شیلات، مجله منابع طبیعی ایران
دوره ۷۴، شماره ۳، پاییز ۱۴۰۰
صفحات ۳۹۰-۳۷۵

بررسی زمان ماندگاری فیله کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی ماهی

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، ساری، ایران

۲. استاد گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

۳. استادیار گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰ /۰۳/۰۸ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۵/۱۳

چکیده

فیله ماهی با داشتن اسیدهای چرب چند غیر اشباع مستعد فساد است و استفاده از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در زمان نگهداری مورد توجه محققان قرار گرفته است. هدف این تحقیق بررسی تأثیر پروتئین آبکافتی تولید شده از اندرونه کپور معمولی بر ماندگاری و کیفیت فیله کپور معمولی طی نگهداری در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) است. برای این منظور، در ابتدا اندرونه کپور معمولی با آنزیم آلکالاز (غلظت ۱ درصد، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH 8) در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت شد و مقدار IC_{50} پروتئین آبکافتی (حاصل از ۱۸۰ دقیقه هیدرولیز) در مهار رادیکال DPPH ۱/۰±۳۴/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بدست آمد و IC_{50} ویتامین C ۱۳/۰±۷۸/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین شد. سپس جهت بررسی تأثیر پروتئین آبکافتی بر ماندگاری فیله کپور معمولی، تیمارهای آزمایش شامل فیله با پوشش پروتئین آبکافتی، با پوشش ویتامین C و شاهد (بدون پوشش) آماده شدند و فراسنجه‌های شیمیایی (TBA pH و TVB-N) و فراسنجه‌های میکروبی (TVC و PTC) در فیله‌های ماهی کپور نگهداری شده در دمای ۱±۴ درجه سانتی‌گراد در روزهای صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ مورد ارزیابی قرار گرفتند. در طول دوره نگهداری، TBA، TVB-N، TVC و PTC روندی افزایشی داشتند، اما میزان این فراسنجه‌ها در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C بود ($P<0/05$). در مجموع، مقایسه پروتئین آبکافتی و ویتامین C نشان داد که در تمامی فراسنجه‌های مورد بررسی (به جز TVB-N در برخی روزهای نگهداری)، عملکرد پروتئین آبکافتی در IC_{50} مشابه با ویتامین C بود و می‌تواند به عنوان یک آنتی‌اکسیدان برای افزایش زمان ماندگاری ماهی در یخچال پیشنهاد گردد.

واژگان کلیدی: پروتئین آبکافتی، ویتامین C، فراسنجه‌های میکروبی، زمان ماندگاری، کپور معمولی

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

Journal of Fisheries
Vol. 74, No. 3, Autumn 2021
pp. 375-390

Evaluation of the Common carp (*Cyprinus carpio*) fillet shelflife incorporated with fish protein hydrolysate

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

1. M.Sc. graduated, Deptartment of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.
2. Professor, Deptartment of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.
3. Assistant Professor, Deptartment of Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari. Iran.

Received: 28-Mar-2021 **Accepted: 03-Aug-2021**

Abstract

Fish Fillets are perishable due to their poly unsaturated fatty acids and the use of natural antioxidants during storage is of interest to researchers. The aim of this study was to investigate the effect of hydrolyzed protein produced from the viscera of common carp on the shelf life and quality of carp fillets at refrigerator (4±1°C). For this purpose, the common carp viscera were hydrolyzed with alkalase enzyme (concentration 1%, temperature 55 ° C and pH 8) during different times of 30, 60, 120 and 180 minutes and IC_{50} of hydrolyzed protein (after 180 minutes of hydrolysis) in the DPPH inhibition was obtained 1.34 ± 0.01 mg/ml and the IC_{50} of vitamin C was determined to be 13.78±0.6 µg/ml. Then, to investigate the effect of hydrolyzed protein on the shelf life of fillets, experimental treatments including fillets with hydrolyzed protein coating, fillets with vitamin C coating and control (without coating) were prepared, and then, chemical parameters (pH, TBA and TVB-N) and microbial (TVC and PTC) parameters were measured in carp fillets kept at 4±1 °C on days 0, 4, 8, 12, 16 and 20. During the storage period, TBA, TVB-N, TVC and PTC had an increasing trend in all treatments, but the level of these indices in the control treatment was significantly higher than those treated by hydrolyzed protein and vitamin C ($p<0.05$). Overall, comparison of hydrolyzed protein and vitamin C showed that in all studied indices (except TVB-N on some days of storage), the function of hydrolyzed protein in IC_{50} was similar to vitamin C and can be suggested as an antioxidant to increase shelflife of fish fillet at refrigerator.

Keywords: Protein hydrolysate, Vitamin C, Microbial indices, Shelf life, Common carp.

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

۱. مقدمه

ماهی به عنوان یک آبزی به دلیل داشتن پروتئین بالا، از جایگاه ویژه‌ای در تأمین پروتئین حیوانی برخوردار است. آمارها نشان می‌دهد که کل میزان تولید و صید آبزیان در دنیا ۱۷۲/۶ میلیون تن است که سهم آبزی‌پروری ۸۰/۱ میلیون تن را در بر دارد (FAO, 2018). همچنین در سال ۱۳۹۷، میزان کل تولید ماهی‌های گرم‌آبی در ایران ۱۸۷۳۹۹ تن براورد شده است و ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*) حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد از گونه‌های پرورشی در استخرهای گرم‌آبی ایران را به خود اختصاص می‌دهد (Mesbah *et al*., 2017). سرانه مصرف ماهی در ایران نیز ۱۲/۱ کیلوگرم در سال ۱۳۹۷ گزارش شده است (Statistical Year Book of the Fisheries Organization, 2014-2019). با توجه به اینکه امروزه مصرف‌کنندگان ماهی گرایش به سمت مصرف ماهی فیله‌شده و تازه دارند، حفظ ماندگاری ماهی در یخچال (۴±۱ درجه سانتی‌گراد) بسیار حائز اهمیت است. همچنین این حجم عظیم از تولیدات آبزی‌پروری موجب تولید ضایعات کلانی می‌شود به گونه‌ای که بیش از ۳۰ درصد ماهی در زمان فیله کردن در کارخانه‌ها به عنوان ضایعات محسوب می‌شود (Ishak and Sarbon, 2018) و حذف این ضایعات هزینه‌های مالی و زیست محیطی به همراه دارد. این ضایعات عمدتاً شامل سر، اندرونه، پوست، استخوان‌ها و فلس می‌باشد و اندرونه ماهی درصد بالایی از آن را به خود اختصاص می‌دهد (Ovissipour *et al*., 2010). مدیریت ضایعات یک اصل بسیار مهم برای جلوگیری از مشکلات زیست محیطی ناشی از دورریختن آن‌ها ست و از طرفی دیگر با مدیریت صحیح ضایعات، شانس استفاده از یک منبع ارزشمند حاصل می‌شود (Reyhanipoul *et al*., 2018). بنابراین، با توجه به این که ضایعات ماهی دارای پروتئین اند، می‌توان این پروتئین‌ها را با استفاده از روش آبکافت به پپتیدهای کوچکی تبدیل کرد که عملکردهای زیستی متنوعی نشان می‌دهند (Sarmadi and Ismail, 2010). این پپتیدها عمدتا دارای ۲ تا ۲۰ آمینواسید بوده و فعالیت‌های زیستی متنوعی نشان می‌دهند (Yeganeh *et al*., 2021). آبکافت آنزیمی پروتئین‌ها بوسیله انواع مختلف پروتئازها به عنوان کارآمدترین روش بازیافت پروتئین‌های با ارزش افزوده بالا از ماهی، بدون از دست دادن ارزش غذایی‌شان، شناخته شده است (Ahn *et al*., 2012). 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 (Javadian *et al*., 2015) اند 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*., 2012). پپتیدها در توالی پروتئین مادری به شکل غیر فعال هستند، ولی وقتی آبکافت می‌شوند به صورت پپتیدهای زیست‌فعال در می‌آیند و با توجه به وزن مولکولی و توالی آمینواسیدی، فعالیت عملکردی خاص خود را نشان می‌دهند (Udengwe and Aluko, 2012). خواص عملکردی پروتئین‌های آبکافتی شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، توانایی کاهش کلسترول، عملکرد ضد فشار خون، فعالیت ضد انعقادی، محرک فعالیت ایمنی، محرک ماکروفاژی و خاصیت ضد سرطانی است (Ishak and Sarbon, 2018).

بافت ماهی به دلیل دارا بودن درصد بالایی از اسیدهای چرب غیر اشباع به شدت مستعد فساد اکسیداسیونی است. جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها، یکی از نگرانی‌های عمده در صنایع غذایی بوده و بسیار حائز اهمیت است (Dey and Dora, 2014). اکسیداسیون لیپیدها منجر به ایجاد طعم و رایحه نامطبوع، از دست دادن اسیدهای چرب غیراشباع، رنگدانه‌ها و ویتامین‌های محلول در چربی می‌شود (Jahed Khaniky *et al*., 2015). به جز از دست دادن کیفیت مواد غذایی، محصولات اکسیداسیون چربی به‌طور بالقوه برای سلامتی انسان مضر هستند و مصرف

مکرر این مواد غذایی ممکن است منجر به سرطان، بیماری‌های قلبی و عروقی و آلزایمر شود. کاهش دما یکی از ساده‌ترین و رایج‌ترین روش‌ها برای نگه‌داری و افزایش مدت ماندگاری مواد غذایی است (Sathevel *et al*., 2008). یکی دیگر از روش‌ها استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها است. 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 (Gajanan *et al*., 2016). از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مانند ویتامین C، ویتامین E، گلوتاتیون، اسید لیپوئیک، اسید اوریک، کاروتن، ملاتونین و... و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول، بوتیل هیدروکسی تولوئن، تری بوتیل هیدروکینون و پروپیل گالات می‌توان نام برد (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. با توجه به این که پروتئین‌های آبکافت شده فعالیت آنتی‌اکسیدانی داشته و دارای پتانسیل خوبی برای جلوگیری از فساد اکسیداتیو هستند، می‌توان از آن‌ها در طول فراوری و نگهداری مواد غذایی استفاده کرد (Gajanan *et al*., 2016). مطالعات محدودی در ارتباط با استفاده از پروتئین آبکافتی در نگهداری ماهی انجام شده است که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌ی Dey و Dora (۲۰۱۴) در بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی ضایعات میگو (*Penaeus monodon* و *Penaeus indicus*) روی ماهی کراکر (*Micropogonias undulatus*) نگهداری شده در یخچال، مطالعه Hu و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) روی ماندگاری ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*)، پژوهش Nikoo و همکاران (۲۰۱۵) در بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت سرمایی ژلاتین آبکافتی تهیه‌شده از پوست ماهی Amur sturgeon (*Acipenser schrenckii*) در گوشت چرخ‌شده شسته نشده ماهی *Lateolabrax japonicas* در زمان انجماد-یخ‌گشایی و مطالعه‌ی Pezeshk و همکاران (۲۰۱۷) در استفاده از پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی تن زردباله (*Lateolabrax japonicas*) به عنوان یک نگهدارنده طبیعی برای افزایش زمان ماندگاری گوشت چرخ‌شده ماهی کپور نقره‌ای (*Hypophthalmichthys molitrix*) در زمان نگهداری در یخچال (دمای ۴ درجه سانتی‌گراد) اشاره نمود. از این رو هدف از این مطالعه افزایش زمان ماندگاری فیله کپور معمولی (*C. carpio*) هنگام نگهداری در یخچال با استفاده از ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تهیه‌شده از اندرونه خود گونه است.

۲. مواد و روش‌ها

۲.۱. آماده سازی نمونه‌ها و تیمارهای آزمایش

در مرحله‌ی اول آزمایش، ماهی کپور معمولی دو ساله، به تعداد ۱۰ قطعه با میانگین وزن ۰/۶۹۲±۰/۰۵۷ کیلوگرم در مهرماه سال ۱۳۹۸، از یک مزرعه پرورشی واقع در شهر 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 شده و سپس سر و دمزنی و تخلیه اندرونه صورت گرفت. اندرونه خارج شده در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) تا روز آزمایش نگه‌داری شد. آبکافت اندرونه با آنزیم آلکالاز با غلظت ۱ درصد، دمای ۵۵ درجه سانتی-گراد و pH 8 در زمان‌های مختلف ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه انجام شد و پس از بررسی عملکرد پروتئین‌های آبکافتی در مهار رادیکال آزاد DPPH، میزان IC_{50} نمونه حاصل از ۱۸۰ دقیقه آبکافت، ۱/۳۴±۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. همچنین جهت مقایسه با یک آنتی‌اکسیدان رایج، IC_{50} ویتامین C در مهار رادیکال آزاد

نیز تعیین و ۱۳/۷۸±۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر به دست آمد (Ahmadi *et al.*, 2020) که برای مرحله دوم آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

برای مرحله دوم آزمایش، ۸ قطعه ماهی کپور معمولی با میانگین وزن ۰/۰۳۴ ± ۰/۷۶۶ کیلوگرم از بازار تهیه و در حداقل زمان ممکن (با نسبت ماهی به یخ ۱: ۳) به آزمایشگاه منتقل شده و پس از شستشو، در یخچال جهت رفع جمود نعشی نگهداری شدند. زمان مرگ ماهی کپور ۴ ساعت طول کشید و بعد از ۱۲ ساعت در یخچال (۴±۱ درجه سانتی‌گراد) جمود نعشی به اتمام رسید و سپس اندورنه خارج شد. ماهی‌ها به صورت فیله با پوست ۱۰۰ گرمی تقسیم شدند و تیمارها به ترتیب ذیل آماده شدند:

- تیمار اول، (نمونه شاهد) فیله‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در آب مقطر با نسبت ۱:۱ (وزنی/ حجمی) غوطه‌ور شدند.

- تیمار دوم، فیله‌ها با پوست با پروتئین آبکافتی پوشش داده شدند و برای این منظور فیله‌ها با پوست با نسبت ۱:۱ (وزنی/ حجمی) در محلول آب مقطر حاوی پروتئین آبکافتی با غلظت ۱/۳۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۱±۱۷ درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند.

- تیمار سوم، از ویتامین C به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدان تجاری استفاده شد و فیله‌ها با نسبت ۱:۱ (وزنی/حجمی) در محلول آب مقطر حاوی ویتامین C با غلظت ۱۳/۷۸±۰/۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق (۱±۱۷ درجه سانتی‌گراد) غوطه‌ور شدند.

در ادامه، فیله‌ها از محلول خارج و روی غربال قرار گرفته تا خشک شوند، سپس در بسته‌های پلی‌اتیلنی قرار گرفته و به مدت ۲۰ روز در یخچال (۱±۴ درجه سانتی‌گراد) نگهداری و آزمایش‌های مربوطه (در زمان‌های صفر، ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۰ روز) انجام شد (Qiu *et al.*, 2014).

آزمون‌های انجام شده در این مرحله شامل فراسنجه‌های شیمیایی (pH، تیوباربیتوریک اسید و بازهای نیتروژنی فرار)، ارزیابی ارگانولپتیکی و فراسنجه میکروبی (تعیین میزان مجموع بار میکروبی (TVC) و تعداد باکتری‌های سرمادوست (TPC) بود.

۲.۲. اندازه‌گیری pH

به منظور سنجش pH، ابتدا ۵ گرم از نمونه ماهی در ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر با دستگاه هموژنایزر (IKA T25-Digital Ultra-Turrax) در دور 3000 rpm و به مدت ۳۰ ثانیه هموژن گردید. سپس pH به‌وسیله‌ی pH متر دیجیتال (England, pH 512) پس از کالیبراسیون (با محلول استاندارد با pH ۴ و ۷) اندازه‌گیری شد (Abdollahi *et al.*, 2014).

۲،۳. اندازه‌گیری میزان تیوباربیتوریک اسید (TBA)

اندازه‌گیری TBA به روش رنگ‌سنجی انجام شد. مقدار ۲۰۰ میلی‌گرم از نمونه چرخ‌شده ماهی به یک بالن ۲۵ میلی‌لیتری انتقال یافت و سپس با ۱- بوتانل به حجم رسانده شد. ۵ میلی‌لیتر از این مخلوط به لوله‌های خشک دربدار وارد شده و به آن ۵ میلی‌لیتر از معرف TBA افزوده شد (معرف TBA با حل شدن ۲۰۰ میلی‌گرم معرف در ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال ۱- بوتانل پس از فیلترشدن به دست می‌آید). لوله‌های دربدار در حمام آب گرم با دمای ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت قرار گرفته و پس از آن در دمای محیط سرد شدند. سپس مقدار جذب (As) در ۵۳۲ نانومتر در مقابل شاهد آب مقطر (Ab) خوانده شد. مقدار TBA (میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید در کیلوگرم بافت ماهی) بر اساس رابطه زیر محاسبه شد (Kirk, 1991):

TBA = ۲۰۰/۵۰×(مقدار جذب شاهد- مقدار جذب نمونه)

۲.۴. اندازه‌گیری میزان بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N)

۱۰ گرم از نمونه گوشت چرخ شده ماهی همراه با ۲ گرم اکسید منیزیم و ۳۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر داخل بالن

کلدال ریخته، سپس بالن به دستگاه وصل شده و از زیر به آن حرارت داده شد. در انتهای دستگاه یک ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۲۵ میلی‌لیتر محلول اسید بوریک ۲ درصد به همراه چند قطره معرف متیل رد (۰/۱ گرم متیل‌رد در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول به حجم رسانده می‌شود) قرار داده شد. متیل‌رد در محیط اسیدی قرمز رنگ و در محیط بازی زردرنگ شد. عمل تقطیر تا گذشت ۴۵ دقیقه از زمان جوشش مواد درون بالن، با جمع شدن حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر مایع در ارلن مایر ادامه یافت. محلول اسید بوریک به محض قلیایی شدن توسط بازهای ازته فرار تقطیرشده زرد رنگ شد. عمل تیتراسیون توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال (A) تا جایی ادامه یافت که محلول دوباره قرمز رنگ شود. مقدار TVB-N به صورت میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی با توجه به رابطه زیر به دست آمد (Kirk, 1991)

رابطه ۱: $$TVB-N = A \times 14$$

۲.۵. آزمون‌های میکروبی

۲.۵.۱. شمارش کل باکتری‌های فیله ماهی کپور معمولی

۵ گرم از نمونه گوشت ماهی با ۴۵ میلی‌لیتر از محلول سرم فیزیولوژی مخلوط و همگن شد و متعاقب آن، رقت‌های مورد نیاز تهیه شد. ۱ میلی‌لیتر از هر رقت برای کشت باکتری‌ها در محیط پلیت کانت آگار (PCA5) قرار گرفت. نمونه‌های کشت داده شده برای شناسایی بار کل باکتریایی در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند و پس از طی مدت انکوباسیون، پرگنه‌ها شمارش شدند. سپس لگاریتم آن‌ها گرفته شد و تمامی شمارش‌ها به صورت log CFU/g گزارش گردید (Song *et al*., 2012).

۲.۵.۲. شمارش باکتری‌های سرمادوست

تحت شرایط استریل و در زیر هود آزمایشگاهی بسته‌های حاوی نمونه باز شده و مقدار ۵ گرم از فیله توسط پنس و قیچی استریل جدا شد. نمونه‌ی جداشده در کیسه‌های پلاستیکی استریل مخصوص قرار گرفت و پس از افزودن ۴۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل، جهت هموژن شدن محتویات به دستگاه استومیکرو (Science-Inter ۴۰۰) به مدت ۱ دقیقه منتقل گردید. نمونه هموژن شده به روش معمول رقیق‌سازی متوالی شد و بر روی پلیت‌های حاوی محیط کشت آگار مغذی و به روش کشت سطحی کشت داده شد. جهت شمارش باکتری‌های سرمادوست پلیت‌ها به مدت ۱۰ روز در انکوباتور با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Uçak *et al*., 2011).

۲.۶. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

این تحقیق در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد. مقایسه میانگین‌های تیمارهای مختلف فیله در زمان‌های نگهداری، با آنالیز واریانس یکطرفه انجام شد و برای بررسی تفاوت معنی‌دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده شد. تمام آنالیزها با سه بار تکرار انجام شدند. تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 22 انجام گرفت.

۳. نتایج

۳.۱. نتایج بررسی تغییرات pH فیله‌های ماهی کپور معمولی

با توجه به نتایج، میزان pH ماهی در تمام تیمارها در طول زمان ابتدا تا روز ۸ روندی کاهشی داشت (جدول ۱؛ $P<۰/۰۵$)، به طوری که pH تیمار شاهد، کمترین مقدار را داشت، سپس از روز ۱۲ تا ۲۰ روندی افزایشی داشت و در تیمار شاهد نسبت به دو تیمار دیگر، به طور معنی‌داری بیشتر بود ($P<۰/۰۵$). بین تیمار آغشته شده با ویتامین C و تیمار فیله آغشته شده به پروتئین آبکافتی در روزهای ۴، ۱۲ و ۲۰ تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$). در سایر زمان‌ها (۸ و ۱۶) مقدار pH تیمار آغشته شده با ویتامین C به طور معنی‌داری بیشتر از تیمار فیله آغشته

شده به پروتئین آبکافتی بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۱- نتایج بررسی تغییرات pH در تیمارهای مختلف فیله ماهی کپور معمولی نگهداری شده در یخچال (۱± ۴ درجه سانتی‌گراد).

زمان	تیمار		
	شاهد	پروتئین آبکافتی	ویتامین C
قبل از غوطه‌وری	۶/۷۸ ± ۰/۰۲^{Ac}	۶/۷۸ ± ۰/۰۲^{Aa}	۶/۷۸ ± ۰/۰۲^{Aab}
روز ۴	۶/۶۴ ± ۰/۰۴^{Bd}	۶/۷۱ ± ۰/۰۲^{Ab}	۶/۷۵ ± ۰/۰۴^{Ab}
روز ۸	۶/۵۳ ± ۰/۰۱^{Ce}	۶/۶۲ ± ۰/۰۳^{Bd}	۶/۶۸ ± ۰/۰۱^{Ac}
روز ۱۲	۶/۶۵ ± ۰/۰۳^{Ad}	۶/۵۷ ± ۰/۰۲^{Be}	۶/۵۹ ± ۰/۰۸^{Bc}
روز ۱۶	۶/۸۳ ± ۰/۰۳^{Ab}	۶/۶۸ ± ۰/۰۲^{Cc}	۶/۷۳ ± ۰/۰۳^{Bb}
روز ۲۰	۶/۹۴ ± ۰/۰۱^{Aa}	۶/۷۹ ± ۰/۰۲^{Ba}	۶/۸۲ ± ۰/۰۴^{Ba}

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 در زمان‌های مختلف می‌باشد ($P<۰/۰۵$).

۳.۲. نتایج سنجش میزان تیوباربیتوریک اسید (TBA) در نمونه‌های فیله

در تمام تیمارها با گذشت زمان، میزان TBA به طور معنی‌داری افزایش یافت (جدول ۲؛ $P<۰/۰۵$). در تمامی زمان‌های نمونه‌برداری مقدار TBA در نمونه شاهد بیشتر از دو تیمار دیگر (تیمار آغشته به پروتئین آبکافتی و تیمار آغشته به ویتامین C) بوده است ($P<۰/۰۵$)، همچنین در تمامی روزهای نگهداری به جز روز ۴، بین تیمار آغشته به پروتئین آبکافتی و ویتامین C تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($P<۰/۰۵$). در روزهای ۱۲، ۱۶ و ۲۰ میزان TBA در تیمار پروتئین آبکافتی به طور معنی‌داری کمتر از تیمار ویتامین C بود ($P<۰/۰۵$).

جدول ۲- میزان تیوباربیتوریک اسید (بر حسب میلی‌گرم مالون‌دی‌آلدئید در کیلوگرم) در تیمارهای مختلف فیله ماهی کپور معمولی نگهداری شده در یخچال (۱± ۴ درجه سانتی‌گراد).

زمان	تیمار		
	شاهد	پروتئین آبکافتی	ویتامین C
قبل از غوطه‌وری	۰/۰۵ ± ۰/۰۴^{Af}	۰/۰۵ ± ۰/۰۴^{Af}	۰/۰۵ ± ۰/۰۴^{Af}
۴	۰/۲۵ ± ۰/۰۴^{Ae}	۰/۱۵ ± ۰/۰۲^{Be}	۰/۱۸ ± ۰/۰۳^{Be}
۸	۰/۵۲ ± ۰/۰۴^{Ad}	۰/۲۹ ± ۰/۰۴^{Bd}	۰/۲۲ ± ۰/۰۲^{Cd}
۱۲	۰/۷۱ ± ۰/۰۴^{Ac}	۰/۴۸ ± ۰/۰۳^{Cc}	۰/۵۴ ± ۰/۰۴^{Bc}
۱۶	۱/۴۴ ± ۰/۰۷^{Ab}	۰/۹۸ ± ۰/۰۶^{Cb}	۱/۱۱ ± ۰/۰۸^{Bb}
۲۰	۱/۹۹ ± ۰/۰۵^{Aa}	۱/۳۶ ± ۰/۰۷^{Ca}	۱/۴۲ ± ۰/۰۵^{Ba}

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 است. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است ($P<۰/۰۵$).

۳.۳. نتایج سنجش میزان بازهای نیتروژنی فرار (TVB-N) در تیمارهای مختلف

با توجه به نتایج، با گذشت زمان مقدار بازهای نیتروژنی فرار در تمام تیمارها افزایش پیدا کرده است (جدول ۳؛ $P<۰/۰۵$) و میزان آن در هر زمان، در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P<۰/۰۵$)، اما بین تیمار پروتئین آبکافتی و تیمار ویتامین C در هیچ کدام از روزهای (به جز روز دوازدهم) نگهداری تفاوت معنی‌داری وجود نداشت ($P<۰/۰۵$).

۳.۴. آزمون‌های میکروبی

۳.۴.۱. شمارش بار باکتریایی کل در فیله ماهی کپور معمولی

در هر سه تیمار با گذشت زمان شمارش باکتری‌های کل افزایش معنی‌داری نشان داد (جدول ۴؛ $P<۰/۰۵$). در تمامی روزهای آزمایش، شمارش باکتری‌های کل در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P<۰/۰۵$)، اما بین تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C در هیچ‌کدام از روزهای آزمایش، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۳. مقادیر TVB-N (میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت) تیمارهای مختلف فیله ماهی کپور معمولی نگهداری شده در یخچال (۱± ۴ درجه سانتی‌گراد).

	تیمار		
روز	شاهد	پروتئین آبکافتی	ویتامین C
قبل از غوطه‌وری	۴/۶۶ ± ۰/۷۸^{Ae}	۴/۶۶ ± ۰/۷۸^{Af}	۴/۶۶ ± ۰/۷۸^{Af}
۴	۱۷/۶۸ ± ۲/۶^{Ad}	۱۱/۴۴ ± ۰/۹^{Be}	۱۳/۰۱ ± ۲/۳۸^{Be}
۸	۳۲/۲۴ ± ۱/۱۹^{Ad}	۱۵/۶ ± ۰/۷۸^{Bd}	۱۹/۷۶ ± ۱/۸۸^{Bd}
۱۲	۴۲/۱۲ ± ۱/۵۶^{Ac}	۳۶/۶۶ ± ۱/۱۹^{Bc}	۳۲/۸۸ ± ۲/۷^{Cc}
۱۶	۵۵/۳۲ ± ۲/۳۸^{Ab}	۴۱/۰۸ ± ۱/۳۸^{Bb}	۴۳/۶۸ ± ۱/۵۶^{Bb}
۲۰	۷۱/۲۴ ± ۵/۶۴^{Aa}	۶۷/۰۸ ± ۰/۷۸^{Ba}	۶۶/۵۶ ± ۱/۸^{Ba}

داده‌های جدول نشان‌دهنده میانگین ± انحراف معیار سه تکرار است. 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 در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

جدول ۴- نتایج حاصل از شمارش کل باکتری‌های فیله ماهی کپور معمولی (بر حسب LOG CFU/g) نگهداری شده در یخچال (۱± ۴ درجه سانتی‌گراد).

	تیمار		
زمان	شاهد	پروتئین آبکافتی	ویتامین C
قبل از غوطه‌وری	۱/۳۳ ± ۰/۳^{Ae}	۱/۳۳ ± ۰/۳^{Ae}	۱/۳۳ ± ۰/۳^{Ae}
۴	۴/۳۵ ± ۰/۰۹^{Ad}	۴ ± ۰/۰۰۱^{Bd}	۴/۱ ± ۰/۱۷ ^{Bd}
۸	۵/۸۶ ± ۰/۰۵^{Ac}	۵/۴۲ ± ۰/۰۹^{Bc}	۵/۴۸ ± ۰/۰۴ ^{Bc}
۱۲	۸/۰۴ ± /۰۵^{Ab}	۷/۶۲ ± ۰/۰۴^{Bb}	۷/۶ ± ۰/۰۷ ^{Bb}
۱۶	۱۰/۴۵ ± ۰/۰۵^{Aa}	۱۰/۲۴ ± ۰/۰۲^{Ba}	۱۰/۲۵ ± ۰/۰۳^{Ba}

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 است. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است (P<۰/۰۵).

۳.۴.۲. شمارش کل باکتری‌های سرمادوست تیمارهای فیله ماهی کپور معمولی

در هر سه تیمار با گذشت زمان شمارش باکتری‌های سرمادوست افزایش معنی‌داری نشان داد ($P<۰/۰۵$). در تمامی روزهای آزمایش به جز روز ۴ که شمارش باکتری‌های سرمادوست بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد (جدول ۵؛ $P>۰/۰۵$)، در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار دیگر بود ($P<۰/۰۵$). ، اما بین تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C در هیچ‌کدام از روزهای آزمایش، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($P>۰/۰۵$).

جدول ۵- نتایج حاصل از شمارش باکتری‌های سرمادوست فیله ماهی کپور معمولی (بر حسب LOG CFU/g) نگهداری شده در یخچال (۱± ۴ درجه سانتی‌گراد).

	تیمار		
زمان	شاهد	پروتئین آبکافتی	ویتامین C
قبل از غوطه‌وری	۲/۴ ۰±/۲ ^{Ae}	۲/۴ ۰±/۲ ^{Ae}	۲/۴ ۰±/۲ ^{Ae}
۴	۴/۲۱ ۰±/۱۷ ^{Ad}	۴ ± ۰/۰۰۱^{Ad}	۴/۱ ± ۰/۱۰ ^{Ad}
۸	۵/۴۹ ± ۰/۱۱^{Ac}	۵/۱۳ ± ۰/۱۱^{Bc}	۵/۱۴ ± ۰/۰۹ ^{Bc}
۱۲	۶/۸۶ ± ۰/۰۷^{Ab}	۶/۴۶ ± ۰/۰۳^{Bb}	۶/۳۹ ± ۰/۱۴ ^{Bb}
۱۶	۱۰/۲۶ ± ۰/۰۵^{Aa}	۱۰/۱۱ ± ۰/۰۵^{Ba}	۱۰/۱۷ ± ۰/۰۳ ^{Ba}

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 است. حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار در زمان‌های مختلف است ($P<۰/۰۵$).

۴. بحث و نتیجه‌گیری نهایی

با توجه به نتایج بدست آمده از مطالعه حاضر، مقدار pH ابتدا در زمان مرگ ماهی ۶/۷۸ بود و تا زمان انتهای آزمایش مقدار آن به ۶/۹۴ رسید. pH اولیه بسته به گونه ماهی و دیگر فاکتورها می‌تواند بین ۵/۴ تا ۷/۲ متغیر باشد (Roomiani *et al.*, 2019). با توجه به مطالعه Shabanpour و همکاران (۲۰۱۲) روی ماهی کپور معمولی در یخچال، میزان pH در طی سه ساعت اول روندی کاهشی و سپس روندی صعودی داشت. این امر به دلیل جمود نعشی ماهی است. همچنین در ادامه روندی افزایشی داشتند که دلیل آن می‌تواند بعد از فرآیند گلیکولیز، اتولیز و تغییراتی نظیر دناتوره شدن پروتئین‌ها باشد که باعث ایجاد شرایط مناسب برای رشد و تکثیر میکروب‌ها شده و در نهایت تولید ترکیبات فرار ناشی از فعالیت باکتری‌ها مانند آمونیاک و تری متیل آمین می‌تواند منجر به افزایش pH شود (Kostaki *et al.*, 2009؛ Pezeshk *et al.*, 2017؛ Zargar *et al.*, 2016). در طول زمان تیمار آغشته به پروتئین آبکافتی و ویتامین C عملکرد بهتری از خود نشان دادند و در روز بیستم نسبت به تیمار شاهد افزایش pH کمتری داشتند و در مجموع در بیشتر روزها عملکرد تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C بسیار نزدیک بود. با توجه به اینکه افزایش pH با ترکیبات فرار حاصل از فعالیت باکتری‌ها ارتباط دارد، لذا دلیل این تفاوت نسبت به تیمار شاهد می‌تواند به علت عملکرد ضد باکتریایی احتمالی پروتئین آبکافتی (Kotzamanis *et al.*, 2007؛ Sila *et al.*, 2014؛ Jemil *et al.*, 2014) و ظرفیت ویتامین C در کاهش بار باکتریایی نمونه باشد. ویتامین C دارای ویژگی حذف‌کنندگی و اتصال با ترکیباتی همچون یون‌های فلزی، گروه‌های آمینی و سولفید پروتئین است که ممکن

است سبب بروز ویژگی ضد باکتریایی گردد (Khezri Ahamdabad *et al*., 2012).

حد قابل قبول مالون دی‌آلدئید در ماهی محدوده ۲-۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم تعیین شده است (Zargar *et al*., 2016). افزایش میزان TBA در تیمارها در طول دوره را می‌توان به اکسیداسیون لیپید و تولید متابولیت‌های فرار در حضور اکسیژن مربوط دانست (Hamzeh and Rezaei, 2011). در مطالعه‌ی حاضر روند TBA در تمام تیمارها روندی افزایشی داشت. کمترین مقدار TBA در زمان صفر قبل از غوطه‌وری یعنی کمی بعد از مرگ ماهی بود و با افزایش زمان مقدار آن نیز افزایش پیدا کرد ، اما در تیمارهای آغشته به پروتئین آبکافتی و ویتامین C شدت این افزایش نسبت به نمونه شاهد کمتر بود. این مقدار به جز روز چهارم، در تیمار آغشته به پروتئین آبکافتی به طور معنی‌داری کمتر از تیمار ویتامین C مشاهده شد ($P<۰/۰۵$). فیله آغشته شده به پروتئین آبکافتی عملکرد بهتری را نسبت به فیله آغشته به ویتامین C و شاهد داشت، به نحوی که تا روز شانزدهم مقدار آن کمتر از یک میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید بر کیلوگرم بود، در حالیکه در نمونه ویتامینC و شاهد، در روز شانزدهم مقدار آن از یک میلی‌گرم مالون دی‌آلدئید بر کیلوگرم عبور کرد. دلیل افزایش TBA در طول نگهداری می‌تواند تشکیل ترکیبات آلدئیدی حاصل از شکست پراکسیدها باشد (Rostamzad and Mousavi, 2016). در مطالعه‌ی Dey و Dora (۲۰۱۴) در بررسی ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی ضایعات میگو (*Penaeus monodon* و *Penaeus indicus*) و استفاده از آن به عنوان پوشش در نگهداری ماهی کراکر (*Micropogonias undulatus*) در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) به مدت ده روز مشخص شد که تا روز شش افزایش TBA در بین تیمارهای دارای پوشش پروتئین آبکافتی و تیمار شاهد معنی‌دار نبود، و بیان شد که افزایش TBA مربوط به تشکیل محصولات ثانویه اکسیداسیون است. در پایان آزمایش انجام شده توسط این محققین، بیشترین میزان TBA در تیمار کنترل (پوشش داده شده با آب مقطر) مشاهده شد و نشان دهنده‌ی نرخ بیشتر اکسیداسیون لیپید در این تیمار بود. پوشش پروتئین آبکافتی با مکانیزم‌های متفاوتی مانند حذف رادیکال آزاد، شلاته‌کنندگی آهن و فعالیت احیایی، می‌تواند از آغاز اکسیداسیون توسط یون‌های فلزی جلوگیری کند. در مطالعه‌ی Kilic و Oztan (۲۰۱۶) نمونه پوشش داده شده با ویتامین C در غلظت ۲/۵ درصد نسبت به شاهد عملکرد بهتری داشت، در مطالعه حاضر نیز تیمار فیله آغشته شده به ویتامین C نسبت به شاهد عملکرد بهتری نشان داد. چون بر اساس مکانیسم یک مولکولی و دو مولکولی، زمانی که مقادیر هیدروپراکسید عضلات ماهی کم باشد، سرعت تشکیل این ترکیبات سریعتر از شکستگی آن‌ها خواهد بود. در مطالعه Hu و همکاران (۲۰۱۳)، که به بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ (*H. molitrix*) (با غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) روی ماندگاری ماهی کپور معمولی پرداخته شد، نتایج نشان داد که TBA نمونه شاهد و نمونه فیله پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی تا روز هشتم تفاوت معنی‌داری نداشتند، ولی بعد از روز هشتم روند افزایشی در نمونه شاهد بیشتر از نمونه پروتئین آبکافتی بود. در مطالعه‌ی Nikoo و همکاران (۲۰۱۵)، که اثرات آنتی‌اکسیدانی و محافظت سرمایی ژلاتین آبکافتی تهیه‌شده از پوست ماهی Amur sturgeon (*A. schrenckii*) در گوشت چرخ‌شده شسته نشده ماهی *L. japonicas* در زمان انجماد-یخ‌گشایی را مورد بررسی قرار دادند، تاثیر ژلاتین آبکافتی را در کاهش TBA نسبت به تیمار شاهد گزارش نمودند. Pezeshk و همکاران (۲۰۱۷) نیز کاهش معنی‌داری در محتوای TBA گوشت چرخ‌شده ماهی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی تن زردباله (*L. japonicas*) در زمان نگهداری در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نسبت به تیمار شاهد مشاهده نمودند. بنابراین، با توجه به نتایج پژوهش‌های مختلف، پروتئین آبکافتی توانایی جلوگیری از اکسیداسیون اسیدهای چرب غیر

اشباع را دارد (Pezesk *et al*., 2017؛ Hu *et al*., 2013). در مطالعه حاضر نیز عملکرد بهتر پوشش‌های مورد استفاده روی فراسنجه TBA به ویژگی آنتی‌اکسیدانی ویتامین C (Girgih *et al*., 2013) و پروتئین‌های آبکافتی (Giménez *et al*., 2009؛ Hu *et al*., 2013؛ Gajanan *et al*., 2016) مرتبط است که می‌تواند از افزایش این فراسنجه در طول نگهداری جلوگیری نماید. ویژگی آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی مورد استفاده در تحقیق حاضر در مطالعه Ahmadi و همکاران (۲۰۲۰) تعیین و بررسی شده است.

طبقه‌بندی کیفی ماهی بر اساس TVB_N به این صورت است که اگر مقدار TVB-N در گوشت ماهی تا ۲۵ میلی‌گرم باشد آن را بسیار خوب، تا ۳۰ میلی‌گرم خوب، تا ۳۵ میلی‌گرم را قابل پذیرش و در مقادیر بالای ۳۵ میلی‌گرم آن را فاسد می‌دانند (Taşkaya and Yaşar, 2018). با توجه به نتایج مطالعه حاضر مشخص شد که میزان بازهای ازته فرار وابسته به زمان است به طوری که با افزایش زمان مقدار TVB-N نیز افزایش پیدا کرده و این روند معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$)، دلیل این امر می‌تواند افزایش میزان بار باکتریایی گوشت و افزایش فعالیت‌های آنزیمی در طول زمان و تشکیل TVB-N به علت تجزیه پروتئین‌ها، آمینواسیدها، انواع متیل آمین‌ها و نیتروژن‌های غیر پروتئینی دیگر باشد (Sallam and Samejima, 2004). غلظت بازهای نیتروژنی فرار بر اساس میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت گزارش می‌شود. در مطالعه حاضر کمترین مقدار TVB-N در زمان مرگ ماهی یعنی صفر قبل غوطه‌وری (۰/۷۸ ± ۴/۶۶ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت) بود، اما با گذشت زمان مقدار TVB-N افزایش پیدا کرد و بیشترین مقدار آن در تیمار شاهد و در روز بیستم (۵/۶۴ ± ۷۱/۲۴ میلی‌گرم نیتروژن در ۱۰۰ گرم گوشت) مشاهده شد و پیشرفت بیشتر فساد باکتریایی را در تیمار شاهد نشان می‌دهد که در فراسنجه‌های میکروبی هم مشاهده شده است. تیمار شاهد از روز هشتم از حد مجاز گذشت و زودتر از باقی تیمارها به محدوده غیر قابل پذیرش رسید. تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C در روز دوازدهم از محدوده‌ی ۲۵ میلی‌گرم نیتروژن به ازای ۱۰۰ گرم گوشت عبور کرد. دلیل این تفاوت نسبت به تیمار شاهد می‌تواند به علت عملکرد ضد باکتریایی پروتئین آبکافتی (Jemil *et al*., 2014؛ Kotzamanis *et al*., 2007؛ Sila *et al*., 2014) و ظرفیت ویتامین C در کاهش بار باکتریایی نمونه باشد، چون TVB-N متاثر از فعالیت بار باکتریایی است و همانطور که گفته شد، ویتامین C دارای ویژگی حذف-کنندگی و اتصال با ترکیباتی همچون یون‌های فلزی، گروه‌های آمینی و سولفید پروتئین است که ممکن است سبب بروز ویژگی ضد باکتریایی گردد (Khezri Ahmadabad *et al*., 2012). در مطالعات da silva Santos و همکاران (۲۰۱۷) و Kilic و Oztan (۲۰۱۶) روند TVB-N افزایشی بود و تیمار پوشش داده شده با ویتامین C عملکرد بهتری را نشان داد. نتایج مطالعه Hu و همکاران (۲۰۱۳)، در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ (*H. molitrix*) روی ماندگاری ماهی کپور معمولی مشخص شد که مقدار TVB-N نمونه شاهد در روز ششم ۱۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم بود، ولی نمونه پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی (با غلظت ۱۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تا روز دهم به ۱۶ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم نرسیده بود. Jeon و همکاران (۲۰۱۲) میزان TVB-N را در ماهی هرینگ در دامنه ۳۳-۵۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گزارش نموده‌اند. میزان TVB-N در نمونه پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی در روز شانزدهم ۱۹ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در ۱۰۰ گرم بود. نتایج مطالعه Ghojoghi و همکاران (۲۰۱۵) روی نگهداری ماهی کپور با استفاده از ویتامین C در غلظت ۱۰۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در یخچال، نشان داد که نسبت به شاهد به مراتب عملکرد بهتری دارد و مقدار آن در روز بیست و یک ۲۵/۴۷۷ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت ثبت شد.

یک معیار برای کیفیت بهداشتی فیله ماهی شمارش باکتری کل آن است و قابل مصرف بودن آن محصول را بیان می‌کند. بیشترین مقدار پیشنهاد شده برای TVC در

آبزیان ۷ log CFU/g است (ICMSE, 1986). بیشترین جمعیت میکروارگانیسم‌ها مربوط به باکتری‌های مزوفیل است و دمای رشد این باکتری‌ها ۲۵-۴۰ درجه سانتی‌گراد است (Pilmal *et al*., 2018). با توجه به نتایج مطالعه حاضر، در طول زمان تعداد Log باکتری روندی افزایشی داشت. بیشترین تعداد Log باکتری مربوط به روز بیستم در نمونه شاهد (۰/۰۵ ± ۱۰/۴۵ Log CFU/g) بود. تعداد باکتری در تیمارهای آغشته به پروتئین آبکافتی و تیمار آغشته به ویتامین C نسبت به شاهد کمتر بود، ولی نسبت به همدیگر در تمام روزها اختلاف معنی‌داری نداشتند. اما تمام نمونه‌ها بعد از روز هشتم از حد مجاز گذشته‌اند. در مطالعه Ghojoghi و همکاران (۲۰۱۵) که به بررسی اثر ویتامین C (غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در طول نگهداری ماهی کپور معمولی پرداختند، مشخص شد که میزان بار باکتری کل در روز ۲۱ به مقدار ۵/۳ Log CFU/g بود.

گروه اصلی میکروارگانیسم‌های مسئول فساد ماهی در شرایط نگهداری در یخچال باکتری‌های گرم منفی سرمادوست (*Pseudomonas spp* و *Shewanella putrefaciens*) اند. حد مجاز برای باکتری‌های سرمادوست Log 7 CFU/g است (Hu *et al*., 2013). با توجه نتایج مطالعه حاضر، میزان آن به صورت معنی‌داری با گذشت زمان افزایش پیدا کرد و تیمار شاهد نسبت به دو تیمار دیگر عملکرد ضعیف‌تری داشت. تمام نمونه‌ها تا روز دوازدهم از حد مجاز خود عبور نکرده بودند. بین تیمار پروتئین آبکافتی و ویتامین C تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد. در مطالعه‌ی Hu و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از پوست ماهی فیتوفاگ (*H. molitrix*) روی ماندگاری ماهی کپور معمولی مشخص شد که استفاده از پوشش پروتئین آبکافتی شمارش باکتریایی کل را نسبت به تیمار شاهد کاهش داد و این موضوع را به ویژگی ضد باکتریایی پروتئین آبکافتی نسبت دادند. Pezeshk و همکاران (۲۰۱۷) نیز به دلیل ویژگی ضد باکتریایی پروتئین آبکافتی، کاهش معنی‌داری را در شمارش باکتریایی کل و شمارش باکتری‌های سرمادوست در گوشت چرخ‌شده ماهی کپور نقره‌ای (*H. molitrix*) پوشش داده شده با پروتئین آبکافتی اندرونه ماهی تن زردباله (*L. japonicas*) در زمان نگهداری در یخچال (۴ درجه سانتی‌گراد) نسبت به تیمار شاهد مشاهده نمودند. در مطالعه حاضر نیز دلیل تفاوت دو تیمار با پوشش پروتئین آبکافتی و ویتامین C نسبت به تیمار شاهد می‌تواند به علت عملکرد ضد باکتریایی پروتئین آبکافتی (Kotzamanis *et al*., 2007؛ Sila *et al*., 2014؛ Jemil *et al*., 2014) و ظرفیت ویتامین C در کاهش بار باکتریایی نمونه باشد (Khezri Ahmadabad *et al*., 2012)، در مطالعه حاضر، این تاثیر ضد باکتریایی در فراسنجه‌های میکروبی و فراسنجه‌های وابسته به فعالیت میکروبی شامل pH و TVB-N نیز مشاهده شد. در مطالعه Ghojoghi و همکاران (۲۰۱۵) اثر ویتامین C (غلظت ۳۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) در طول نگهداری ماهی کپور معمولی مورد بررسی قرار گرفت و میزان بار باکتری سرمادوست در روز بیست و یک در تیمار آغشته شده به ویتامین C مقدار ۴/۹ Log CFU/g گزارش شد.

نتیجه‌گیری نهایی

در مطالعه‌ی حاضر از پروتئین آبکافتی به عنوان یک پوشش آنتی‌اکسیدانی جهت نگهداری فیله کپور معمولی در یخچال استفاده شد. استفاده از پوشش پروتئین آبکافتی از روند افزایش pH بین روزهای هشتم تا بیستم جلوگیری کرد و مقدار TBA نیز در این تیمار تا روز شانزدهم از ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عبور نکرد. علاوه بر این پروتئین آبکافتی توانست تا روز هشتم مقدار TVB-N را در محدوده‌ی خیلی خوب یعنی کمتر از ۲۰ میلی‌گرم ازت در ۱۰۰ گرم گوشت نگه دارد. همچنین پوشش پروتئین آبکافتی توانست مقدار باکتری کل و سرمادوست را تا روز دوازدهم در حدود Log 7 CFU/g حفظ کند. بنابراین، می‌توان گفت پروتئین آبکافتی با توجه به نتایج فراسنجه‌های مورد بررسی می‌تواند به عنوان یک

آنتی‌اکسیدان در زمان نگهداری فیله ماهی در یخچال فعالیت کند و مقایسه بین پروتئین آبکافتی و ویتامین C، نشان داد که پروتئین آبکافتی در IC_{50} مشابه با یک آنتی‌اکسیدان صنعتی، قادر است عملکردی مشابه به آن را داشته باشد و می‌توان از آن به عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی در صنایع مختلف مانند صنایع غذایی استفاده کرد.

۵. منابع

References

Abdollahi, M., Rezaei, M., Farzi, G., 2014. Influence of chitosan/clay functional bionanocomposite activated with rosemary essential oil on the shelf life of fresh silver carp. *International Journal of Food Science Technology* 49(3), 811-818.

Ahmadi, H., Yeganeh, S., Esmaeili Kharyeki, M., 2020. Investigation of antioxidant properties of hydrolyzed protein derived from Common carp (*Cyprinus carpio*) viscera. *Journal of Fisheries* 73(4), 593-606. (in Persian)

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(1), 92-98.

Bakhshan, A., 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(1), 1143-1152. (in Persian)

da Silva Santos, F.M., da Silva, A. I.M., Vieira, C. B., de Araújo, M.H., da Silva, A.L.C., das Graças Carneiro-da-Cunha, M., de Souza Bezerra, R., 2017. Use of chitosan coating in increasing the shelf life of liquid smoked Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fillet. *Journal of Food Scienc Technology* 54(5), 1304-1311.

Dey, S.S., Dora, K.C., 2014. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science Technology* 51(3), 449-457.

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

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(4), 1851-1869.

Gajanan, P.G., Elavarasan, K., Shamasundar, B.A., 2016. Bioactive and functional properties of protein hydrolysates from fish frame processing waste using plant proteases. *Environmental Science and Pollution Research* 23(24), 24901-24911.

Ghojoghi, F., Hosseini-Shekarabi, S.P., Mohamadi, A., 2015. Antimicrobial and antioxidant properties of ascorbic acid on common carp (*Cyprinus carpio*) fillet during refrigerated storage. *Journal of Food Microbiology*, *2*(1), 13-25. (in Persian)

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. *Journal of Food Research International* 52(1), 315-322.

Hamzeh, A., Rezaei, M., 2011. Antioxidant and antibacterial effects of sodium alginate coating enriched with thyme essential oil on rainbow trout fillets during refrigerated storage. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology* 6(3), 11-20. (in Persian)

Hosseini, S., Ghoroghi, A., Jamalzadeh, H., Safari, R., Hosseini, S., 2012. 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)

Hu, S., Luo, Y., Cui, J., Lu, W., Wang, H., You, J., Shen, H., 2013. Effect of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) muscle hydrolysates and fish skin hydrolysates on the quality of common carp (*Cyprinus carpio*) during 4° C storage. *International Journal of Food Science Technology* 48(1), 187-194.

Ishak, N., Sarbon, N., 2018. A review of protein hydrolysates and bioactive peptides deriving from wastes generated by fish processing. *Food and Bioprocess Technology* 11(1), 2-16.

Jahed Khaniky, G. R., Salehi, A., Shariatifar, N., Alimohammadi, M., Sedighara, P., 2015. Evaluation of Antioxidant Effects of Water and Ethanolic Extracts of Iranian Pomegranate Seed on Lipid Quality of Trout Fillet and Determining the Level of Perishability at 2-4 ° C. *Journal of Neyshabur University of Medical Sciences* 3(2), 10-17. (in Persian)

Javadian, S., 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). *Journal of Marine Biology* 7(2), 83-90. (in Persian)

Jemil, I., Jridi, M., Nasri, R., Ktari, N., Salem, R. B. S.-B., Mehiri, M., Nasri, M., 2014. Functional, antioxidant and antibacterial properties of protein hydrolysates prepared from fish meat fermented by *Bacillus subtilis* A26. *Process Biochemistry* 49(6), 963-972.

Jeon, Y.J., Kamil, J.Y.V.A., Shahidi, F., 2002. Chitosan as an edible invisible film for quality preservation of herring and Atlantic cod. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 5167–5178.

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 Univerity of Medical Sciences* 24(120), 188-208. (in Persian)

Khezri Ahmadabad, M., Rezaei, M., Ojagh, M., 2012. The effect of ascorbic acid combined with whey protein coating on the shelf-life of rainbow trout stored at refrigerator temperature: Microbial and chemical analyzes. *Iranian Jounal of Nutrition Sciences and Food Technology* 7(3), 69-78. (in Persian)

Kilic, A., Oztan, A., 2016. Preservative characteristics of ascorbic acid on color, texture and fatty acid of cold-smoked fish. *International Journal of Food Engineering* 12(1), 49-61.

Kirk, R.S., Sawyer, R., Pearson, D., 1991. Pearson's composition and analysis of foods. Harlow. *Longman Scientific and Technical* 643-642.

Kostaki, M., Giatrakou, V., Savvaidis, I. N., Kontominas, M.G., 2009. Combined effect of MAP and thyme essential oil on the microbiological, chemical and sensory attributes of organically aquacultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fillets. *Food Microbiology* 26(5), 475-482.

Kotzamanis, Y., Gisbert, E., Gatesoupe, F., Infante, J.Z., Cahu, C., 2007. Effects of different dietary levels of fish protein hydrolysates on growth, digestive enzymes, gut microbiota, and resistance to Vibrio anguillarum in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Comparative Biochemistry Physiology Part A: Molecular Integrative Physiology* 147(1), 205-214.

Li, Q., Li, D., Qin, N., Hong, H., Luo, Y., 2016. Comparative studies of quality changes in white and dark muscles from common carp (*Cyprinus carpio*) during refrigerated (4° C) storage. *International Journal of Food Science Technology* 51(5), 1130-1139.

Mesbah, M., Mohammadi, G., Khageh, G., Mombaini, A., 2017. Evaluation of Physical and Biochemical characteristics of farmed common carp (*Cyprinus carpio*) melt of Khuzestan province in winter season. *Iranian Veterinary Journal* 12(4), 109-117. (in Persian)

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.

Nikoo, M., Benjakul, S., Xu, X., 2015. Antioxidant and cryoprotective effects of Amur sturgeon skin gelatin hydrolysate in unwashed fish mince. *Food Chemistry* 181, 295-303.

Ovissipour, M.R., 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), 68-76. (in Persian)

Pezeshk, S., Ojagh, S. M., Rezaei. M., Shabanpour, B., 2017. Antioxidant and Antibacterial Effect of Protein Hydrolysis of Yellowfin Tuna Waste on Flesh Quality Parameters of Minced Silver Carp. *Journal of Genetic Resources* 3, 103-112.

Pilmal, M., Alizadeh Doughikollaee, E., Yousef Elahi, M., 2018. Effect of Edible Chitosan Coating Containing Cinnamon Essential Oil on the Shelf Life of Silver Carp Fish Finger during Refrigerated Storage. *Journal of Fisheries (Iranian Journal of Natural Resources)* 71(3), 294-305. (in Persian)

Qiu, X., Chen, S., Dong, S., 2014. Effects of Silver Carp Antioxidant Peptide on the Lipid Oxidation of Sierra Fish Fillets (*Scomberomorus Niphonius*) during Frozen Storage. *Journal of Food Biochemistry* 38(2), 167-174.

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)

Roomiani, L., Ghaeni, M., Moarref, M., Fallahi, R., Lakzaie, F., 2019. The effects of *Rosmarinus officinalis* essential oil on the quality changes and fatty acids of *Ctenopharyngodon idella*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 18(1), 95-109.

Rostamzad, H., Mousavi, S., 2016. Chemical and microbial changes in silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) fillet during storage in refrigerator. *Aquatic Animals Nutrition* 2(1), 61-72. (in Persian)

Sadhan, S.D., Krushna, C.D., 2011. Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Association of Food Scientists & Technologists, 51*, 449-457.

Sallam, K.I., Samejima, K., 2004. Microbiological and chemical quality of ground beef treated with sodium lactate and sodium chloride during refrigerated storage. *LWT-Food Science Technology* 37(8), 865-871.

Sarmadi, B. H., Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: a review. *Peptides* 31(10), 1949-1956.

Sathivel, S., Huang, J., Bechtel, P. J., 2008. Properties of pollock (*Theragra chalcogramma*) skin hydrolysates and effects on lipid oxidation of skinless pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) fillets during 4 months of frozen storage. *Journal of Food Biochemistry* 32(2), 247-263.

Shabanpour, B., Asghari, M., Heidari, S., Baee, H., Ghorbani, H., Jafer, A., 2016. Comparing of qualitative changes among the carps culturing in a pond, an under controlled place and marine carp during refrigeration. *Journal of Animan Researches* 28(4), 466-480. (in Persian)

Shabanpour, B., Kordjazi, M., Ojagh, S. M., Nadimi, A., 2016. Effect of primary preparation and shelflife in Freezar on Quality factors of Common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Innovation in Food Science and Technology* 9(2), 111-122. (in Persian)

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

Sila, A., Nedjar-Arroume, N., Hedhili, K., Chataigné, G., Balti, R., Nasri, M., Bougatef, A., 2014. Antibacterial peptides from barbel muscle protein hydrolysates: Activity against some pathogenic bacteria. *LWT-Food Science Technology* 55(1), 183-188.

Song, H.Y., Shin, Y.J., Song, K.B., 2012. Preparation of a barley bran protein–gelatin composite film containing grapefruit seed extract and its application in salmon packaging. *Journal of Food Engineering* 113(4), 541-547.

Statistical Year Book of the Fisheries organization. 2014-2019. Deputy Director of Planning and Planning Management. Pp, 64. (in Persian)

Taşkaya, L., Yaşar, E., 2018. Determination of some quality properties of "hamsi kaygana" prepared with different additives. *Food Science & Nutrition* 6(2), 483-491.

Uçak, İ., Özogul, Y., Durmuş, M., 2011. The effects of rosemary extract combination with vacuum packing on the quality changes of Atlantic mackerel fish burgers. *International Journal of Food Science Technology* 46(6), 1157-1163.

Udenigwe, C.C., Aluko, R.E., 2012. Food protein-derived bioactive peptides: production, processing, and potential health benefits. *Journal of Food Science* 77(1), R11-R24.

Yasemi**,** M**.**, Ghomi Marzdashti**,** M**.**, Darnahal**,** T**.**, Mohammadzadeh**,** B., Amini**,** H., 2013. Yield 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)

Yeganeh, S., Esmaeili Kharyeki, M., Ahmadi, H., 2021. Effect of hydrolysis time on the antioxidant activity of Common carp (*Cyprinus carpio*) head protein hydrolysate. I*ranian Scientific Fisheries Journal* 29(6), 29-42. (in Persian)

Zargar, M., Yeganeh, S., Razavi, S. H., Ojagh, S. M., 2016. The Effect of sodium caseinate coating incorporated with *Zataria moltiflora* essential oil on the quality and shelf life of rainbow trout during refrigerated storage. *Journal of Aquatic Food Product Technology* 25(8), 1311-1322.