z., Zhao, Y. and Yang, H., 2008.** Antioxidant and biochemical properties of protein hydrolysates prepared from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*). *Food Chemistry*, 107:1485–1493.  
DOI:10.1016/j.foodchem.2007.10.011
- Ghanbari, R., Zarei, M., Ebrahimpour, A., Abdul-Hamid, A., Ismail, A. and Saari, N., 2015.** Angiotensin-I Converting Enzyme (ACE) inhibitory and anti-oxidant activities of sea cucumber (*Actinopyga lecanora*) hydrolysates. *International Journal of Molecular Science*, 16:28870–28885. DOI:10.3390/ijms161226140.
- Giménez, B., Alemán, A., Montero, P. and Gómez-Guillén, M.C., 2009.** Antioxidant and functional properties of gelatin hydrolysates obtained from skin of sole and روغنهای مغز و پوست بنه. پایان نامه دکتری علوم و صنایع غذایی. دانشگاه فردوسی مشهد، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی: ۴۸–۴۹.
- جلیلی، س.ح.، ۱۳۹۰.** بررسی امکان استفاده از ژلاتین استخراج شده از زائادات فرآوری کپور ماهیان پرورشی در تولید کره کم چرب. گزارش نهایی پروژه تحقیقاتی، موسسه تحقیقات علوم شیلاتی کشور: ۷۵ صص.
- سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶.** میزان پرورش ماهیان گرمابی. ۱۳۹۶/۹/۱۲.  
[http://fisheries.ir/report\\_viwe.aspx?rep=parvaresh%20mahi%20garm](http://fisheries.ir/report_viwe.aspx?rep=parvaresh%20mahi%20garm)
- Alemán, A., Giménez, B., Montero, P. and Gómez-Guillén, M.C., 2011.** Antioxidant activity of several marine skin gelatins; *LWT - Food Science and Technology*, 44:407–413.  
DOI:10.1016/j.lwt.2010.09.003.
- Carneiro, C.F.G., Tonon, R.V., Grosso, C.R.F. and Hubinger, M.D., 2012.** Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials; *Journal of Food Engineering*, 115(4):443–451.  
DOI:10.1016/j.jfoodeng.2012.03.033.
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V. and Dinesh Kumar, B., 2015.** Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science and Technology*, 52(9):5817–5825.  
DOI:10.1007/s13197-015-1714-6.
- Cheung, I.W.Y., Cheung, L.K.Y., Tan, N.Y. and Li-Chan, C.Y., 2012.** The role of molecular size in antioxidant activity of

- squid. *Food Chemistry*, 114:976–983. DOI:10.1016/j.foodchem.2008.10.050.
- Gómez- Guillén, M.C., Giménez, B., López - Caballero, M.E. and Montero, M.P., 2011.** Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative resources: A review. *Food Hydrocolloid*, 25:1813-1827. DOI:10.1016/j.foodhyd.2011.02.007.
- Jafari, S.M., Assadpoor, E., He, Y., and Bhandari, B., 2008.** Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. *Drying Technology*, 26 (7):816–835. DOI:10.1080/07373930802135972.
- Ketnawa, S., Benjakul, S., Martínez-Alvarez, O. and Rawdkuen, S., 2017.** Fish skin gelatin hydrolysates produced by visceral peptidase and bovine trypsin: bioactivity and stability. *Food Chemistry*, 215, 383-390. DOI:10.1016/j.foodchem.2016. 07.145.
- Kittiphattanabawon, P., Benjakul, S., Visessanguan, W. and Shahidi, F., 2012.** Gelatin hydrolysate from blacktip shark skin prepared using papaya latex enzyme, antioxidant activity and its potential in model systems. *Food Chemistry*, 135(3), 1118–1126. DOI:10.1016/j.foodchem. 2012.05.080.
- 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*, 102:1317–1327. DOI:10.1016/j.foodchem.2006.07.016.
- Mu, H., 2008.** Bioavailability of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids from foods. *Agro Food Industry Hi-tech*, 19(4):24-26. <https://www.researchgate.net/publication/242196422>.
- Ovissipour, M.R., Abedian Kenari, A.M., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M., 2010.** Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). *Food Bioprocess Technology*, published online: 20 May 2010:10 pp. DOI:10.1007/s11947-010-0357-x.
- Pirestani, S., Sahari, M. A., Barzegar, M., and Nikoopour, H., 2010.** Lipid, cholesterol and fatty acid profile of some commercially important fish species from south Caspian sea. *Journal of Food Biochemistry*, 34, 886–895. DOI:10.1111/j.1745-4514.2010.00343.x.
- Sun, L., Chang, W., Ma, Q. and Zhuang, Y., 2016.** Purification of antioxidant peptides by high resolution mass spectrometry from simulated gastrointestinal digestion hydrolysates of alaska pollock (*Theragra chalcogramma*) skin collagen. *Marine Drugs*, 14, 186:14. DOI:10.3390/md14100186.
- Tahergorabi, R., Beamer, S.K., Matak, K.E. and Jaczynski, J., 2012.** Functional food products made from fish protein isolate recovered with isoelectric solubilization/precipitation; *LWT - Food Science and*

*Technology*, 48:89-95. DOI:10.1016/j.lwt.2012.02.018.

**Taherian, A.R., Britten, M., Sabik, H. and Fustier, P., 2011.** Ability of whey protein isolate and/or fish gelatin to inhibit physical separation and lipid oxidation in fish oil-in-water beverage emulsion. *Food Hydrocolloids*, 25:868-878. DOI:10.1016/j.foodhyd.2010.08.007.

**Yi, J., Gobba, C.D., Skibsted, L.H. and Otte, J., 2017.** Angiotensin-I converting enzyme inhibitory and antioxidant activity of bioactive peptides produced by enzymatic hydrolysis of skin from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *International Journal of Food Properties*, 20(5):1129–1144. DOI:10.1080/0942912.2016.1203932.

**Zhong, S., Ma, C., Lin, Y.C. and Luo, Y., 2011.** Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin Resonance spectrometry. *Food Chemistry*, 126:1636–1642. DOI:10.1016/j.foodchem.2010.12.046

**Zhu, Z., Zhao, C., Yi, J., Liu, N., Cao, Y., Decker, E.A. and McClements, D.J., 2018.** Impact of interfacial composition on lipid and protein cooxidation in oil-in-water emulsions containing mixed emulsifiers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66 (17):4458–4468. DOI:10.1021/acs.jafc.8b00590

## Microencapsulated Kilka fish oil stability using functional properties of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin hydrolysate

Jalili S.H.<sup>1,2</sup>; Farhoosh R.<sup>1\*</sup>; Koocheki A.<sup>1</sup>; Motallebi A.A.<sup>3</sup>

\*rfarhoosh@um.ac.ir

1-Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

2-Inland Waters Aquaculture Research Center, Iranian Fisheries Sciences Research Institute, Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Bandar Anzali, Iran.

3-Agricultural Research, Education and Extension Organization (AREEO), Tehran, Iran.

### Abstract

Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) skin (SCS) is available as low cost by-product in minced products manufacturing plants. Kilka fish (*Clupeonella spp.*) oil has a higher omega-3 fatty acids content compared to other Caspian Sea fish oils and higher nutritional value. In the present study, SCS was collected, hydrolyzed with alcalase, and its functional properties was investigated for the microcapsule stability of purified Kilka oil (PKO) at pH 6.8 and 3.4. Results showed significant changes of amino acids profiles during 6 h hydrolysis ( $p < 0.05$ ). Total hydrophobic amino acids decreased from 32.8% at 0.25 h to 24.9% after 6 h. Hydrolysates showed different radical scavenging activity during different hydrolysis periods. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging activity and Ferric reducing antioxidant power (FRAP) increased significantly during first hour, peaked at 4 h and then decreased slowly. Microemulsion was more stable at pH 6.8 compared with pH 3.4 and showed significant differences at 2-5 mg/mL of hydrolysate ( $p < 0.05$ ). As a general result, the use of hydrolysis of SCS and its antioxidant role in the production of stable emulsions containing PKO microcapsules is a valuable process for the enrichment of various kinds of foods.

**Keywords:** Silver carp skin, Kilka fish oil, Enzymatic hydrolysis, Functional properties, Emulsion stability

---

\*Corresponding author