

مقاله علمی - پژوهشی:

تأثیر زمان آبکافت بر فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

سکینه یگانه^{*}، مینا اسمعیلی خاریکی^۱، حامد احمدی^۱

*skyeganeh@gmail.com
s.yeganeh@sanru.ac.ir

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

تاریخ دریافت: اردیبهشت ۱۳۹۹

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۳۹۹

چکیده

در مطالعه حاضر فعالیت آنتی اکسیدانی غلظت‌های مختلف پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) در زمان‌های مختلف آبکافت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۸ قطعه کپور معمولی با میانگین وزن 0.766 ± 0.034 کیلوگرم از بازار تهیه شدند، سپس آبکافت سر ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز با غلظت ۱ درصد (حجمی/وزنی) در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ در زمان‌های مختلف (۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه) انجام شد. نتایج آنالیز تقریبی نشان داد که در نتیجه آبکافت، درصد پروتئین (از 58.31 ± 1.9 به 75.26 ± 1.49 درصد) به طور معنی‌داری افزایش و مقدار چربی و خاکستر (به ترتیب از 16.46 ± 0.87 به 2.37 ± 0.97 و از 27.16 ± 0.64 به 25.34 ± 1.63 درصد) به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$). همچنین محتوای پروتئین محلول و درجه آبکافت با افزایش مدت زمان آبکافت به طور معنی‌داری افزایش یافت به طوری که بیشترین پروتئین محلول 23.01 ± 0.19 میلی‌گرم/میلی‌لیتر و درجه آبکافت 49.67 ± 0.86 درصد در زمان ۱۸۰ دقیقه به دست آمد ($p < 0.05$). درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نیز با افزایش غلظت و افزایش مدت زمان آبکافت، به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p < 0.05$) و بهترین زمان برای شاخص قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH، ۱۸۰ دقیقه و مقدار IC_{50} در حذف این رادیکال، 2.08 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. همچنین با افزایش غلظت و زمان آبکافت، قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی و فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS نیز افزایش معنی‌داری پیدا کردند ($p < 0.05$). به طور کلی، با توجه به عملکرد مناسب پروتئین آبکافتی سر ماهی کپور معمولی در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ABTS و قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی، می‌توان اظهار داشت که این پروتئین آبکافتی می‌تواند به عنوان یک افزودنی غذایی با عملکرد آنتی اکسیدانی مطلوب مورد استفاده قرار گیرد.

لغات کلیدی: پروتئین آبکافتی، فعالیت آنتی اکسیدانی، سر کپور معمولی، قدرت مهار رادیکال آزاد، قدرت کاهندگی آهن

*نویسنده مسئول

مقدمه

رادیکال‌های آزاد اتم فعال یا گروهی از اتم‌ها با تعداد الکترون‌های فرد هستند. وجود الکترون منفرد در ساختار رادیکال‌های آزاد، آنها را ناپایدار و بسیار واکنش‌پذیر می‌سازد. خطرناک‌ترین رادیکال‌های آزاد، اکسی رادیکال‌های بسیار فعال، متحرک و کوچک هستند که بعد از تشکیل، واکنش‌های زنجیره‌ای را آغاز می‌کنند و به DNA، پروتئین و چربی‌ها آسیب می‌رسانند. آسیب DNA به صورت جهش، خطای ترجمه و ممانعت از سنتز پروتئین می‌باشد و آسیب به پروتئین‌ها سبب تغییراتی در انتقال یون‌ها و فعالیت آنزیم‌ها می‌شود. اکسیداسیون اسیدهای چرب غیراشباع نیز سبب تغییر ترکیبات، ساختار و ویژگی‌های غشاء (حلالیت و نفوذ پذیری) و تغییر فعالیت آنزیم‌های متصل به غشاء می‌شود (Surai, 2002). این رادیکال‌های فعال عامل بسیاری از بیماری‌ها مانند دیابت، بیماری‌های قلبی-عروقی و اختلالات سیستم مغزی می‌باشند. همچنین در سیستم‌های غذایی نیز با تسریع اکسیداسیون چربی‌ها و اسیدهای چرب غیر اشباع موجب فساد ماده غذایی می‌گردند (You et al., 2009). به همین دلیل توجه زیادی به یافتن آنتی اکسیدان‌ها به‌ویژه با منشأ طبیعی با خطرات سلامتی کمتر معطوف شده است. برای این منظور پروتئین‌های آبکافت شده با منشأ جانوری و گیاهی تولیدی با آنزیم‌های مختلف (با منشأ میکروبی، گیاهی و جانوری) با خواص آنتی اکسیدانی قوی مانند پروتئین آبکافت شده دانه زنجبیل (Amza et al., 2013)، ضایعات چند گونه ماهی مدیترانه‌ای (García-Moreno et al., 2014)، ضایعات شیزوتوراکس (خواجوی و همکاران، ۱۳۹۵)، سر ماهی هورر مسقطی (اسمعیلی خارجی و همکاران، ۱۳۹۶)، اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (ریحانی‌پول و جعفرپور، ۱۳۹۶)، اندرونه تاس‌ماهی ایرانی، فیل‌ماهی، آنچوی، تن زردباله (Ovissipour et al., 2009a,b,c; 2012a, b) مورد تحقیق قرار گرفتند.

بسیاری از خواص فیزیولوژیک و کارکردی پروتئین‌ها با پپتیدهای زیست فعال موجود در ساختار آنها مرتبط است. تحقیقات نشان داده است که بیش‌تر پپتیدهای زیست‌فعال در توالی پروتئین اصلی خود غیر فعال هستند (Kim and Kim, 2013)، اما پس از آزاد شدن طی فرآیند هضم گوارشی یا با استفاده از روش‌های مختلف فرآوری (مثل آبکافت آنزیمی)، فعالیت فیزیولوژیک خود را نمایان می‌سازند (Ahn et al., 2010). تلاش‌های زیادی در جهت افزایش بازدهی و کیفیت

محصول نهایی پس از آبکافت با استفاده از تکنیک‌های شیمیایی (اصغرnia و همکاران، ۱۳۹۶) و آنزیمی صورت گرفته است که یکی از کارآمدترین این تکنیک‌ها، روش آبکافت آنزیمی است. از مزایای روش آبکافت آنزیمی می‌توان به آسان بودن شرایط فرآوری، کنترل واکنش و شرایط واکنش ملایم‌تر اشاره کرد (Ovissipour et al., 2010). پروتئین‌های ناشی از آبکافت، مخلوطی از قطعات مختلف پپتیدی (دی، تری و الیگوپپتید) با محدوده متنوعی از وزن‌های مولکولی می‌باشند که با تولید گروه‌های آبدوست سبب افزایش حلالیت پروتئین می‌شوند و در نتیجه خواص کارکردی و زیست فعالی پروتئین را بهبود می‌بخشند. پپتیدهای زیست فعال ویژگی‌های کارکردی متفاوتی دارند (Kim and Kim, 2013) که از جمله می‌توان به خواص ضد دیابت، ضد میکروبی، ضد انعقادی، ضد فشار خون، ضد سرطانی، تقویت‌کنندگی سیستم ایمنی، تنظیم‌کنندگی سیستم هورمونی و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (Rajapakse et al., 2005; Shahidi and Zhong, 2008; Jiang et al., 2014). اگرچه آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی ارزان‌تر و قابل دسترس‌تر هستند، اما استفاده از آنها یک ریسک بالا برای سلامت می‌باشد (Chai et al., 2015). عوامل مختلفی بر فرایند آبکافت آنزیمی تأثیرگذارند که از جمله آنها می‌توان به نوع آنزیم مورد استفاده (ویژگی‌های اختصاصی و هیدرولیتیک)، شرایط حاکم بر فرآیند آبکافت (مدت زمان، دما، pH) و سوبسترا (نوع و ترکیب) اشاره کرد و این عوامل با توجه به هدف تحقیق، باید هنگام انتخاب نوع آنزیم و مراحل انجام فرآیند آبکافت مد نظر قرار گیرند. آبکافت آنزیمی بر اندازه مولکولی، گروه‌های آب‌گریز و قطبی پپتیدها تأثیر می‌گذارد که به طور مستقیم بر خواص کاربردی آنها در ترکیب مواد غذایی مؤثر است (علی‌نژاد و همکاران، ۱۳۹۳؛ Chalamaiah et al., 2012).

با توجه به میزان رو به رشد تولید آبزیان، حجم بالایی از ضایعات شامل فلس، پوست، امعا و احشاء، استخوان‌ها و ستون فقرات نیز تولید خواهد شد (Benjakul and Morrissey, 1997). امروزه بر اساس آمارها میزان کل تولیدات آبزیان در دنیا بیش از ۱۷۰ میلیون تن می‌باشد (FAO, 2016). این حجم عظیم از تولیدات و آبزی‌پروری موجب تولید ضایعات کلانی می‌شود به‌طوری‌که ۶۰ درصد ماهی در کارخانه‌ها جزء ضایعات محسوب می‌شود (Dekkers et al., 2010) و حذف این

آنالیز تقریبی سر ماهیان و پروتئین آبکافتی حاصل از آن
سنجش مقادیر رطوبت، خاکستر، چربی و پروتئین کل در دو تیمار بافت چرخ شده سر ماهی و پروتئین آبکافتی فریز درای شده (هر تیمار سه تکرار)، به ترتیب با استفاده از آن، کوره الکتریکی، سوکسله و کجدال و طبق روش‌های استاندارد AOAC انجام گرفت (AOAC, 2000).

آبکافت سر ماهی کپور معمولی

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا سر چرخ شده ماهی کپور معمولی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزایی و با آب مقطر با نسبت ۱:۲ (v/w) مخلوط شدند و سپس به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر همگن شدند. به منظور غیر فعال‌سازی آنزیم‌های درونی، نمونه‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (Memert wub 29, Germany) ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. به منظور انجام آزمایش، غلظت آنزیم آلکالاز ۱ درصد (حجمی/وزنی)، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد، pH برابر ۸ و مدت زمان آبکافت نیز ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه در نظر گرفته شد (اسمعیلی خاریکی و همکاران، ۱۳۹۶). پس از انجام فرآیند، جهت غیر فعال‌سازی آنزیم آلکالاز نمونه‌ها در حمام آبی (Memert wub 29, Germany) ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین‌های محلول، سانتریفیوژ (Sigma, 2-16KL) (۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰ g) شدند و قسمت روماندهر نمونه به وسیله سمپلر جدا شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

اندازه‌گیری مقدار پروتئین محلول

مقدار پروتئین محلول (برای ۴ تیمار در زمان‌های مختلف آبکافت و هر تیمار ۳ تکرار) با استفاده از روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) سنجش شد. منحنی استاندارد سنجش پروتئین نیز با استفاده از آلبومین سرم گاوی (۱-۱/۰ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد رسم شد.

تعیین درجه آبکافت (DH)

درجه آبکافت (برای ۴ تیمار در زمان‌های مختلف آبکافت و هر تیمار ۳ تکرار) بر اساس روش Merritt و Hoyle (۱۹۹۴) با

ضایعات، هزینه‌های مالی و زیست محیطی به همراه دارد. یکی از راه‌های کاهش آسیب‌های زیستی ضایعات ماهی، استفاده از آن در قالب پروتئین آبکافتی می‌باشد (Klompong et al., 2007; Raghavan et al., 2008). میزان تولید ماهیان گرم‌آبی در سال ۱۳۹۷، ۱۸۷۳۹۹ تن بوده است (سالنامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۷-۱۳۹۲). ماهی کپور معمولی (C. *carpio*) حدود ۲۵-۳۰ درصد از گونه‌های پرورشی در استخرهای گرم‌آبی ایران را به خود اختصاص می‌دهد (مصباح و همکاران، ۱۳۹۵). امروزه مصرف‌کنندگان ماهی گرایش به سمت مصرف ماهی فیله‌شده و تازه دارند و سر ماهیان تقریباً ۱۹ درصد از فرآورده‌های جنبی ماهی پس از فیله‌شدن را تشکیل می‌دهد (Prihanto et al., 2019)، لذا مدیریت ضایعات حاصل از آن ضروری می‌باشد. مطالعاتی در ارتباط با تولید پروتئین آبکافتی از فریم و سر ماهی کپور معمولی (ریحانی‌پول و جعفرپور، ۱۳۹۶)، تخم ماهی کپور معمولی (قلیچی و همکاران، ۱۳۹۷؛ Chalamaiiah et al., 2015) و پوست ماهی کپور عفلخوار (Wasswa et al., 2007) انجام شده است، اما پژوهشی در مورد تاثیر زمان آبکافت بر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی کپور معمولی با استفاده از آنزیم آلکالاز انجام نشده است، لذا با توجه به مطالب عنوان شده در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

آماده‌سازی نمونه ماهی

برای این منظور ۸ قطعه ماهی کپور معمولی با وزن 0.034 ± 0.0766 کیلوگرم از بازار تهیه و در جعبه‌های یونولیتی به همراه یخ (با نسبت ۱:۳ وزنی/وزنی) به سرعت به آزمایشگاه فرآوری در گروه شیلات دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردیدند. جهت برطرف کردن آلودگی‌ها و موکوس، ماهیان با آب سرد شستشو داده شدند و سپس سر زنی، دم‌زنی و تخلیه محتویات درون شکم ماهیان صورت گرفت. در این تحقیق از سر ماهی کپور معمولی به عنوان ضایعات ماهی در ادامه مراحل تحقیق استفاده شد. سرهای ماهیان با استفاده از چرخ گوشت به طور کامل چرخ شده و پس از بسته‌بندی در کیسه‌های پلاستیکی در دمای فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) تا روز آزمایش نگهداری شدند.

استفاده از محلول تری کلرواستیک اسید (TCA) اندازه گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین آبکافت شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ ترکیب و سپس با دور ۳۰۰۰ به

مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (Sigma, 2-16KL) شد. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری (Lowry, 1951) تعیین و درجه هیدرولیز با معادله ذیل محاسبه شد:

$$100 \times \frac{\text{میزان نیتروژن در محلول } 10\% \text{ تری کلرواستیک اسید}}{\text{درجه آبکافت } (\%) } = \text{میزان نیتروژن در نمونه}$$

سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل -۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH): برای انجام این آزمایش به حجم معینی از محلول نمونه (۴ تیمار در زمان های مختلف آبکافت و ۴ تیمار با غلظت های مختلف پروتئین آبکافتی (در مجموع ۱۶ تیمار) و هر تیمار ۳ تکرار)، همان میزان از محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در متانول اضافه شد. مخلوط حاصل هموزن

(IKA T25-Digital Ultra-Turrax) و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار داده شد و سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال آزاد طبق رابطه ذیل محاسبه گردید (Mishra et al, 2012):

$$\text{DPPH} = \text{درصد مهار} \times \frac{(Ab - As)}{Ab} \times 100$$

Ab: جذب شاهد؛ As: جذب نمونه یا استاندارد (جذب نمونه خوانده شده - جذب رنگ نمونه (۱ میلی لیتر نمونه + ۱ میلی لیتر متانول))

سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در مکان تاریک نگهداری شد. پس از طی زمان مورد نظر، رقیق سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب 0.7 ± 0.02 در طول موج ۷۳۴ نانومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر جذب نمونه ها (۴ تیمار در زمان های مختلف آبکافت و ۳ تیمار با غلظت های مختلف پروتئین آبکافتی (در مجموع ۱۲ تیمار) و هر تیمار ۳ تکرار) در ۷۳۴ نانومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) قرائت شد. به منظور مقایسه نیز از غلظت های مختلف آسکوربیک اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با استفاده از رابطه ذیل محاسبه گردید:

قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی: برای بررسی این شاخص، ۰/۵ میلی لیتر پروتئین آبکافتی (۴ تیمار در زمان های مختلف آبکافت و ۳ تیمار با غلظت های مختلف پروتئین آبکافتی (در مجموع ۱۲ تیمار) و هر تیمار ۳ تکرار) با غلظت های مختلف با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (با pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر محلول پتاسیم فری سیناید ۱ درصد مخلوط شد. سپس ترکیب به دست آمده به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه و متعاقب آن ۲/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس این محلول ۱۰ دقیقه با گردش ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ (Sigma, 2-16KL) و سپس فاز رویی با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی لیتر محلول کلرید فریک ۰/۱ درصد ترکیب شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ نانومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) قرائت گردید. هر چه جذب بیشتر باشد قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی نیز بیشتر است (Ovissipour et al., 2012a).

$$\text{ABTS } 100 \times (\text{جذب نمونه شاهد} / (\text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد})) = \text{درصد مهارکنندگی}$$

نرم افزار SPSS 22 انجام گرفت.

روش تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی با تیمارهای مختلف زمان و غلظت انجام شد و برای تعیین هر شاخص، در هر تیمار، سه تکرار در نظر گرفته شد. پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویلک، مقایسه میانگین‌ها برای تعیین تاثیر زمان آبکافت بر خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی با آنالیز واریانس یک طرفه و برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام آنالیزها با سه بار تکرار انجام گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها با

نتایج

آنالیز تقریبی سر و پودر پروتئین آبکافتی: در آنالیز تقریبی سر و پودر پروتئین آبکافتی حاصل از آن مشخص شد که در پودر پروتئین آبکافتی نسبت به سر درصد پروتئین به طور معنی‌داری افزایش داشت، اما رطوبت، چربی و خاکستر در پودر پروتئین آبکافتی به طور معنی‌داری کاهش یافتند (جدول ۱؛ $p < 0.05$).

جدول ۱: آنالیز تقریبی سر ماهی کپور معمولی و پودر پروتئین آبکافتی (بر حسب درصد وزن ماده خشک)

Table 1: Proximate composition of Common carp head and protein hydrolysate powder (% dry weight)

شاخص	رطوبت (%)	پروتئین (%)	چربی (%)	خاکستر (%)
سر	۷۴/۲۵±۰/۳۵ ^a	۵۸/۳۱±۱/۹ ^b	۱۶/۴۶±۰/۸۷ ^a	۲۷/۱۶±۰/۶۴ ^a
پودر پروتئین آبکافتی	۵/۱۱±۰/۲۳ ^b	۷۵/۲۶±۱/۴۹ ^a	۲/۳۷±۰/۹۷ ^b	۲۵/۳۴±۱/۶۳ ^b

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

پروتئین محلول و درجه آبکافت

بر اساس نتایج، با افزایش مدت زمان آبکافت تا ۱۸۰ دقیقه، میزان پروتئین محلول افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۲؛ $p < 0.05$)، به‌طوری‌که بین زمان‌های ۳۰ و ۶۰ با ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری وجود داشت و بیشترین میزان در زمان

۱۸۰ دقیقه به‌دست آمد ($p < 0.05$)، اما بین زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$) در حالی‌که درجه آبکافت تا زمان ۱۸۰ دقیقه به طور معنی‌داری افزایش یافت و بین تمام زمان‌های مورد بررسی تفاوت معنی‌داری مشاهده شد ($p < 0.05$).

جدول ۲: میانگین پروتئین محلول و درجه آبکافت سر ماهی کپور معمولی در زمان‌های مختلف

Table 2: Mean soluble protein and the degree of hydrolysis of Common carp head at different times

غلظت				زمان (دقیقه)
(میلی گرم/میلی لیتر)				
۳۰	۳۰	۳۰	۳۰	۳۰
۱۸/۳۷±۰/۳۷ ^a	۱۸/۶۴±۰/۲۲ ^a	۲۰/۵۴±۰/۵۸ ^b	۲۳/۰۱±۰/۱۹ ^c	پروتئین محلول (میلی گرم/میلی لیتر)
۳۰/۸۳±۰/۷۶ ^a	۳۸/۹۷±۰/۳۷ ^b	۴۶/۵۹±۰/۷۲ ^c	۴۹/۶۷±۰/۸۶ ^d	درجه آبکافت (%)

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲-دیفینیل ۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH)

نتایج مربوط به سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه و با غلظت‌های ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر پروتئین آبکافتی نشان داد که با افزایش غلظت، درصد مهار رادیکال آزاد افزایش می‌یابد (جدول ۳؛ $p < 0.05$) به‌طوری‌که کمترین میزان قدرت مهارکنندگی در

غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در تمامی زمان‌ها به‌دست آمد و بیشترین میزان قدرت مهارکنندگی در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر حاصل شد. نتایج کلی این آزمایش نشان داد که با افزایش زمان آبکافت میزان قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد ($p < 0.05$)، اما در غلظت ۱/۵ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در بین زمان‌های ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$).

جدول ۳: نتایج حاصل از سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH (بر حسب درصد)

Table 3: The result of DPPH radical scavenging activity (%)

زمان (دقیقه)				غلظت (میلی گرم/میلی لیتر)
۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	
۲۲/۲۴±۱/۶۴ ^{Da}	۱۵/۷۱±۲/۷۱ ^{Ca}	۱۰/۳۴±۱/۶۵ ^{Ba}	۴/۸۸±۰/۳۱ ^{Aa}	۱
۳۰/۹۹±۱/۸۸ ^{Cb}	۲۷/۲۷±۲/۱۵ ^{Cb}	۲۰/۲۱±۲/۳۱ ^{Bb}	۱۶/۹۷±۲/۲۱ ^{Ab}	۱/۵
۵۷/۷۷±۲/۰۱ ^{Dc}	۵۱/۴۹±۱/۶۴ ^{Cc}	۴۵/۹۸±۱/۱۵ ^{Bc}	۲۴/۶۱±۱/۷۱ ^{Ac}	۲
۶۴/۹۹±۲/۱۱ ^{Cd}	۶۳/۱۵±۲/۲۱ ^{Cd}	۵۶/۰۴±۲/۲۱ ^{Bd}	۴۴/۴۳±۲/۲۱ ^{Ad}	۲/۵

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین زمان‌های مختلف و حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف می‌باشند ($p < 0.05$).

آبکافت، قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در تمامی زمان‌ها و غلظت‌ها افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p < 0.05$)، تنها در بین زمان ۶۰ و ۱۲۰ در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت معنی‌دار مشاهده نشد ($p > 0.05$). فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS: قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS با افزایش زمان آبکافت افزایش یافت (جدول ۴؛ $p < 0.05$)، البته بین زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p > 0.05$). با توجه به جدول ۸ روند IC_{50} در زمان‌های مختلف معنی‌دار بوده و با گذشت زمان از مقدار آن کاسته شد ($p < 0.05$).

با توجه به نتایج IC_{50} (جدول ۴)، با افزایش زمان آبکافت، مقدار میلی گرم پروتئین آبکافت شده کمتری برای رسیدن به ۵۰ درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نیاز است ($p < 0.05$). با افزایش غلظت ویتامین C نیز درصد مهار رادیکال آزاد به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۵؛ $p < 0.05$) و مقدار IC_{50} ویتامین C حدود ۱۴ (میکروگرم بر میلی لیتر) بوده که در مقایسه با پروتئین آبکافت شده (۲/۰۸ میلی گرم بر میلی لیتر) بسیار پایین تر بود و نشان می‌دهد که اثر آنتی اکسیدانی ویتامین C بسیار بالا می‌باشد. قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک): نتایج سنجش قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در جدول ۶ ارائه شده است. با افزایش غلظت و زمان

جدول ۴: نتایج حاصل از سنجش قدرت مهارکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH (IC_{50})Table 4: The result of IC_{50} value for DPPH radical scavenging activity

زمان (دقیقه)				IC_{50} (میلی گرم/میلی لیتر)
۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	
۲/۰۸±۰/۰۱ ^a	۲/۳۱±۰/۰۵ ^b	۲/۷۶±۰/۰۶ ^c	۳/۱۴±۰/۳۹ ^d	

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۵: نتایج حاصل از سنجش قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد توسط ویتامین C در غلظت‌های مختلف

Table 5: The result of DPPH radical scavenging activity for vitamin C at different concentrations

غلظت (میکروگرم/میلی گرم)				درصد مهار رادیکال آزاد
۱۰۰	۵۰	۱۰	۱	
۱۰۰±۰/۰۰ ^d	۶۲/۷۷±۰/۰۲۴ ^c	۴۰/۳۳±۲/۲۶۷ ^b	۳/۲۷±۴/۶۴۵ ^a	

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۶: نتایج زمان‌های مختلف آبکافت در غلظت‌های مختلف بر روی قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی

Table 6: The result of different hydrolysis time at different concentrations on ferric ion (Fe^{+3}) reduction power

زمان (دقیقه)				غلظت
۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	(میلی گرم/میلی لیتر)
0.055 ± 0.003^{Ca}	0.041 ± 0.002^{Ba}	0.046 ± 0.014^{Ba}	0.031 ± 0.01^{Aa}	۲
0.151 ± 0.046^{Db}	0.133 ± 0.052^{Cb}	0.115 ± 0.026^{Bb}	0.111 ± 0.048^{Ab}	۴
0.244 ± 0.07^{Dc}	0.236 ± 0.06^{Cc}	0.222 ± 0.037^{Bc}	0.212 ± 0.036^{Ac}	۶

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین زمان‌های مختلف و حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۷: نتایج حاصل از سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS (بر حسب درصد)

Table 7: The result of ABTS radical scavenging activity (%)

زمان (دقیقه)				غلظت
۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	(میلی گرم/میلی لیتر)
23.15 ± 0.99^{Ca}	18.79 ± 1.9^{Ba}	17.0 ± 1.48^{Ba}	11.23 ± 1.32^{Aa}	۲
52.71 ± 1.16^{Db}	49.90 ± 1.12^{Cb}	45.70 ± 1.31^{Bb}	39.53 ± 0.88^{Ab}	۴
79.64 ± 1.01^{Dc}	75.04 ± 0.82^{Cc}	68.79 ± 1.39^{Bc}	58.52 ± 2.34^{Ac}	۶

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین زمان‌های مختلف و حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت‌های مختلف می‌باشد ($p < 0.05$).

جدول ۸: قدرت مهارکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد ABTS (IC_{50})

Table 8: IC_{50} value for ABTS radical scavenging activity

زمان (دقیقه)				غلظت
۱۸۰	۱۲۰	۶۰	۳۰	(میلی گرم/میلی لیتر)
3.52 ± 0.06^a	3.78 ± 0.04^b	4.07 ± 0.07^c	4.99 ± 0.08^d	IC_{50}

* داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p < 0.05$).

بحث

با مطالعات Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹ الف و ۲۰۱۰) در بررسی آبکافت اندرونه تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) و سر ماهی Yellowfin tuna (*T. albacares*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و پروتامکس، Chalamaiah و همکاران (۲۰۱۰) در بررسی بر آبکافت تخم ماهی Meriga (*Cirrhinus meriga*) با آنزیم آلکالاز و پاپائین و Nguyen و همکاران (۲۰۱۲) در بررسی تاثیر تغذیه از جیره‌ی حاوی پروتئین آبکافتی سر ماهی Yellowfin tuna (*T. albacares*) بر رشد میگو، همسو بوده است. مقدار چربی هم در مطالعه حاضر در پروتئین آبکافتی کاهش یافت که ممکن است متاثر از اتصال چربی به پروتئین‌های نامحلول پس از شکسته شدن پیوندهای پپتیدی طی فرایند آبکافت و حذف آنها از طریق برداشتن لایه رسوب باشد (اسمعیلی خارجی و همکاران، ۱۳۹۶؛

آزمایش حاضر نشان داد که مقدار پروتئین در سر ماهی به گونه‌ای است که می‌تواند به عنوان منبعی برای تولید پروتئین آبکافتی مورد استفاده قرار گیرد و پس از آبکافت میزان آن افزایش یافت که دلیل احتمالی این امر، اثر آنزیم در شکستن پیوندهای پروتئینی و حذف ترکیب‌های غیر محلول جامد می‌باشد (Chalamaiah et al., 2010). در مطالعه جوادیان و همکاران (۱۳۹۴) مقدار پروتئین خام ضایعات کلیکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) ۱۵/۵۴ درصد بود که پس از آبکافت با آنزیم پرومود، مقدار پروتئین ۷۸/۹۱ درصد گزارش شد. در نتایج سایر محققین، میزان پروتئین ۴-۹/۸ Kristinsson and Rasco, 2000; Souissi ۶۳ گزارش شد (et al., 2007; Ovissipour et al., 2009a مطالعه حاضر

افزایش یافت. البته ممکن است با افزایش زمان آبکافت به دلیل کاهش غلظت باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم و غیر فعال شدن آنزیم، نرخ آبکافت کاهش یابد (Guerard et al., 2002)، به همین دلیل لازم است بهینه زمان آبکافت با بررسی نتایج حاصل از زمان‌های مختلف تعیین گردد.

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است و زمانی که از یک آنتی اکسیدان الکترون دریافت کند مهار می‌شود (Shimada et al., 1992). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش زمان تا ۱۸۰ دقیقه و افزایش غلظت تا ۳ میلی گرم بر میلی لیتر میزان مهارکنندگی نیز افزایش یافت و کمترین مقدار IC₅₀ مربوط به زمان ۱۸۰ دقیقه بود. مطالعه Kusumaningtyas و همکاران (۲۰۱۹) بر آبکافت کلاژن milkfish (*Chanos chanos*) با آنزیم آلکالاز نشان داد که با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه نسبت به ۳۰ دقیقه میزان مهارکنندگی DPPH افزایش یافت. در نتیجه، اثر زمان آبکافت بر عملکرد آنتی اکسیدانی مثبت ارزیابی شد. نتایج Nalinanon و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که در درجه آبکافت ۲۰ درصد نسبت به ۱۰ درصد قدرت مهار رادیکال DPPH افزایش پیدا کرد، همچنین بیشترین مهار رادیکال آزاد در غلظت $0.24 \pm 8/58$ میکرومولار مشاهده شد. در مطالعه Yang و همکاران (۲۰۰۹) سر ماهی Bigeye tuna (*Thunnus obesus*) با استفاده از آلکالاز به مدت ۳۴۰ دقیقه مورد آبکافت قرار گرفت و نتایج نشان داد در غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر میزان مهارکنندگی DPPH $1/26 \pm 86/67$ درصد گزارش شد و همچنین با افزایش غلظت میزان مهارکنندگی نیز افزایش یافت. در مطالعه اسمعیلی خاریکی و همکاران (۱۳۹۶) بر آبکافت سر ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) مشخص شد که با افزایش درجه آبکافت تا ۱۲۰ دقیقه اثر مهارکنندگی DPPH نیز افزایش پیدا کرد و با افزایش غلظت نیز مهارکنندگی DPPH افزایش یافت به طوری که در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر بیشترین فعالیت مهارکنندگی مشاهده شد. به طور کلی، فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال متأثر از عوامل مختلفی همانند درجه آبکافت، مدت زمان آبکافت، ترکیب آمینواسیدی، اندازه و وزن مولکولی پپتیدها و توالی آمینواسیدها می‌باشد (Bougatef et al., 2010). بخشان و همکاران (۱۳۹۳) گزارش کردند که مدت زمان آبکافت ممکن است در افزایش شکست گروه‌هایی که باعث تسهیل واکنش میان پپتیدها و رادیکال‌های آزاد، گونه‌های واکنش پذیر اکسیژن و یون‌های فلزی می‌شوند، تأثیر مستقیم داشته باشد. علاوه بر این، تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب

Ovissipour et al., 2009a) و نتایج حاصل با گزارش Kristinsson و Rasco (۲۰۰۰) در ارتباط با هیدرولیز ماهی و خواص آن، Dong و همکاران (۲۰۰۸) و Ovissipour و همکاران (۲۰۱۰) بر روی آبکافت سر ماهی Yellowfin tuna (*T. albacares*) با استفاده از آلکالاز و پروتامکس همسو بوده است. مقدار خاکستر هم پس از آبکافت مقداری کاهش یافت که می‌تواند متأثر از حذف رسوبات و استخوان‌ها باشد، در مطالعه بخشان و همکاران (۱۳۹۳) مقدار خاکستر قبل از آبکافت و پودر پروتئین آبکافتی تفاوت معنی‌داری نداشت، در مطالعه Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹a) نیز میزان پروتئین و خاکستر در پودر پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء تاس ماهی ایرانی (*A. persicus*) نسبت به امعاء و احشاء افزایش، میزان چربی و رطوبت کاهش یافت. در مطالعه یعقوب‌زاده و همکاران (۱۳۹۸) نیز میزان پروتئین و چربی در پروتئین آبکافتی حاصل از پوست ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) به ترتیب افزایش و کاهش یافت.

میزان پروتئین محلول در طول ۱۸۰ دقیقه روندی افزایشی داشت و بیشترین میزان پروتئین بدست آمده در زمان ۱۸۰ دقیقه $23/01 \pm 0/19$ میلی گرم بر میلی لیتر بوده است. همچنین مطالعه حاضر با تحقیقات اسمعیلی خاریکی و همکاران (۱۳۹۶) بر آبکافت سر ماهی هور مسقطی و Hsu (۲۰۱۰) همسو بوده است. تفاوت در میزان پروتئین محلول به دست آمده می‌تواند به دلیل تفاوت سوپسترا و بافت مورد نظر به منظور آبکافت باشد.

در مطالعه حاضر، با افزایش زمان تا ۱۸۰ دقیقه میزان درجه آبکافت روندی افزایشی داشت. در مطالعه Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) که آبکافت ضایعات حاصل از ساردین مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که با افزایش زمان تا ۱۵۰ دقیقه روند درجه آبکافت افزایشی بوده است و دلیل این امر به فعالیت آنزیمی بیشتر در این مدت زمان و بیشتر بودن باندهای پپتیدی در زمان‌های اولیه نسبت داده شد. در مطالعه حسینی و همکاران (۱۳۹۱) بر آبکافت سر ماهی فیتوفاگ مشخص شد که با افزایش زمان تا ۴ ساعت میزان پروتئین محلول و درجه آبکافت افزایش یافت، ولی با افزایش زمان بیش از ۴ ساعت از شدت درجه آبکافت کاسته شده بود. در مطالعه یاسمی و همکاران (۱۳۹۲) بر آبکافت امعاء و احشاء ماهی کپور سرگنده با آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و پاپائین، میزان درجه آبکافت تا ۶۰ دقیقه روندی افزایشی داشت. در مطالعه Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹الف) نیز با افزایش زمان آبکافت تا ۲۰۵ دقیقه در دمای ۴۵ و ۵۵ درجه سانتی‌گراد، درجه هیدرولیز نیز

اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر فعالیت آنتی اکسیدانی تأثیر می‌گذارد. پپتیدهای با اندازه کوتاه‌تر تأثیر گسترده‌تری بر فعالیت آنتی اکسیدانی دارند و با درجه آبکافت بیشتر این امر حاصل می‌گردد، ولی در نهایت، توالی پپتیدها، ترکیب و درصد آبگریز بودن آنها خصوصیات آنتی اکسیدانی پپتیدهای جداسازی شده را مشخص می‌کند (Je et al., 2004; Ren et al., 2007; et al., 2008).

قدرت کاهندگی یون آهن شاخص دیگری است که تحت تأثیر درجه آبکافت تغییر می‌کند (اسمعیلی خاریکی و همکاران، ۱۳۹۶). تمام غلظت‌های مورد بررسی پروتئین آبکافت شده سر ماهی کپور معمولی در مطالعه حاضر خاصیت کاهندگی یون آهن را داشتند و بیشترین اثر کاهندگی مربوط به زمان ۱۸۰ دقیقه در غلظت ۶ میلی گرم بر میلی لیتر 0.244 ± 0.07 می‌باشد. افزایش قدرت کاهندگی، می‌تواند نشان از افزایش اهداء هیدروژن یا الکترون باشد، همچنین تغییر در اندازه، ساختار، تعداد آمینواسید و پپتیدها در اثر گذشت زمان و افزایش درجه آبکافت، بر کاهندگی یون آهن تأثیرگذار است (Bougatef et al., 2010). در مطالعه Yang و همکاران (۲۰۰۹) توانایی کاهندگی یون آهن پروتئین آبکافت شده ماهی تن (*Thunus obesus*) در غلظت ۲، ۵ و ۱۲ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب ۰/۲۱۴، ۰/۵۳۴ و ۰/۹۴۸ بوده است که با افزایش غلظت، قدرت کاهندگی یون آهن فریک افزایش پیدا کرد. در مطالعه اسمعیلی خاریکی و همکاران (۱۳۹۶) بر آبکافت سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) مشخص شد که با افزایش درجه آبکافت تا زمان ۲۴۰ دقیقه قدرت کاهندگی یون آهن نیز افزایش یافت. خصوصیات پپتیدهای جداسازی شده از پروتئین آبکافتی مانند توالی و ترکیب آمینواسیدهای آن‌ها در آبکافت‌های مختلف متغیر است و ممکن است خاصیت کاهندگی یون فلزی از طریق اهداء هیدروژن یا دادن الکترون را تحت تأثیر قرار دهد. برای مثال، اسید آمینه‌های آبگریز از جمله هیستیدین، پرولین، متیونین، سیستئین، تیروزین و فنیل آلانین فعالیت آنتی اکسیدانی پپتیدها را بهبود می‌بخشند (Je et al., 2007; Ren et al., 2008; You et al., 2009, 2010). همچنین Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) نیز عنوان کردند که طول زنجیره پپتیدی، قدرت کاهندگی آهن پروتئین آبکافتی ساردین را تحت تأثیر قرار می‌دهد.

سنجش توانایی مهار رادیکال ABTS یک روش رنگ‌سنجی است و ابزاری عالی برای تعیین فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیب‌های اهدا کننده هیدروژن (مهارکنندگی رادیکال‌های فاز

آبی) و آنتی اکسیدان‌های شکننده زنجیره (شکستن رادیکال‌های پراکسید لیپید) است (Nalinanon et al., 2011). در مطالعه حاضر با افزایش زمان، اثر آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت شده سر ماهی کپور معمولی نیز به طور معنی‌داری افزایش یافت. زمان ۱۸۰ دقیقه در هر غلظت بهترین اثر آنتی اکسیدانی را در تست ABTS داشت که دلیل آن احتمالاً افزایش توانایی پپتیدهای زیست‌فعال در مهار رادیکال آزاد با افزایش درجه آبکافت می‌باشد. همچنین وجود آمینواسیدهای آبگریز در پپتیدها و پروتئین‌های آبکافت شده، منجر به افزایش فعالیت آنتی اکسیدانی می‌شود (Nalinanon et al., 2011). در مطالعه Kusumaningtyas و همکاران (۲۰۱۹) بر آبکافت کلاژن *milkfish* (*C. chanos*) با آنزیم آلکالاز مشخص شد که با افزایش زمان تا ۶۰ دقیقه نسبت به ۳۰ دقیقه، میزان مهارکنندگی ABTS افزایش یافت و در زمان ۶۰ دقیقه ۹۶/۲۴ درصد گزارش شد. در نتیجه اثر زمان آبکافت بر عملکرد آنتی اکسیدانی مثبت ارزیابی شد. در مطالعه Foh و همکاران (۲۰۱۰) مقدار ۵ میلی گرم بر میلی لیتر از پروتئین آبکافت فریز درایر شده گوشت چرخ‌شده ماهی تیلپایا (*Oreochromis niloticus*) قادر بود 97.21 ± 0.25 درصد خاصیت مهار کنندگی ABTS از خود نشان دهد. در مطالعه اسمعیلی خاریکی و همکاران (۱۳۹۶) بر آبکافت سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) نتایج نشان داد که با افزایش درجه آبکافت تا ۲۴۰ دقیقه اثر مهارکنندگی ABTS نیز افزایش یافته و با افزایش غلظت نیز مهار کنندگی ABTS افزایش یافت به طوری که در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر (۵۵ درصد) دارای بیشترین مهارکنندگی بود. پپتیدهای مختلف با اندازه مولکولی و توالی‌های آمینواسیدی متفاوت، ممکن است فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتی نیز از خود نشان دهند (Nalinanon et al., 2011).

به طور کلی، آنتی اکسیدان‌ها با مهار رادیکال آزاد به طرق مختلف از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری به عمل می‌آورند. از آنجایی که ترکیب و کیفیت پپتیدهای حاصل از آبکافت از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد و در نهایت مشخص‌کننده فعالیت آنتی اکسیدانی است، روش آبکافت و نوع آنزیم جهت انجام این فرآیند حائز اهمیت است. در تحقیق حاضر که از آنزیم الکالاز برای آبکافت سر ماهی کپور معمولی در زمان‌های مختلف استفاده گردید، فرآیند آبکافت به‌ویژه در زمان ۱۸۰ دقیقه توانست تأثیر مطلوبی بر کیفیت پروتئین آبکافتی تولیدی بگذارد که این امر از طریق انجام آزمایش‌های مربوط به فعالیت

حسینی، ش.، غرق، ا.، جمال زاده، ح.، صفری، ر. و حسینی، ش. ۱۳۹۱. مقایسه پروتئین هیدرولیز شده از اندرونه و سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم های داخلی بافت. مجله علمی شیلات ایران، ۳: ۶۲-۵۵.

خواجوی، س.، زکی پور رحیم آبادی، ا.، غفاری مقدم، م.، شهرکی، ه.، میر، ل. و زند کریمی، م. ۱۳۹۵. اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتیاکسیدانی هیدرولایزات پروتئین (*Schizothorax zarudnyi*) ضایعات ماهی شیزوتراکس. شیلات (مجله منابع طبیعی ایران)، ۶۹(۳): ۳۵۱-۳۵۸.

ریحانی پول، س. و جعفرپور، ۱۳۹۶. اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولید شده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). علوم و صنایع غذایی، ۶۸(۱۴): ۱۲۴-۱۱۳.

سال نامه آماری سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۷-۱۳۹۲. معاونت برنامه ریزی و مدیریت منابع، ۶۴ صفحه.

علی نژاد، م.، معتمدزادگان، ع. و رضایی، م. ۱۳۹۵. خواص کاربردی و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده کوسه چاته سفید (*Carcharhinus dussumieri*). فصل نامه علوم و صنایع غذایی، ۵۰(۱۳): ۱۶۹-۱۵۹.

قلیچی، س.، شعبان پور، ب. و پورعاشوری، پ. ۱۳۹۷. ترکیب تقریبی و آمینواسیدی، قدرت آنتی اکسیدانی، قدرت مهارکنندگی آنزیم مبدل آنژیوتانسین و قدرت ضدباکتریایی پروتئین هیدرولیز شده تخم ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز. نشریه علوم و فنون شیلات، ۷(۲): ۱۵۵-۱۴۵.

مصباح، م.، محمدی، ق.، خواجه، غ. و مبنی، آ. ۱۳۹۵. بررسی خصوصیات فیزیکوشیمی مایع منی کپور معمولی پرورشی استان خوزستان در فصل زمستان، مجله دامپزشکی ایران، ۴: ۱۱۷-۱۰۹.

یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب. و امینی، ه. ۱۳۹۲. مقایسه راندمان بازیافت و درجه هیدرولیز پروتئین های موجود در امعا و احشای ماهی کپور سرگنده (*Aristichthys nobilis*) با استفاده از آنزیم. مجله علمی شیلات ایران، ۱: ۱۵۶-۱۴۹.

یعقوب زاده، ز.، کابوسی، ح.، پیروی قادیکلایی، ف.، صفری، ر. و فتاحی، ا. ۱۳۹۸. بررسی خواص ضد باکتریایی و آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده پوست ماهی قزل آلا رنگین کمان (*Oncorhynchus mykiss*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۸(۲): ۱۱۷-۱۲۸.

آنتی اکسیدانی از جمله حذف رادیکال های آزاد DPPH و ABTS و قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در این مطالعه تایید شد. بنابراین، به نظر می رسد آبکافت سر ماهی کپور معمولی به کمک آنزیم آلکالاز در زمان ۱۸۰ دقیقه بتواند به استفاده بهینه از ضایعات و محصولات جنبی منجر شود و علاوه بر صرفه اقتصادی، با تولید ترکیبی با ویژگی آنتی اکسیدانی، بیشترین استفاده را از این محصولات جنبی فراهم آورد و در نهایت، با توجه به عملکرد آنتی اکسیدانی بالای این محصول، امکان استفاده از این مواد در مواد غذایی، جیره دام، طیور و آبزیان به منظور حفظ سلامت و ارتقاء کیفیت محصولات حاصل از آن ایجاد گردد.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری بخاطر حمایت از انجام طرح (کد طرح: ۰۲-۱۳۹۸-۰۳) سپاسگزاری می نمایند.

منابع

اسمعیلی خاریکی، م.، رضایی، م.، خدابنده، ص. و معتمدزادگان، ع. ۱۳۹۶. فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*)، نشریه علوم و فنون شیلات، ۷(۱): ۶۴-۵۷.

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

بخشان، ع.، عزیززاده دوغی کلایی، ا. و طاهری، ع. ۱۳۹۳. بررسی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین آبکافت به دست آمده از ضایعات در فرایند فیله کردن ماهی آزاد (*Salmo salar*) پاتوبیولوژی مقایسه ای علمی پژوهشی، ۱: ۱۱۵۲-۱۱۴۳.

جوادیان، س.، روشن، ع.، اویسی پور، م.، کشاورز، م. و نعمتی، م. ۱۳۹۴. بهینه سازی تولید پروتئین هیدرولیز شده کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) با استفاده از آنزیم پرومود. مجله علمی پژوهشی زیست شناسی دریا، ۲۶: ۹۰-۸۳.

- Ahn, C.B., Lee, K.H. and Je, J.Y., 2010.** Enzymatic production of bioactive protein hydrolysates from tuna liver: effects of enzymes and molecular weight on bioactivity. *International Journal of Food Science and Technology*, 45(3): 562-568. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2009.02166.x
- 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(2): 407-413. DOI: 10.1016/j.lwt.2010.09.003
- Amza, T., Balla, A., Tounkara, F., Man, L. and Zhou, H.M., 2013.** Effect of hydrolysis time on nutritional, functional and antioxidant properties of protein hydrolysates prepared from gingerbread plum (*Neocarya macrophylla*) seeds. *International Food Research Journal*, 20(5): 2081-2090.
- AOAC., 2000.** Official Methods of Analysis, Washington, DC. USA, Association of Analytical Chemists.
- 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
- Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D. and Nasri, M., 2010.** Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food Chemistry*, 118: 559-565. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.05.021
- Chai, T.T., Tong, S.R., Law, Y.C., Ismail, N.I.N. and Wong, F.C., 2015.** Anti-oxidative, metal chelating and radical scavenging effects of protein hydrolysates from blue-spotted stingray. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 14(8): 1349-1355. DOI: 10.4314/tjpr.v14i8.5
- Chalamaiah, M., Narsing Rao, D.G., Rao, D.G. and Jyothirmayi, T., 2010.** Protein hydrolysates from meriga (*Cirrhinus mrigala*) egg and evaluation of their functional properties. *Food Chemistry*, 120(1): 652-657. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.10.057
- Chalamaiah, M., Kumar, D., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012.** Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food Chemistry*, 135(4): 3020-3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100
- Chalamaiah, M., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V. and Kumar, B.D., 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
- Dekkers, E., Raghavan, S., Kristinsson, H.G. and Marshall, M.R., 2011.** Oxidative stability of mahi mahi red muscle dipped in tilapia protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 124: 640-645. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.06.088.
- Dong, S.Y., Zeng, M.Y., Wang, D.F., Liu, Z.Y., Zhao, Y.H. and Yang, H.C., 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
- FAO, 2016.** Global aquaculture production (fish stat), <http://www.fao.org/3/a-i5555e.pdf>.
- Foh, M.B.K., Qixing, J., Amadou, I. and Xia, W.S., 2010.** Influence of ultrafiltration on

- antioxidant activity of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 2(5): 227-235.
- García-Moreno, P.J., Batista, I., Pires, C., Bandarra, N.M., Espejo-Carpio, F.J., Guadix, A. and Guadix, E.M., 2014.** Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International*, 65: 469-476. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.061
- Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002.** Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 19–20: 489–498. DOI: 10.1016/S1381-1177(02)00203-5
- Hoyle, N.T. and Merritt, J.H., 1994.** Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59: 76–79. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1994.tb06901.x
- Hsu, K.C., 2010.** Purification of antioxidative peptides prepared from enzymatic hydrolysates of tuna dark muscle by-product. *Food Chemistry*, 122(1): 42-48. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.02.013
- Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G. and Kim, S.K., 2007.** Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. *Process Biochemistry*, 42(5): 840-846. DOI: 10.1016/j.procbio.2007.02.006
- Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z.H. and Liao, D., 2014.** Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 154(1): 158-63. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.074
- Jun, S.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
- Kim, J. and Kim, S.K., 2013.** Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics. *Current Protein and Peptide Science*, 14(3): 177-182. DOI: 10.2174/13892037113149990039
- 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
- Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A. 2000.** Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48: 657-666. DOI: 10.1021/jf990447v
- Kusumaningtyas, E., Nurilmala, M. and Sibarani, D., 2019.** Antioxidant and antifungal activities of collagen hydrolysates from skin of milkfish (*Chanos chanos*) hydrolyzed using various bacillus proteases. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 278(1): 1-8. DOI: 10.1088/1755-1315/278/1/012040
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J., 1951.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193: 265-275.
- Mishra, K., Ojha, H. and Chaudhury, N.K., 2012.** Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical

- review and results. *Food Chemistry*, 130: 1036-1043. DOI: 10.1016/j.foodchem.2011.07.127
- Nalinanon, S., Benjakul, S., Kishimura, H. and Shahidi, F., 2011.** Functionalities and antioxidant properties of protein hydrolysates from the muscle of ornate threadfin bream treated with pepsin from skipjack tuna. *Food Chemistry*, 124(4): 1354-1362. DOI: 10.1016/j.foodchem.2010.07.089
- Nguyen, H.T.M., Pérez-Gálvez, R. and Bergé, J.P., 2012.** Effect of diets containing tuna head hydrolysates on the survival and growth of shrimp *Penaeus vannamei*. *Aquaculture*, 324: 127-134. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2011.11.014
- Ovissipour, M., Abedian, A.M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R. and Shahiri, H., 2009a.** The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, 115: 238-242. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.013
- Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E. and Esmaili Mulla, A., 2009b.** Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) fisheries by-products as a nitrogen source for bacteria growth media. *International Aquatic Research*, 1: 73-77.
- Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A. and Rasco, B., 2009c.** Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste protein of beluga (*Huso huso*) using alcalase. *International Aquatic Research*, 1: 31-38.
- Ovissipour, M., Benjakul, S., Safari, R. and Motamedzadegan, A., 2010.** Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) head using Alcalase and Protamex. *International Aquatic Research*, 2: 87-95.
- Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M., 2012a.** Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93(7): 1718-1726. DOI: 10.1002/jsfa.5957
- 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(2): 460-465. DOI: 10.1007/s11947-009-0284-x
- Prihanto, A.A., Nurdiani, R. and Bagus, A.D., 2019.** Production and characteristics of fish protein hydrolysate from parrot fish (*Chlorurus sordidus*) head. *PeerJ*, 7:e8297. DOI: 10.7717/peerj.8297
- Raghavan, S., Kristinsson, H.G. and Leeuwenburgh, C., 2008.** Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56: 10359-10367. DOI: 10.1021/jf8017194
- Rajapakse, N., Jung, W.K., Mendis, E., Moon, S.H. and Kim S.K., 2005.** A novel anticoagulant purified from fish protein hydrolysates inhibits factor XIIa and platelet aggregation. *Life Science*, 76(22): 2607-2619. DOI: 10.1016/j.lfs.2004.12.010
- Ren, J., Zhao, M., Shi, J., Wang, J., Jiang, Y., Cui, C., Kakuda, Y. and Xue, S.J., 2008.** Purification and identification of antioxidant peptides from grass carp muscle hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass

- spectrometry. *Food Chemistry*, 108: 727–736. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.010
- Shahidi, F. and Zhong, Y., 2008.** Bioactive peptides. *The Journal of AOAC International*, 91(4): 914-31.
- Shimada, T., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992.** Antioxidant properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40: 945–948. DOI: 10.1021/jf00018a005
- Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007.** Biochemical and functional properties of *Sardinella* (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45: 187-194.
- Surai, P., 2002.** Selenium in poultry nutrition I. Antioxidant properties, deficiency and toxicity. *Worlds Poultry Science Journal Wyton*, 58: 333-348. DOI: 10.1079/WPS20020026
- Wasswa, J.B., Tang, J., Gu, X.H., and Yuan, X.G., 2007.** Influence of the extent of enzyme hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Food Chemistry*, 104(4): 1698-1704. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.044
- Yang, J.I., Liang, W.S., Chow, C.J. and Siebert, K.J., 2009.** Process for the production of tilapia retorted skin gelatin hydrolysates with optimized antioxidative properties. *Process Biochemistry*, 44(10): 1152-1157. DOI: 10.1016/j.procbio.2009.06.013
- You, L., Zhao, M., Cui, C., Zhao, H. and Yang, B., 2009.** Effect of degree of hydrolysis on the antioxidant activity of loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysates. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 10: 235–240. DOI: 10.1016/j.ifset.2008.08.007
- You, L., Zhao, M., Regenstein, J.M. and Ren, J., 2010.** Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Research International*, 43: 117–1173. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.02.009.

Effect of hydrolysis time on the antioxidant activity of Common carp (*Cyprinus carpio*) head protein hydrolysate

Yeganeh S.^{1*}; Esmaeili Kharyeki M.¹; Ahamdi H.¹

*s.yeganeh@sanru.ac.ir; skyeganeh@gmail.com

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

Abstract

In the present study, the antioxidant activity of different concentrations of protein hydrolysate from Common carp (*Cyprinus carpio*) head at different hydrolysis time was investigated. For this purpose, 8 Common carp fish with average weight of 0.766 ± 0.034 kg were prepared from market. Fish heads were hydrolyzed by Alcalase (1% v/w at 55°C and pH 8) at different hydrolysis times (30, 60, 120 and 180 min). The result of proximate analysis showed that the protein content increased significantly (from 58.31 ± 1.9 to $75.26 \pm 1.49\%$) as a result of hydrolysis, while the amount of fat and ash decreased significantly (from 16.46 ± 0.87 to $2.37 \pm 0.97\%$; from 27.16 ± 0.64 to $25.34 \pm 1.63\%$, respectively, $p < 0.05$). Also, as the duration of hydrolysis increased, the amount of soluble protein and the degree of hydrolysis increased significantly, so that the highest soluble protein 23.01 ± 0.19 mg/ml and the highest degree of hydrolysis $49.67 \pm 0.86\%$ were obtained at the time of 180 min. DPPH radical scavenging activity of protein hydrolysate showed significant increasing trend at different hydrolysis times and different concentrations ($p < 0.05$). The optimum time for DPPH radical scavenging activity (DPPH) was determined at 180 min and IC_{50} value was obtained 2.08 mg/ml. In addition, with increasing concentration and duration of hydrolysis, the ferric ion reduction power and ABTS radical scavenging activity increased significantly ($p < 0.05$). In general, due to the proper activity of different concentrations of Common carp head protein hydrolysate on DPPH and ABTS radicals scavenging and reduction of ferric ion, it can be stated that this protein hydrolysate can be considered as a dietary supplement with desirable antioxidant function.

Keywords: Protein hydrolysate, Antioxidant activity, Common carp head, Free radical scavenging, Ferric ion reduction power

*Corresponding author