شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۳، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۹
صفحات ۶۰۶-۵۹۳

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)

حامد احمدی[۱]، سکینه یگانه[۲*]، مینا اسمعیلی خاریکی[۳]

۱. *دانش‌آموخته کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ایران*
۲. *دانشیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران، ساری*
۳. *استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران*

تاریخ ارسال: ۱۳۹۹/۰۸/۱۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۹/۱۵

چکیده

مواد غذایی حاوی چربی و به ویژه غذاهای دریایی نسبت به فساد اکسیداتیو آسیب‌پذیرند، بنابراین نگهداری و حفظ کیفیت آن‌ها با روش‌های مقرون به صرفه امری حیاتی است. هدف از این مطالعه تولید یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی از ضایعات ماهی بود، تا هم از دور ریز این ضایعات در محیط زیست جلوگیری شود و هم بتوان محصولی ارائه کرد که قابلیت استفاده در صنایع غذایی را داشته باشد. برای این منظور امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) با آنزیم آلکالاز (غلظت ۱ درصد، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸) در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت شد و عملکرد آنتی‌اکسیدانی آن مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج نشان داد که پروتئین آبکافتی حاصل از زمان ۱۸۰ دقیقه به طور معنی‌داری درجه آبکافت بالاتر و عملکرد آنتی‌اکسیدانی بهتری نسبت به زمان‌های ۳۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه داشت ($P<0/05$). بالاترین درجه آبکافت در زمان ۱۸۰ دقیقه ۵۶/۶۶±۰/۱۸ درصد بود. با توجه به نتایج حاصل از سنجش عملکرد آنتی‌اکسیدانی، مقادیر IC_{50} در بررسی قدرت مهار رادیکال‌های DPPH و ABTS در زمان ۱۸۰ دقیقه، به ترتیب ۱/۳۴±۰/۰۱ و ۱/۹۲±۰/۰۲۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد و قدرت کاهندگی آهن نیز ۰/۲۶۱±۰/۰۱ (میزان جذب (OD) در طول موج ۷۰۰ نانومتر) بود. به طور کلی، نتایج نشان داد که پروتئین آبکافت‌شده حاصل از امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی دارای ویژگی آنتی‌اکسیدانی بود و مدت زمان آبکافت (تا ۱۸۰ دقیقه) بر درجه آبکافت و ویژگی آنتی‌اکسیدانی موثر بود.

کلمات کلیدی: پروتئین آبکافتی، آلکالاز، عملکرد آنتی‌اکسیدانی، امعاء و احشاء ماهی، کپور معمولی

* نویسنده مسئول: سکینه یگانه
Email: s.yeganeh@sanru.ac

Journal of Fisheries
Vol. 73, No. 4, Winter 2020
pp. 593-606

Investigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera

Hamed Ahamdi[1], Sakineh Yeganeh[2*], Mina Esmaeili Kharyeki[3]

1. M.Sc. graduated, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.
2. Associate Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.
3. Assisstant Professor, Department of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Received: 05-Nov-2019 **Accepted: 06-Dec-2020**

Abstract

Lipid-containing Food and specially seafood products are vulnerable to oxidative deterioration, so it is vital to maintain its quality with different ways that are cost-effective. The aim of this study was to produce an antioxidant compound from fish by-product, in order to prevent the disposal of this by-product in the environment and to provide a product that can be used in the food industry. For this purpose, the viscera of common carp (*Cyprinus carpio*) was hydrolyzed with alcalase enzyme (concentration 1%, temperature 55 ° C and pH 8) at different times including 30, 60, 120 and 180 minutes and their antioxidant activity were compared**.** The results showed that the protein hydrolysate obtained after 180 minutes of hydrolysis, had significantly higher degree of hydrolysis and better antioxidant performance than 30, 60 and 120 minutes ($P < 0.05$) The highest degree of hydrolysis was 56.66± 0.18%. According to the results of antioxidant activity, IC_{50} values of DPPH and ABTS radical scavenging power at 180 minutes were 1.34±0.01 and 1.92±0.026 (mg/ml), respectively, and iron reducing power was 0.261±0.01 (OD at 700 nm). Overally, the results showed the protein hydrolysate derived from common carp viscera had antioxidant properties and the hydrolysis time (up to 180 min) affected on degree of hydrolysis and antioxidant properties.

Keywords: Protein hydrolysate, Alcalase, Antioxidant properties, Fish viscera, Common carp

Corresponding author: Sakineh Yeganeh Email: s.yeganeh@sanru.ac

۱. مقدمه

بر اساس آمارها و گزارش‌های تحلیلی FAO در سال ۲۰۱۶ تولید آبزیان از طریق دو منبع صید و آبزی‌پروری به مرز ۱۷۰/۹ میلیون تن رسیده است. گزارشها حاکی از آن است که رشد آبزی‌پروری از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۱۶ حدود ۵/۸ درصد بوده است که بیشترین رشد را در بین بخش‌های اصلی مربوط به غذا دارا ست. سرانه مصرف آبزیان در جهان در سال ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ به‌ترتیب ۲۰/۳ و ۲۰/۵ کیلوگرم گزارش شد. از میزان صید سالانه جهانی، مقدار ۱۹/۷ میلیون تن آن برای مصارف غیر غذایی استفاده شده‌اند (FAO, 2018). در ایران، بر اساس سال‌نامه آماری سازمان شیلات ایران در سال ۱۳۹۷، میزان سرانه مصرف به میزان ۱۲/۱ کیلوگرم رسید که ماهیان گرم‌آبی میزان ۱۸۷۳۹۹ تن تولید را تشکیل دادند (Statistical Year Book of the Fisheries Organization, 2013-2018.).

در روند تولید و فرآوری آبزیان، مقادیر زیادی ضایعات (حدود ۶۰درصد وزن ماهی) تولید می‌شود (Ovissipour *et al*., 2010) که این ضایعات عمدتاً شامل سر، امعاء و احشاء، پوست، استخوان‌ها و فلس ها اند و امعاء و احشاء ماهی درصد بالایی از آن را به خود اختصاص می‌دهد. این محصولات جنبی غنی از پروتئین و چربی هستند که می‌توانند به منظور تولید ترکیبات با ارزش همانند روغن ماهی، سوخت زیستی، آنزیم‌ها، اسیدهای چرب امگا، پروتئین آبکافت شده و پپتیدهای زیست فعال مورد استفاده قرار گیرند (Phadke *et al*., 2016). پروتئین‌ها ترکیبات ضروری بافت موجودات زنده هستند که در فرآیندهای فیزیولوژیک متعددی در سلول‌ها نقش داشته و به عنوان منبع انرژی و تامین اسیدهای آمینه مورد نیاز برای رشد و نگهداری بدن محسوب می شوند (Shahidi and Zhong, 2008). بسیاری از خواص فیزیولوژیک و کارکردی پروتئین‌ها مرتبط با پپتیدهای زیست فعال موجود در ساختارشان است که می‌توانند با استفاده از روش‌های مختلف فرآوری، آزاد شده و فعالیت فیزیولوژیک را نشان دهند (Ahn *et al*., 2012).

در گذشته آبکافت پروتئین‌های غذایی بیشتر در مورد پروتئین‌های گیاهی و شیر بود و اولین پروتئین آبکافت‌شده‌ی تجاری در سال ۱۹۴۰ وارد بازار گردید، اما پژوهش‌های مربوط به پروتئین آبکافت‌شده ماهی در دهه‌ی ۱۹۶۰ انجام شد که هدف اصلی آن آبکافت کردن ضایعات ماهی برای کسب حداکثر بازیافت اجزاء قابل دسترس با حفظ کیفیت بالا (درجه آبکافت و میزان پروتئین بالا) بود (Hosseini *et al*., 2010).

آنزیم‌های مورد استفاده برای آبکافت آنزیمی از منابع مختلف گیاهی مثل آنزیم پاپائین (Yasemi *et al*., 2013) یا جانوری مانند تریپسین (Bakhshan *et al*., 2014) و پپسین (Khafaeizadeh *et al*., 2016) و یا میکروبی با منشا باکتریایی مانند آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم (Ovissipour *et al*., 2010) و پرومود (Roshan *et al*., 2015) استخراج می‌شوند که از این بین آنزیم‌های میکروبی به دلیل تنوع فعالیت کاتالیتیکی و پایداری بیشتر در pH و دمای بالا، برتری‌های خاصی نسبت به آنزیم‌های دیگر دارند (Hosseini *et al*., 2010).

پپتیدهای زیست‌فعال دارای عملکردهای زیستی متنوع از جمله تقویت سیستم ایمنی، خاصیت ضد میکروبی، ضد انعقادی، ضد سرطان و ضد دیابت و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2018). پروتئین آبکافتی که حاوی پپتیدهای زیست‌فعال است نیز دارای خواص ذکر شده اند. تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد. پپتیدهای با اندازه کوتاه‌تر تاثیر گسترده‌تری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و با درجه آبکافت بیشتر این امر حاصل می‌گردد. تغییر در درجه آبکافت هم متاثر از زمان، دما و نوع سوبسترا است، ولی در نهایت، ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها، و درصد آبگریز بودن آن‌ها خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای جداشده را مشخص می‌کند (Je *et al*., 2005).

آنتی‌اکسیدان‌ها موادی هستند که آسیب اکسیداتیو را به تاخیر انداخته و یا از آن ممانعت می‌کنند و به دو

دسته آنزیمی و غیر آنزیمی تقسیم می‌شوند (Khalili and Ebrahimzadeh, 2015) و می‌توانند طبیعی و یا مصنوعی باشند (Phadke *et al*., 2016). آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ویتامین C، ویتامین E، گلوتاتیون، اسید لیپوئیک، اسید اوریک، کاروتن، ملاتونین و ... آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول، بوتیل هیدروکسی تولوئن، تری بوتیل هیدروکینون و پروپیل گالات هستند (Girgih *et al*., 2013). امروزه مطالعات نشان داده است افرادی که از غذاهایی با آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استفاده می‌کنند نسبت به افرادی که آنتی‌اکسیدان‌های مصرفی آنها از نوع مصنوعی است، به لحاظ سلامتی، دارای رژیم غذایی ایمن‌تری هستند (Phadke *et al*., 2016).

ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حدود ۲۰ درصد از گونه‌های پرورشی در استخرهای گرم‌آبی شمال ایران را به خود اختصاص می‌دهد (Shabanpour *et al*., 2012). با توجه به حجم تولید این گونه در ایران، حجم دورریز این گونه و با توجه به اهمیت آنتی‌اکسیدان‌ها و تاثیر روش آبکافت بر میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی، در این مطالعه به بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی با آنزیم آلکالاز پرداخته خواهد شد و اثر زمان در فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش کار

۱.۲. آماده‌سازی نمونه ماهی

ماهی کپور معمولی دو ساله، به تعداد ۱۰ قطعه با میانگین وزن ۰/۰۵۷±۰/۶۹۲ کیلوگرم از مزرعه پرورشی فریدونکنار صید شد و در جعبه‌های یونولیتی به همراه یخ (با نسبت ۱: ۳ وزنی/وزنی) به سرعت به آزمایشگاه محل انجام تحقیق منتقل شد. جهت برطرف کردن آلودگی‌ها و موکوس، ماهی با آب سرد شستشو داده شد و سپس سر و دم زنی و تخلیه امعاء و احشاء صورت گرفت. امعاء و احشاء خارج شده در دمای فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) تا روز آزمایش نگه‌داری شد.

۲.۲. ترکیب شیمیایی پروتئین آبکافتی

اندازه‌گیری پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت نمونه اولیه و پروتئین آبکافتی بر اساس روش AOAC (۲۰۰۰) انجام شد. مقدار رطوبت نمونه، با قرار دادن ۱ گرم از نمونه در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت تعیین شد. خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و پروتئین خام به روش کجلدال (با ضریب ثابت ۶/۲۵) سنجش شدند و اندازه‌گیری چربی کل به کمک دستگاه سوکسله و با استفاده از اتر به عنوان حلال صورت گرفت.

۳.۲. روش آبکافت

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و با آب مقطر با نسبت ۱: ۲ (v/w) مخلوط و با هموژنایزر (IKA T-18 Basic, Germany)،به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شدند. سپس جهت غیر فعال‌کردن آنزیم‌های درونی ظروف حاوی نمونه به مدت۱۰ دقیقه در حمام آب گرم (Memmert wub 29, Germany) با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. غلظت آنزیم آلکالاز ۱ درصد (بر مبنای وزن ماده اولیه)، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ در نظر گرفته شد. زمان آبکافت ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه بود و در نهایت نمونه‌ها به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم آلکالاز، پس از هر زمان مورد مطالعه، به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به‌منظور جداسازی مواد غیرمحلول از پروتئین‌های محلول، تحت عمل سانتریفوژ (۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g) در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) (Sigma, 3-30KS, United States) قرار گرفت و قسمت سوپرناتانت به وسیله سمپلر جدا شد و برای

اندازه‌گیری‌های مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2018). بخشی از محلول پروتئین آبکافت شده با استفاده از فریز درایر خشک شد و جهت سنجش ترکیب شیمیایی (پروتئین، چربی و خاکستر) مورد استفاده قرار گرفت.

برای سنجش اثر آبکافت در زمان‌های مختلف، دو آزمایش درجه آبکافت و میزان پروتئین محلول استفاده شد. همچنین برای سنجش عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی بدست‌آمده از زمان‌های مختلف، شاخص‌های قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفینیل -۱- پیکریل هیدرازیل (DPPH) و و رادیکال ۲،۲-آزینو-بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS) و همچنین قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی (یون فریک) مورد بررسی قرار گرفتند.

۴.۲. تعیین درجه آبکافت (DH)

درجه آبکافت براساس روش Hoyle وMerrit (۱۹۹۴) با استفاده از تری‌کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین آبکافت شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰درصد مخلوط شد و سپس با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری تعیین و درجه آبکافت با رابطه زیر محاسبه شد:

$$DH = \frac{\text{میزان نیتروژن در محلول ۱۰٪ تری کلرواستیک اسید}}{\text{میزان نیتروژن در نمونه}} \times ۱۰۰$$

۵.۲. پروتئین محلول

مقدار پروتئین محلول به روش Lowry و همکاران (۱۹۵۱) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (۱/۲-۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد مورد سنجش قرار گرفت.

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

ابتدا غلظت‌های مختلفی از نمونه پروتئین آبکافتی بر اساس غلظت پروتئین محلول (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه شد و جهت تعیین قدرت مهار رادیکال DPPH، به حجم معینی از محلول نمونه، همان میزان از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شد و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتوفتومتر UV (Spectrophotometer UV-M51 UV/Vis, Italy) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال طبق رابطه زیر محاسبه گردید (Mishra *et al*., 2010):

درصد مهار DPPH = (Ab-As/Ab)×100

Ab جذب شاهد؛ As جذب نمونه

جهت مقایسه فعالیت آنتی‌اکسیدانی از ویتامین C در غلظت‌های مختلف استفاده شد.

۷.۲. قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

ابتدا غلظت‌های مختلفی از نمونه پروتئین آبکافتی بر اساس غلظت پروتئین محلول (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه شد و برای بررسی این ویژگی، ۱ میلی‌لیتر نمونه پروتئین آبکافتی با غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی‌لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (با pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول پتاسیم فری‌سیناید ۱ درصد مخلوط شد. سپس ترکیب بدست آمده ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد انکوبه و متعاقب آن ۲/۵ میلی‌لیتر محلول تری‌کلرواستیک‌اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس این محلول ۱۰ دقیقه با گردش ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ و فاز رویی با ۲/۵ میلی‌لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی‌لیتر محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد ترکیب شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ نانومتر قرائت گردید. هر چه جذب بیشتر باشد قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی نیز بیشتر است (Ovissipour *et al*., 2012).

۸.۲. سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ۲،۲-آزینو-بیس-۳-اتیل بنزوتیازولین-۶-سولفونیک اسید (ABTS)

ابتدا غلظت‌های مختلفی از نمونه پروتئین آبکافتی بر اساس غلظت پروتئین محلول (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) تهیه شد و برای سنجش فعالیت مهارکنندگی از روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. محلول ۷ میلی‌مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی‌مولار تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در مکان تاریک نگه‌داری شد. پس از طی زمان مورد نظر، رقیق‌سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب ۰/۷±۰/۰۲ در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام شد. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق سازی شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ °C انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر خوانده شد. به منظور مقایسه نیز از غلظت‌های مختلف آسکوربیک‌اسید استفاده و درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{درصد مهارکنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه شاهد} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times ۱۰۰$$

۹.۲. تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و تمام شاخص‌ها حداقل با سه تکرار تعیین شد و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو-ویلک، مقایسه میانگین‌ها برای تعیین تاثیر زمان آبکافت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی با روش تجزیه واریانس یک طرفه صورت گرفت. برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمامی تجزیه و تحلیل ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS 20 انجام شد.

۳. نتایج

۱.۳. ترکیب شیمیایی پروتئین آبکافتی

آنالیز تقریبی امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی و پودر پروتئین آبکافتی حاصل از آن با هم تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱)، به طوری که درصد پروتئین و خاکستر به طور معنی‌داری افزایش و چربی به طور معنی‌داری کاهش یافت ($p<۰/۰۵$).

جدول ۱. آنالیز تقریبی امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی و پودر پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء (بر حسب درصد وزن ماده خشک).

شاخص (٪)	رطوبت	پروتئین	چربی	خاکستر
امعاء و احشاء	۷۹/۲۱ ± ۰/۱۹	۶۸/۸ ± ۲/۰۱ [b]	۲۱/۹ ± ۲/۲۲ [a]	۷/۴۴ ± ۰/۳۴ [b]
پودر پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء	۳/۶۸ ± ۰/۲۲	۸۲/۴۳ ± ۲/۱۵ [a]	۱/۷۱ ± ۰/۰۸ [b]	۱۲/۲۶ ± ۱/۹۱ [a]

* میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

۲.۳. پروتئین محلول و درجه آبکافت

نتایج حاصل از سنجش پروتئین محلول و درجه آبکافت امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت نشان داد که با افزایش مدت زمان آبکافت تا ۱۸۰ دقیقه، میزان پروتئین محلول و درجه آبکافت به صورت معنی‌داری افزایش پیدا کرد (جدول ۲؛ $p<۰/۰۵$). البته مقدار پروتئین محلول در زمان ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه اختلاف معنی‌داری نشان نداد ($p>۰/۰۵$).

جدول ۲. میانگین پروتئین محلول و درجه آبکافت امعاء و احشاء کپور معمولی در زمان‌های مختلف

شاخص	زمان (min)			
	۳۰	۶۰	۱۲۰	۱۸۰
پروتئین محلول (mg/ml)	۳۰/۲۲ ± ۰/۰۷ ^{c}	۳۰/۶۱ ± ۰/۰۷ ^{b}	۳۰/۷۸ ± ۰/۱۲ ^{b}	۳۱/۴۶ ± ۰/۲ ^{a}
درجه آبکافت (٪)	۳۶/۹۳ ± ۱/۲۱ ^{d}	۴۸/۲۷ ± ۱/۲۳ ^{c}	۵۲/۰۵ ± ۰/۷۲ ^{b}	۵۶/۶۶ ± ۰/۱۸ ^{a}

* میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$).

۴.۳. فعالیت مهار کنندگی رادیکال آزاد DPPH

نتایج مربوط به سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه و با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی نشان داد که با افزایش غلظت پروتئین، درصد مهار رادیکال آزاد افزایش یافت (جدول ۳؛ $p<0/05$)، همچنین پروتئین‌های آبکافتی حاصل از زمان‌های مختلف اثر مهارکنندگی DPPH متفاوتی داشته‌اند (جدول ۳؛ $p<0/05$). با توجه به نتایج، با افزایش مدت زمان آبکافت، توان آنتی‌اکسیدانی نمونه نیز بالاتر رفت و IC_{50} مهار کنندگی DPPH در زمان ۱۸۰ دقیقه مقدار ۰/۰۱ ± ۱/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد که کمترین مقدار در بین زمان‌ها را داشت (جدول ۴؛ $p<0/05$). همچنین قدرت ویتامین C در مهار DPPH در غلظت‌های مختلف نیز به منظور مقایسه مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان داد که با کاهش غلظت، میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی ویتامین C نیز کاهش پیدا می کند (جدول ۵؛ $p<0/05$).

جدول ۳. نتایج حاصل از سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH (بر حسب درصد)

غلظت پروتئین (mg/ml)	زمان (min)			
	۳۰	۶۰	۱۲۰	۱۸۰
۰/۵	۴/۳۷ ± ۲/۹۱^{De}	۹/۳۳ ± ۵/۵۹^{Ce}	۱۰/۵۴ ± ۲/۹۱^{Be}	۱۵/۱۴ ± ۳/۹۸^{Ae}
۱	۲۲/۸۲ ± ۱/۶۱^{Cd}	۲۴/۳۱ ± ۱/۱۷^{Cd}	۳۴/۹۵ ± ۲/۲۶^{Bd}	۳۸/۶۸ ± ۱/۰۸^{Ad}
۱/۵	۴۰/۹۸ ± ۳/۴۷^{Bc}	۴۰/۸۴ ± ۲/۳۶^{Bc}	۵۲/۰۴ ± ۳/۲۶^{Ac}	۵۱/۰۳ ± ۰/۳۲^{Ac}
۲	۴۸/۰۲ ± ۰/۵۳^{Db}	۵۲/۸۳ ± ۱/۵۵^{Cb}	۵۶/۶۳ ± ۰/۶۵^{Bb}	۶۲/۹۵ ± ۱/۳۰^{Ab}
۲/۵	۵۳/۴۸ ± ۱/۱۳^{Ca}	۶۴/۵۳ ± ۱/۳۸^{Ba}	۶۵/۲۵ ± ۱/۱۸^{Ba}	۷۶/۹۵ ± ۲/۲۴^{Aa}

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشند. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ۴. نتایج حاصل از سنجش قدرت مهارکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH (IC_{50})

زمان (min)	۳۰	۶۰	۱۲۰	۱۸۰
(mg/ml) IC_{50}	۲/۲۳ ± ۰/۰۸^{a}	۱/۸ ± ۰/۰۱^{b}	۱/۵۷ ± ۰/۰۴^{c}	۱/۳۴ ± ۰/۰۱^{d}

* میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$).

جدول ۵. نتایج حاصل از قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH توسط ویتامین C در غلظت‌های مختلف

غلظت (µg/ml)	۱	۱۰	۵۰	۱۰۰
درصد مهار رادیکال آزاد DPPH	۳/۲۷ ± ۴/۶۴۵^{d}	۴۰/۳۳ ± ۲/۲۶۷^{c}	۶۲/۷۷ ± ۰/۰۲۴^{b}	۱۰۰ ± ۰/۰۰^{a}

* میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشد ($p<0/05$).

۵.۳. قدرت کاهندگی یون آهن

با افزایش غلظت پروتئین آبکافت شده، قدرت کاهندگی آهن افزایش معنی‌داری پیدا کرد (جدول ۶؛ p<۰/۰۵). با افزایش زمان تا ۱۸۰ دقیقه نیز قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی افزایش معنی‌داری نشان داد (p<۰/۰۵). در غلظت ۱ و ۱/۵ درصد، در زمان ۳۰ و ۶۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد (p>۰/۰۵). بیشترین قدرت مهارکنندگی برای زمان آبکافت ۱۸۰ دقیقه در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود (جدول ۶؛ p<۰/۰۵).

جدول ۶. نتایج حاصل از قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در زمان‌های مختلف آبکافت و در غلظت‌های مختلف

غلظت پروتئین (mg/ml)	زمان (min)			
	۳۰	۶۰	۱۲۰	۱۸۰
۰/۵	۰/۰۲۷ ± ۰/۰۰۴^{De}	۰/۰۳۹ ± ۰/۰۰۳^{Ce}	۰/۰۵۸ ± ۰/۰۰۲^{Be}	۰/۰۷۸ ± ۰/۰۰۵^{Ae}
۱	۰/۰۶۱ ± ۰/۰۰۱^{Cd}	۰/۰۵۵ ± ۰/۰۰۴^{Cd}	۰/۰۷۹ ± ۰/۰۰۳^{Bd}	۰/۱۱۳ ± ۰/۰۰۲^{Ad}
۱/۵	۰/۰۷۴۵ ± ۰/۰۰۳^{Cc}	۰/۰۸۹ ± ۰/۰۰۴^{Cc}	۰/۱۲۷ ± ۰/۰۰۷^{Bc}	۰/۱۹۲ ± ۰/۰۰۲^{Ac}
۲	۰/۰۸۹ ± ۰/۰۰۶^{Db}	۰/۱۳۲ ± ۰/۰۰۳^{Cb}	۰/۱۶۶ ± ۰/۰۰۲^{Bb}	۰/۲۲۹ ± ۰/۰۰۲^{Ab}
۲/۵	۰/۱۴۲ ± ۰/۰۰۲^{Da}	۰/۱۷۴ ± ۰/۰۰۲^{Ca}	۰/۲۳۸ ± ۰/۰۰۷^{Ba}	۰/۲۶۱ ± ۰/۰۰۴^{Aa}

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشد. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد (p<۰/۰۵).

۶.۳. فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

سنجش توانایی پروتئین آبکافتی حاصل از زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه، با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲ و ۲/۵ (میلی‌گرم / میلی‌لیتر) در مهار رادیکال ABTS نشان داد که قدرت مهارکنندگی رادیکال (ABTS) با گذشت زمان آبکافت تا ۱۸۰ دقیقه افزایش یافت (جدول ۷؛ p<۰/۰۵).

جدول ۷. نتایج حاصل از توانایی پروتئین آبکافتی امعاء و احشا ماهی کپور معمولی در مهار رادیکال ABTS

غلظت پروتئین (mg/ml)	زمان(min)			
	۳۰	۶۰	۱۲۰	۱۸۰
۰/۵	۰/۰۰ ۰±/۰۰^{Ce}	۷/۸۶ ± ۲/۵^{Be}	۹/۰۰ ± ۲/۴^{Be}	۱۱/۹۶ ± ۱/۰۹^{Ae}
۱	۵/۱۰ ± ۰/۷۰^{Dd}	۳۵/۹۶ ± ۲/۴۹^{Ad}	۲۶/۱۳ ± ۱/۸۵^{Cd}	۳۰/۰۳ ± ۱/۰۷^{Bd}
۱/۵	۲۳/۷۳ ± ۰/۸۹^{Cc}	۴۴/۲۰ ± ۳/۶۵^{Cc}	۴۸/۰۰ ± ۱/۳۱^{Bc}	۵۹/۱۶ ± ۰/۹۲^{Ac}
۲	۳۱/۱۶ ± ۰/۷۵^{Cb}	۵۶/۴۳ ± ۲/۲۳^{Bb}	۵۷/۲۶ ± ۰/۷۲^{Bb}	۶۶/۳۳ ± ۰/۸۹^{Ab}
۲/۵	۴۳/۱۳ ± ۱/۴۹^{Ca}	۶۵/۲۳ ± ۰/۸۱^{Ba}	۷۷/۳ ± ۱/۰۴^{Aa}	۷۶/۷۶ ± ۱/۳۵^{Aa}

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار می‌باشند. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار بین تیمارهای مختلف می‌باشد (p<۰/۰۵).

همچنین در هر زمان با افزایش غلظت، قدرت مهارکنندگی به صورت معنی‌داری افزایش یافت (p<۰/۰۵). IC_{50} مهار کنندگی ABTS در زمان ۱۸۰ دقیقه در غلظت ۱/۹۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که کمترین مقدار غلظت در بین زمان‌ها را داشت و با گذشت زمان مقدار مهار کنندگی ABTS افزایش یافت (جدول ۸؛ p<۰/۰۵).

جدول ۸. مقادیر IC_{50} پروتئین آبکافتی حاصل از زمان‌های مختلف در مهار رادیکال ABTS .

زمان	۳۰ دقیقه	۶۰ دقیقه	۱۲۰ دقیقه	۱۸۰ دقیقه
(mg/ml) IC_{50}	۳/۶۵ ± ۰/۱۹[a]	۲/۶۴ ± ۰/۰۴[b]	۲/۱۷ ± ۰/۱[c]	۱/۹۲ ± ۰/۰۲[d]

* میانگین ± انحراف معیار سه تکرار، حروف متفاوت در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار می‌باشند (p<۰/۰۵).

۴. بحث و نتیجه گیری

این پژوهش با هدف بررسی عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت‌شده امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی انجام شد. یکی از موارد مهم در فرایند آبکافت که می‌تواند به طور قابل توجهی خصوصیات کارکردی پروتئین آبکافتی حاصل را تغییر دهد انتخاب آنزیم است (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2018). در تحقیق حاضر از آنزیم آلکالاز برای آبکافت پروتئینی استفاده شد چرا که با توجه به تحقیق Ovissipour و همکاران (۲۰۱۰) که در آن به بررسی اثر سه آنزیم آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم روی میزان پروتئین بدست آمده از طریق آبکافت پرداختند، آنزیم آلکالاز کارایی بهتری نسبت به دو آنزیم دیگر داشت. همچنین در تحقیق Esmaeili Kharyeki و همکاران (۲۰۱۸)، Alemán و همکاران (۲۰۱۱) و Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) نیز نتایج مناسبی از آبکافت پروتئین آبزیان با آنزیم آلکالاز گزارش کردند.

مقدار پروتئین در پودر پروتئین آبکافتی در مطالعه حاضر از ۶۸/۸ درصد در امعاء و احشاء خام به ۸۲/۴۳ درصد افزایش یافت که دلیل آن می‌تواند متاثر از اثر آنزیم در شکستن پیوندهای پروتئینی طی فرایند آبکافت و حذف ترکیبات غیر محلول جامد طی مرحله سانتریفوژ باشد. همچنین مقدار چربی امعاء و احشاء کاهش یافت که ممکن است به دلیل اتصال چربی به پروتئین‌های نامحلول پس از شکسته شدن پیوندهای پپتیدی طی فرایند آبکافت و رسوب آن‌ها طی مرحله سانتریفوژ باشد (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2018). مقدار خاکستر نیز در پروتئین آبکافتی به مقدار کمی افزایش یافت که تفاوت نتیجه‌ی حاصل از مطالعه حاضر با سایر پژوهش‌ها را می‌توان متاثر از تفاوت در نوع ماده اولیه دانست. در مطالعه Ovissipour و همکاران (۲۰۱۰)، روی ماهی تن زرد باله (*Thunnus albacares*) مقدار پروتئین ماده خام ۰/۵± ۲۱/۵ درصد بود و مقدار پروتئین آبکافت‌شده با آنزیم پروتئاز ۳/۲ ± ۷۲/۳۴ درصد بود. در مطالعه Bakhshan و همکاران (۲۰۱۴)، روی ضایعات ماهی آزاد (*Salmo salar*) مقدار پروتئین ماده خام ۱/۵ ± ۷۵ درصد، و بعد از آبکافت با آنزیم آلکالاز مقدار پروتئین نمونه آبکافت شده ۰/۳ ± ۸۳/۶۳ درصد گزارش شده است.

در مطالعهReyhani Poul و همکاران (۲۰۱۸)، مقدار پروتئین اولیه امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) ۱/۸۱ ± ۱۱/۴۹ درصد بر حسب وزن خشک به دست آمد که برای نمونه‌ی آبکافت شده با آنزیم نئوتراز مقدار آن ۲/۶۴ ± ۷۶/۳ درصد بدست آمد. در مطالعه Roshan و همکاران (۲۰۱۵)، مقدار پروتئین پودر حاصل از آبکافت با آنزیم پرومود در ماهی کیلکای معمولی (*Clupeonella cultiventris*) ۷۵/۳۶ درصد گزارش شده است. نتایج مربوط به سنجش مقدار پروتئین نشان از بالا بودن مقدار پروتئین در نمونه آبکافتی نسبت به ماده اولیه دارد و سایر محققین نیز میزان پروتئین نمونه آبکافت‌شده را بین ۶۳/۴ تا ۹۰/۸ درصد گزارش کرده‌اند (Kristinsson and Rasco, 2000; Souissi *et al*., 2007; Bhaskar *et al*., 2008; Ovissipour *et al*., 2009).

پروتئین‌های آبکافتی حاصل از منابع متنوع دریایی شامل ماهیان و آبزیان پوسته‌دار و محصولات جنبی حاصل از فراوری آنها دارای خواص کارکردی و زیست‌فعال متنوعی‌اند (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2020). تغییر شرایط آبکافت شامل زمان، دما و نسبت آنزیم به سوبسترا بر خواص کارکردی محصول نهایی موثر است (Taheri *et al*., 2013). در مطالعه حاضر آبکافت در زمان‌های مختلف انجام شد و مشخص شد که با افزایش

زمان تا ۱۸۰ دقیقه، درجه آبکافت روندی افزایشی داشت. در مطالعه Bougatef و همکاران (۲۰۱۰) روی آبکافت ضایعات حاصل از ساردین (*Sardinella aurita*) مشخص شد که با افزایش زمان تا ۱۵۰ دقیقه روند درجه آبکافت افزایشی است و مطالعه Hosseini و همکاران (۲۰۱۰) روی آبکافت سر ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) نشان داد که با افزایش زمان تا ۴ ساعت میزان پروتئین محلول و درجه آبکافت افزایش پیدا کرد، ولی با افزایش بیشتر زمان آبکافت از شدت درجه آبکافت کاسته شد و دلیل این امر به فعالیت آنزیمی بیشتر در این مدت زمان و بیشتر بودن باندهای پپتیدی در زمان‌های اولیه نسبت داده شد (Bougatef *et al*., 2010).

مطالعه Yasemi و همکاران (۲۰۱۳) روی امعا و احشاء ماهی کپور سرگنده با آنزیم‌های مختلف (آلکالاز، پروتامکس و پاپائین) نشان داد که میزان درجه آبکافت تا ۶۰ دقیقه روندی افزایشی دارد. این نتیجه با نتایج تحقیقات Deniz و همکاران (۱۹۹۷)، روی بهینه‌سازی بازیافت نیتروژن از طریق آبکافت ماهی Dogfish (*Squalus acanthias*)، Bahaskarو همکاران (۲۰۰۸)، روی بهینه‌سازی پروتئین آبکافتی ماهی Catla (*Catla catla*) با آنزیم پروتئاز و Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) در مورد اثر زمان بر پروتئین آبکافتی ضایعات ماهی Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) همسو است. به طور کلی با افزایش مدت زمان، ابتدا شدت آبکافت افزایش و سپس به دلیل کاهش تعداد پیوندهای قابل دسترس برای آنزیم، مهار آنزیم و غیر فعال شدن آنزیم، از شدت آن کاسته می‌شود (Ovissipour *et al*., 2009; Taheri *et al*., 2013; Esmaeili Kharyeki *et al*., 2018). البته در مطالعه‌ی حاضر در بازه‌ی زمانی مورد مطالعه کاهش شدت آبکافت مشاهده نشد و به نظر می‌رسد غیر فعال شدن آنزیم نیاز به زمان بیشتری دارد.

DPPH یک رادیکال آزاد پایدار است که می‌تواند به عنوان آغازکننده واکنش‌های زنجیره‌ای پراکسیداسیون لیپید و اتواکسیداسیون عمل کند. در مطالعه‌ی حاضر فعالیت مهارکنندگی DPPH در پروتئین آبکافتی مورد بررسی قرار گرفت و بالاترین میزان مهارکنندگی در نمونه پروتئین آبکافتی با غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۱۸۰ دقیقه به مقدار ۲/۲۴ ± ۷۶/۹۵ درصد به دست آمد. نتایج Nalinanon و همکاران (۲۰۱۱) نیز نشان داد که با افزایش درجه آبکافت تفاوت معنی‌داری در تست DPPH مشاهده شد ($p<0/05$). مطالعه Yang و همکاران (۲۰۱۱) نشان داد که قدرت مهار رادیکال آزاد در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر برابر با ۰/۷۴ ± ۵۷/۸۰ درصد است. در مطالعه‌ی Foh و همکاران (۲۰۱۰) در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودر پروتئین آبکافت شده خاصیت مهارکنندگی ۱/۲۶ ± ۸۶/۶۷ درصد مشاهده شد. در مطالعه‌ی حاضر با افزایش غلظت پروتئین محلول، قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH افزایش یافت. تاثیر افزایش غلظت بر توانایی مهار رادیکال آزاد در سایر مطالعات انجام شده در ارتباط با ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی نیز گزارش شده است (Cai *et al*., 2015; Esmaeili Kharyeki *et al*., 2020). Yang و همکاران (۲۰۱۱) مقدار IC_{50} برای پروتئین آبکافتی ماهی تن (*Thunnus obesus*) را ۱/۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان کردند و در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد را ۰/۷۴ ± ۵۷/۸۰ درصد گزارش نمودند. در مطالعه حاضر IC_{50} مهار رادیکال آزاد DPPH برای پروتئین آبکافتی در زمان ۱۸۰ دقیقه، ۱/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. در سایر مطالعات میزان IC_{50} برای پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) ۰/۲۹۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2020)، باله ماهی سالمون ۱/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Ahn *et al*., 2014)، امعاء و احشاء ماهی کاتلا (*Catla catla*) ۳/۴۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Hathwar *et al*., 2011)، ماهی ساردین ۰/۹۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (GarcíaMoreno *et al*., 2014) به دست آمد. به طور کلی، فعالیت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست فعال متاثر از عوامل مختلفی همانند درجه آبکافت، مدت زمان آبکافت، ترکیب آمینواسیدی، اندازه و وزن ملکولی پپتیدها و توالی آمینواسیدها است (Bougatef *et al*., 2008). نوع سازوکار آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای زیست‌فعال هنوز به خوبی مشخص نیست و

احتمالا آمینواسیدهایی مثل هیستیدین، سیستئین، والین، پرولین، فنیل‌آلانین، تیروزین و تریپتوفان نقش مهمی در عملکرد آنتی‌اکسیدانی پپتیدها و پروتئین‌های آبکافت شده ماهی دارند (Bougatef *et al*., 2008; Chalamaiah *et al*., 2012).

یکی از شاخص‌های مهم در تعیین ویژگی آنتی‌اکسیدانی، ارزیابی قدرت کاهندگی آهن است که بر اساس ارزیابی توانایی یک ترکیب آنتی‌اکسیدان در دادن الکترون یا هیدروژن استفاده می‌شود. در روش کاهندگی یون آهن به بررسی میزان تبدیل یون Fe^{+2} به Fe^{+3} پرداخته می‌شود (Bougatef *et al*., 2010). نتایج مطالعه حاضر نشان داد که با افزایش مدت زمان آبکافت و غلظت پروتئین آبکافتی قدرت کاهندگی پروتئین آبکافتی افزایش معنی‌داری داشته است و از ۰/۰۲۷ در غلظت ۰/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان آبکافت ۳۰ دقیقه تا ۰/۲۶۱ در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان آبکافت ۱۸۰ دقیقه متغیر است. قدرت کاهندگی آهن پروتئین آبکافتی حاصل از ماهی کاد (*Gadus morhua*) در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۰/۱۴۱ (Farvin *et al*., 2014) و در پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۰/۱۷۶ (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2020) گزارش شده است. نتایج مطالعه Alemán و همکاران (۲۰۱۱) در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی ژلاتین آبکافتی ماهی مرکب با آنزیم آلکالاز نشان داد که با افزایش غلظت از ۰/۵ تا ۱/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قدرت کاهندگی آهن افزایش می یابد و با افزایش تا ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر تفاوت معنی‌داری نشان نمی دهد. در مطالعه Yang و همکاران (۲۰۱۱) توانایی کاهندگی یون آهن پروتئین آبکافت شده ماهی تن (*Thunnus obesus*) در غلظت ۲/۵، ۵ و ۱۲/۵ به‌ترتیب ۰/۲۱۴، ۰/۵۳۴ و ۰/۹۴۸ گزارش شده است و با افزایش غلظت، قدرت کاهندگی یون آهن فریک افزایش پیدا کرد. توانایی کاهندگی یون آهن پروتئین آبکافتی ماهی کاد (*G. morhua*) (Farvin *et al*., 2014)، پروتئین سپر ماهی (*Raja clavata*) (Lassoued *et al*., 2015) و سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) (Esmaeili Kharyeki *et al*., 2020) نیز با افزایش غلظت، افزایش نشان داد. تغییر در اندازه، ساختار، ترکیب و توالی آمینواسیدی پپتیدها در اثر گذشت زمان و افزایش درجه آبکافت، روی کاهندگی یون آهن تاثیرگذار است (Bougatef *et al*., 2010). پپتیدهای حاوی آمینواسید هیستیدین و پپتیدهای با وزن مولکولی کم، به عنوان شلاته کننده‌های پرواکسیدان‌ها (یون آهن و مس) شناخته شده‌اند (Chalamaiah *et al*., 2015) و شاید بتوان تاثیر خوب پروتئین آبکافتی به دست آمده در مطالعه حاضر را به وجود پپتیدهای محتوی هیستیدین و پپتیدهای با وزن مولکولی کم نسبت داد.

از دیگر شاخص‌های آنتی‌اکسیدانی، بررسی قدرت مهار رادیکال ABTS است. این ارزیابی روش خوبی برای تعیین توان آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای بدست آمده است و رادیکال ABTS، یک رادیکال ناپایدار است که به آسانی توسط یک آنتی‌اکسیدان مهار می‌گردد (Jeevitha *et al*., 2014). نتایج این تحقیق نشان داد که پپتیدهای بدست آمده دارای توانایی مهار رادیکال ABTS نیز هستند و بیشترین مقدار آن مربوط به غلظت ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در زمان ۱۸۰ دقیقه (۱/۳۵ ± ۷۶/۷۶ درصد) بود.

مطالعه‌ی Jeevitha و همکاران (۲۰۱۴) روی عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی ماهی ساردین (*Sardinella longiceps*) نیز نشان داد که با افزایش غلظت تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانایی مهار رادیکال ABTS افزایش می‌یابد. در بررسی تاثیر شرایط آبکافت ماهی مرکب (*Uroteuthis duvaucelii*) با روش سطح پاسخ مشخص شد که با افزایش غلظت از ۵ تا ۲۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر میزان این شاخص افزایش می‌یابد (Sivaraman *et al*., 2016). همچنین مطالعه Cheung و همکاران (۲۰۱۲) نشان داد که پپتیدهایی با وزن زیر سه کیلو دالتون بهترین عملکرد مهارکنندگی ABTS را داشته‌اند.

در مورد IC_{50} بهترین زمان مربوط به ۱۸۰ دقیقه بوده است و مقادیر IC_{50} در زمان‌های مختلف، تفاوت معنی-داری نسبت به هم داشته‌اند، به طوری که با افزایش زمان مقدار IC_{50} کاهش پیدا کرده است. نتایج مطالعه

Samaranayaka و همکاران (۲۰۰۸) در مورد پپتیدهای بدست آمده از ماهی North Pacific hake (*Merluccius productus*) نشان داد که قدرت مهار رادیکال ABTS با افزایش غلظت افزایش پیدا کرده است. در مطالعه Foh و همکاران (۲۰۱۰) مقدار ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین آبکافت فریز درایر شده مینس ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) ۰/۲۵ ± ۹۷/۲۱ درصد خاصیت مهار کنندگی ABTS از خود نشان داد.

به طور کلی عملکرد آنتی‌کسیدانی پروتئین آبکافتی به شرایط آبکافت شامل دما، مدت زمان آبکافت، نسبت آنزیم به سوبسترا، pH، نوع آنزیم و ماهیت ماده اولیه وابسته است (Sivaraman *et al*., 2016).

نتیجه‌گیری کلی

مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین آبکافتی حاصل از امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی توانایی خوبی در مهار رادیکال آزاد به خصوص در تست DPPH دارد. همچنین با افزایش زمان آبکافت درجه آبکافت افزایش پیدا کرد و با افزایش درجه آبکافت تا ۱۸۰ دقیقه توان آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بیشتر شد. در مجموع با توجه به نتایج این پژوهش می‌توان گفت امعاء و احشاء ماهی کپور معمولی دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی است و می‌تواند در فراورده‌های غذایی به منظور افزایش ماندگاری جهت جلوگیری از فساد اکسیداسیونی مورد استفاده قرار گیرد.

۵. منابع

References

Ahn. C.B., Je. J.Y., Cho. Y.S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International* 49(-). 92-98.

Ahn. C.B., Kim. J.G., Je. J.Y., 2014. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chemitry* 147(-), 78-83

Alemán. A., Pérez-Santín. E., Bordenave-Juchereau. S., Arnaudin. I., Gómez-Guillén. M.C., Montero. P., 2011. Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *International Food Research Journal* 44(-), 1044-1051.

AOAC., 2000. Official Methods of Analysis, Washington, DC. USA, Association of Analytical Chemists.

Bakhshan. A.V., Alizadeh Doughikollaee. E., Taheri. A., 2014. Investigation of antioxidative properties of protein hydrolysate obtained from waste, in the Salmon (*Salmo salar*) filleting operation. *Journal of Comparative Pathobiology* 11(44), 1143 – 1152. (in Persian).

Bhaskar. N., Benila. T., Radha. C., Lalitha. R.G., 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste protein of catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology* 99, 335-343.

Bougatef. A., Nedjar-Arroume. N., Manni. L., Ravallec. R., Barkia. A., Guillochon. D., 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.

Bougatef. A., Nedjar-Arroume. N., Ravallec-Plé. R., Leroy. Y., Guillochon. D., Barkia. A., Nasri. M., 2008. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activities of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products protein hydrolysates obtained by treatment with microbial and visceral fish serine proteases. *Food Chemistry* 111, 350–356.

Cai. L., Wu. X., Zhang. Y., Li. X., Ma. Sh., Li. J., 2015. Purification and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. *Journal of Functional Foods*16, 234-42.

Chalamaiah. M., Hemalatha. R., Jyothirmayi. T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review, *Food Chemistry* 135, 3020-3038.

Chalamaiah. M., Jyothirmayi. T., Diwan. P.V., Dinesh Kumar. B., 2015. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *Journal of Food Science Technology* 52(9), 5817–5825.

Cheung. I.W., Cheung. L.K., Tan. N.Y., Li-Chan. E.C., 2012. The role of molecular size in antioxidant activity of peptide fractions from Pacific hake (*Merluccius productus*) hydrolysates. *Food Chemistry* 134, 1297-1306.

Diniz. A.M., Martin. A.M., 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Science and Nutrition* 48, 191– 200.

Esmaeili Kharyeki. M., Rezaei. M., Khodabandeh. S., Motamedzadegan. A., 2018. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysate in Skipjack tuna Head. *Journal of Fisheries Science and Technology* 7(1), 57-64. (in Persian).

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

FAO., 2018. The state of world fishery and aquaculture. Meeting the sustainable development goals. Rome. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. Pp. 227.

Farvin. K.H.S., Lystabaek Andersen. L., Hauch Nielsen. H., Jacobsen. Ch., Jakobsen. G., Johansson I., Jessen. F., 2014. Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food Chemistry*.149, 326-34.

Foh. M.B.K., Amadou. I., Foh. B.M., Kamara. M.T., Xia. W., 2010. Functionality and antioxidant properties of tilapia (*Oreochromis niloticus*) as influenced by the degree of hydrolysis, *International Journal of Molecular Sciences* 11, 1851-1869.

García-Moreno. P.J., Batista. I., Pires. C., Bandarra. N.M., Espejo-Carpio. F.J., Guadix. A., Guadix. E.M., 2014. Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species. *Food Research International* 65(C), 469-76.

Girgih. A.T., Udenigwe. C.C., Hasan. F.M., Gill. T.A., Aluko. R.E., 2013. Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International* 52, 315-322.

Hosseini. S., Ghoroghi. A., Jamalzadeh. H., Safari. R., Hosseini. S., 2010. Comparison of produced fish protein hydrolysete from viscera and head of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using Alcalase enzyme and internal tissue enzymes. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 21(3), 55-62. (in Persian)

Hathwar. S.C., Bijinu. B., Rai. A.K., Narayan. B., 2011. Simultaneous recovery of lipids and proteins by enzymatic hydrolysis of fish industry waste using different commercial proteases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 164(1), 115-24.

Hoyle. N.T., Merritt. J.H., 1994. Quality of fish protein hydrolysate from Herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science* 59, 76–79.

Je. J.Y., Park. P.J., Kim. S.K., 2005. Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate, *Food Research International* 38, 45-50.

Jeevitha. K., Mohana. P.K., Khora. S.S., 2014. Antioxidant activity of fish protein Hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *International Journal of Drug Development and Research* 6(4), 137-45.

Khafaeizadeh, K., Sakhaei, N., Doustshenas, B., Ghanemi, K., Zolgharnein. H., 2016. Evaluation of antioxidant activity of the purified peptides from hydrolysis of rotifer (*Brachionus plicatilis*). *Iranian Scientific Fisheries Journal*. 25(2). 69-78. (in Persian)

Khalili. M., Ebrahimzadeh. M.A., 2015. A Review on Antioxidants and Some of their Common Evaluation Methods. Journal of Mazandaran University of Medical Science. 24(120), 188-208. (in Persian).

Kristinsson. H.G., Rasco. B.A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 40(1), 43-81.

Lassoued. I., Mora. L., Nasri. R., Aydi. M., Toldrá. F., Aristoy. M.C., Barkia. A., Nasri. M., 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from Thornback Ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of Proteomics* 128, 458-68.

Lowry. O.H., Rosebrough. N.J., Farr. A.L., Randall. R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.

Mishra. K., Ojha. H., Chaudhury. N.K., 2010. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036-1043.

Nalinanon. S., Benjakul. S., Kishimura. H., 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, 1354-1362.

Ovissipour. M., Abedian Kenari. A., Motamedzadegan. A., Nazari. R.M., 2010. The Study on The Properties of the Yellowfin Tuna (*Thunnus albacares*) Visceral Protein Hydrolysates Using Commercial Enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 6(1), 67-76. (in Persian).

Ovissipour. M., Abedian. A.M., Motamedzadegan. A., Rasco. B., Safari. R., Shahiri. H., 2009. 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.

Ovissipour. M., Rasco. B., Shiroodi. S.G., Modanlow. M., Gholami. S., Nemati. M., 2012. 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.

Phadke. G.G., Hrishanmoorthy. E., Bangalore. A.S., 2016. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 23, 24901-2491.

Reyhani Poul. S., Jafarpour. S.A., Safari. R., 2018. Evaluation of oil fatty acid profile, functional properties and antioxidants activity of hydrolyzate produced from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera by application of protamex and neutrase enzymes. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 14(1), 162 – 176. (in Persian).

Roshan. S.A., Ovissipour. M., Keshavarz. M., Nemati. M., 2015. Optimization of the production of protein hydrolysates from common Kilka (*Clupeonella cultiventris*) using protease enzyme (Promod). *Hournal of Marine Biology* 7(2), 83-90. (in Persian).

Samaranayaka. A.G., Li-Chan. E.C., 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacific hake (*Merluccius productus*), *Food Chemistry* 107, 768-776.

Shabanpour. B., Rahmanifarah. K., Shabani. A., 2012. Evaluation of post mortem flesh quality attributes in common carp (*Cyprinus carpio* L.) slaughtered by exsanguination and hypothermia methods. *Journal of Food Science and Technology* 36(9), 21-31. (in Persian).

Shahidi. F., Zhong. Y., 2008. Bioactive peptides. *The Journal of AOAC International* 91(4), 914-931.

Sivaraman. B., Shakila. R.J., Jeyasekaran. G., Sukumar. D., Manimaran. U., Sumathi. G., 2016. Antioxidant activities of squid protein hydrolysates prepared with papain using response surface methodology. *Food Science and Biotechnology* 25(3), 665–672.

Souissi. N., Bougatef. A., Triki-Ellouz. Y., Nasri M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology* 45, 187-194.

Statistical Year Book of the Fisheries Organization. 2013-2018. Deputy Director of Planning and Planning Management. Pp, 33. (in Persian)

Taheri. A., Abedian Kenari. A., Motamedzadegan. A., Habibi Rezaie. M., 2013. Antioxidant activity optimization of gold stripe sardine (*Sardinella gibossa*) protein hydrolysate by RSM. *Iranian Food Science and Technology Research Journal* 8(3), 262- 270. (in Persian).

Yang. P., Ke. H., Hong. P., Zeng. Z., Cao. W., 2011. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *International Journal of Food Science and Technology* 46, 2460–2466.

Yasemi. M., Ghomi Marzdashti. M., Darnahal. T., Mohammadzadeh. B., Amini. H., 2013. Yelid of protein recovery and degree of hydrolysis associated protein hydrolysates from Bighead Carp (*Aristichthys nobilis*) by using enzymes. *Iranian Scientific Fisheries Journal* 22(1). 149-156. (in Persian).