مجله علوم وفنون دریایی، فصل نامه ی علمی پژوهشی

دوره ۲۲، شماره ۴، زمستان ۱۴۰۲، صفحات ۴۴ تا ۵۶

مقاله پژوهشی

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تهیه شده از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر

سید محمود ربیعی، سکینه یگانه*، مینا اسمعیلی خاریکی

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

نویسنده مسئول، پست الکترونیک: s.yeganeh@sanru.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۰۳ **تاریخ بازنگری:** ۱۴۰۰/۰۳/۰۸ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۰/۰۳/۱۱

شناسه دیجیتال (DOI): 10.22113/JMST.2021.274219.2421

چکیده

در مطالعه حاضر خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر در زمان‌های مختلف آبکافت مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور ۲۰ قطعه ماهی کفال با میانگین وزنی ۵۰ ± ۳۰۰ گرم تهیه شد و ضایعات شامل سر، باله‌ها و امعاء و احشاء جهت انجام آبکافت با آنزیم آلکالاز ۲/۴ L (غلظت آنزیم ۱/۵ درصد وزن ماده اولیه، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸) در زمان‌های مختلف آبکافت شامل ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه مورد استفاده قرار گرفت. نتایج نشان داد درصد پروتئین و خاکستر در پودر پروتئین آبکافتی نسبت به نمونه‌ی خام به طور معنی‌داری افزایش و درصد چربی کاهش یافت ($p<۰/۰۵$). پروتئین محلول و درجه آبکافت ضایعات با افزایش زمان آبکافت تا ۱۲۰ دقیقه افزایش یافتند ($p<۰/۰۵$). قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH با افزایش غلظت پروتئین تا ۱۲۰ دقیقه، افزایش پیدا کرد ($p<۰/۰۵$) و کمترین مقدار IC_{50} در زمان ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه (به ترتیب ۰/۰۶±۱/۰۴، ۰/۰۱±۱/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به دست آمد ($p<۰/۰۵$). با افزایش غلظت پروتئین و زمان آبکافت، قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی افزایش معنی‌داری پیدا کرد ($p<۰/۰۵$). قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS نیز، با افزایش زمان آبکافت تا ۱۲۰ دقیقه افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). به طور کلی، با توجه به اینکه پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH، ABTS و همچنین قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی عملکرد مناسبی نشان دادند، می‌توان اظهار داشت که این محصول قابلیت استفاده به عنوان یک ترکیب آنتی‌اکسیدانی را دارد.

واژگان کلیدی: کفال ماهیان دریای خزر، پروتئین آبکافتی، خواص آنتی‌اکسیدانی، قدرت مهار رادیکال DPPH، قدرت کاهندگی آهن.

Copyrights:

Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

۱-مقدمه

فرآورده‌های محتوی آمینواسیدها و مشتقات آن‌ها به طور وسیعی در صنایع غذایی، دارویی، میکروبیولوژی و خوراک دام، طیور و آبزیان کاربرد دارد. ضایعات ماهی و آبزیان که غنی از ترکیبات ارزشمند همانند پروتئین هستند، به طور مستقیم به محیط دورریز می‌شوند و یا نهایتا به محصولات کم ارزش تبدیل می‌شوند و صنایع فرآوری غذاهای دریایی باید به دنبال جایگزینی برای جلوگیری از دورریز آن‌ها و یافتن روش‌هایی برای تبدیل آن‌ها به محصولات ارزشمند باشد (Ovissipour et al., 2009 a, b). با توجه به سرانه جهانی مصرف آبزیان در سال ۲۰۱۸ (۲۰/۵ کیلوگرم) و سرانه مصرفی آبزیان ایران در سال ۱۳۹۸ (۱۳/۳ کیلوگرم)، ضایعات فراوانی ایجاد می‌شود، به طوریکه ۱۹/۷ درصد از کل تولیدات شیلاتی جهان (صید و آبزی‌پروری) تبدیل به ضایعات شده و به مصارف غیر انسانی رسیده است (FAO, 2020). این ضایعات عمدتاً شامل سر، محتویات درون شکم، پوست، استخوان‌ها و فلس می‌باشد (Gajanan et al., 2016). یکی از راهکارهای استفاده از این منبع پروتئینی تولید پروتئین آبکافتی می‌باشد. تشکیل پروتئین آبکافتی طی یک فرایند بیوشیمیایی پیچیده به نام پروتئولیز از درشت مولکول‌های پروتئین یا پلی‌پپتیدها انجام می‌شود (Pasupuleti et al., 2010). آبکافت آنزیمی با دارابودن مزایایی شامل آسان بودن شرایط فرآوری، کنترل واکنش و تشکیل حداقل فرآورده‌های جنبی، ایجاد شرایط واکنش ملایم‌تر، خواص کارکردی و تغذیه‌ای پپتیدها را بهبود بخشیده و محصول نهایی نیز در این روش قابلیت پیش‌بینی بیش‌تری پیدا می‌کند (Ovissipour et al., 2010). کاربرد تکنولوژی آنزیمی برای بازیافت پروتئین از ماهی موجب دستیابی به طیف وسیعی محصولات غذایی با دامنه‌ی گسترده‌ای از کاربردها می‌گردد (Ovissipour et al., 2009 a, b)، که از آن جمله می‌توان به خواص ضد میکروبی، ضد فشار خون، ضد سرطانی، ضد دیابت، تقویت‌کننده سیستم ایمنی بدن، مهارکنندگی آنزیم تبدیل کننده آنژیوتنسین، عملکرد ضد انعقادی، فعال‌کنندگی نورون، تنظیم‌کنندگی سیستم هورمونی و هم‌چنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اشاره کرد (Shahidi and Zhong, 2015; Jiang et al., 2014). جلوگیری از اکسیداسیون لیپیدها، جهت حفظ کیفیت مواد غذایی بیش‌ترین نگرانی را در صنایع غذایی به وجود آورده است (Sadhan and Krushna, 2011). مصرف مکرر محصولات اکسیداسیون چربی، ممکن است منجر به سرطان، بیماری‌های قلبی–عروقی و آلزایمر در انسان شوند. از این رو استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها به منظور جلوگیری از فساد اکسیداتیو و کاهش بیماری‌های ناشی از این فرآیند در محصولات غذایی به یکی از اهداف مهم صنعت مواد غذایی تبدیل شده است. پروتئین آبکافتی محتوی پپتیدهای آنتی‌اکسیدان به عنوان یک محصول ایمن و سالم با ویژگی‌هایی شامل، وزن مولکولی کم، فعالیت بالا، ارزان و قابلیت جذب آسان می‌باشند و برخلاف آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، دارای پایداری بالاتر در شرایط مختلف، ایمنی، ارزش غذایی و خصوصیات کارکردی زیاد می‌باشند. خصوصیت آنتی-اکسیدانی پپتیدها وابسته به ساختار و توالی آمینواسیدی آن‌ها می-باشد (Sarmadi and Ismail, 2010). شدت و درجه آبکافت آنزیمی بافت‌های ماهی تابعی از عوامل مختلف همانند دما، pH، نوع و مقدار آنزیم، نوع ماده‌ی خام و زمان آبکافت می‌باشد (Neklyudov et al., 2000; You et al., 2009; Movahednia et al., 2016; Shahi et al., 2020). زمان آبکافت با تاثیر بر درجه آبکافت و موجودیت گروه‌های آبگریز، پپتیدهای فعال و آمینواسیدها ویژگی آنتی‌اکسیدانی را تغییر می‌دهد (Shahi et al., 2020). تا به امروز تحقیقات زیادی روی آبکافت آنزیمی قسمت‌های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری انجام شده است. بسیاری از این تحقیقات، اثر آنزیم‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده‌اند که از آن جمله می‌توان به آنزیم پاپائین با منشاء گیاهی (Hoyle, 1994)، آنزیم تریپسین و کیموتریپسین با منشاء جانوری (Ovissipour et al., 2012)، آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز با منشاء میکروبی (Safari et al; 2009; Ovissipour et al., 2009a; Agyei and Danquah, 2012; Kim and Kim, 2013) اشاره نمود. از میان آنزیم‌های متنوع گیاهی، حیوانی و میکروبی، آنزیم آلکالاز با منشا میکروبی به دلیل درجه خوب آبکافت در مدت کم در شرایط pH ملایم مورد علاقه محققین می‌باشد (Aspmo et al., 2005). آنزیم آلکالاز یک نوع سرین پروتئاز بوده و اساسا بخش کربوکسیل آمینواسیدهای آبگریز را می‌شکند (Khushairay et al., 2014; Li et al., 2022).

بر اساس سالنامه آماری شیلات ایران (۱۴۰۱-۱۳۹۷) در سه استان شمالی ایران مجموع آمار صید در سال ۱۴۰۱، ۳۲۵۱۵ تن بوده است که ۱۳۳۹۶ تن آن را ماهیان استخوانی (به جز ماهیان خاویاری و کیلکا) تشکیل می‌دهند (Statistical Year Book of the Fisheries organization of Iran, 2018-2022). کفال ماهیان دارای دو گونه حائز اهمیت به نام‌های کفال پوزه باریک (*Liza saliens*) و کفال طلایی (*Liza aurata*) هستند که در مدت مهر تا فروردین صید می‌شوند (Bamshad et al., 2016). این دو گونه در طی سالهای ۱۹۳۰ الی ۱۹۳۴ توسط روس‌ها از دریای سیاه به دریای خزر آورده شدند (Behruz et al., 2016). بنابراین با توجه به مطالب عنوان‌شده، در این مطالعه درجه آبکافت و عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت شده حاصل از ضایعات کفال‌ماهیان دریای خزر در زمان‌های مختلف فرآیند آبکافت با آنزیم آلکالاز مورد بررسی قرار گرفت.

۲. مواد و روش‌ها

۲۰ قطعه ماهی کفال (*Liza aurata* و *Liza saliens*) با میانگین وزن ۵۰ ± ۳۰۰ گرم از بازار ماهی‌فروشان شهرستان بابل تهیه و در جعبه‌های یونولیتی به همراه یخ (با نسبت ۱: ۳ وزنی/ وزنی) به سرعت به آزمایشگاه دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری منتقل گردید. جهت برطرف کردن آلودگی‌ها و موکوس از سطح ماهیان، 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، باله و محتویات درون شکم ماهی کفال به عنوان ضایعات ماهی در ادامه مراحل تحقیق استفاده شد. ضایعات ماهیان پس از شستشو با آب سرد، با استفاده از چرخ گوشت به طور کامل چرخ شده و پس از بسته بندی، تا روز آزمایش در فریزر (۲۰- درجه سانتی‌گراد) نگهداری شدند.

به‌منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا برای هر تیمار مقدار ۱۰۰ گرم ضایعات چرخ شده کفال‌ماهیان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و با آب مقطر با نسبت ۱: ۲ (v/w) مخلوط و با همزن به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شدند و جهت غیر فعال‌کردن آنزیم‌های درونی در حمام آب گرم در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد به مدت۱۰ دقیقه قرار داده شدند. مقدار آنزیم آلکالاز (Alcalase 2.4 L, Novozymes, Denmark) ۱/۵ درصد (حجمی/وزنی)، دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ در نظر گرفته شد. نمونه در زمان‌های مختلف شامل ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت شد و در نهایت نمونه‌ها به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم آلکالاز، پس از هر زمان مورد مطالعه، به‌مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی (Memmert WNB 29, Germany) در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها به‌منظور جداسازی مواد غیر محلول از پروتئین‌های محلول، تحت عمل سانتریفوژ (۲۰ دقیقه با دور ۸۰۰۰g) در دستگاه سانتریفوژ یخچال‌دار (Sigma, 2-16KL) قرار گرفته و قسمت سوپرناتانت (پروتئین آبکافتی) به وسیله سمپلر جدا شد و برای آنالیزهای مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد (Esmaeili Kharyeki et al., 2018). بخشی از محلول پروتئین آبکافت شده با استفاده از فریز درایر (SUBLIMATOR-VACO5, ZIRBAA Germany) خشک شد و جهت سنجش ترکیب شیمیایی (پروتئین، چربی و خاکستر) مورد استفاده قرار گرفت.

اندازه‌گیری پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت نمونه اولیه و پودر پروتئین آبکافتی بر اساس روش AOAC (2000) انجام شد. مقدار رطوبت نمونه، با قرار دادن ۱ گرم از نمونه در آون (فن آزما گستر، مدل BF 55 E، ایران) با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد تا رسیدن به وزن ثابت تعیین شد. خاکستر با استفاده از کوره الکتریکی (SNOL, 8,2/1100, Lithuania) در دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت، پروتئین خام به روش کجلدال و با ضریب ثابت (۶/۲۵) و اندازه‌گیری چربی کل به کمک دستگاه سوکسله و با استفاده از اتر به عنوان حلال صورت گرفت.

درجه آبکافت براساس روش Hoyle (1994) با استفاده از تری‌کلرواستیک اسید اندازه‌گیری شد. ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین آبکافت شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط شده و سپس با دور g ۸۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش Lowry et al. (1951) تعیین و درجه آبکافت (DH) با رابطه (۱) محاسبه شد:

مقدار پروتئین محلول به روش Lowry et al. (1951) و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (۱-۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد مورد سنجش قرار گرفته و خواندن جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer UV-M51 UV/Vis, Italy)، در طول موج ۷۵۰ نانومتر انجام شد.

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت‌های مختلفی (۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه شد و برای انجام این آزمایش به حجم معینی از محلول نمونه، همان میزان از محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در متانول اضافه شد. مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شده و به مدت ۱۵ الی ۳۰ دقیقه در تاریکی قرار داده شد و سپس جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometer UV-M51 UV/Vis, Italy) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال طبق رابطه (۲) محاسبه گردید (Mishra et al., 2012):

- Ab: جذب شاهد در طول موج ۵۱۷ نانومتر

- As : جذب نمونه در طول موج ۵۱۷ نانومتر

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت‌های مختلفی (۴، ۵ و ۶ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه شد و برای بررسی این ویژگی، ۱ میلی‌لیتر 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 (Oyaizu, 1986).

ابتدا بر اساس غلظت پروتئین محلول، غلظت ۲ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از نمونه پروتئین آبکافتی تهیه شد و برای سنجش فعالیت مهارکنندگی از روش Almán et al. (2011) استفاده شد.

محلول ۷ میلی‌مولار 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، 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 درجه سانتی‌گراد 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 (۳) محاسبه گردید.

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شد و تمام شاخص‌ها حداقل با سه تکرار تعیین شدند و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیرو–ویلک، مقایسه میانگین‌ها برای تعیین تاثیر زمان آبکافت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی با آنالیز واریانس یک طرفه و 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 و بحث

آنالیز تقریبی ضایعات کفال ماهیان و پودر پروتئین آبکافت شده با هم تفاوت معنی‌داری داشت (جدول ۱)، به طوری که درصد پروتئین و خاکستر به طور معنی‌داری افزایش داشتند، اما چربی به طور معنی‌داری کاهش یافتند ($p<0/05$).

نتایج حاصل از سنجش پروتئین محلول و درجه آبکافت ضایعات کفال ماهیان در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه آبکافت در جدول ۲ آمده است. بر اساس این نتایج با افزایش مدت زمان آبکافت تا ۱۸۰ دقیقه، میزان پروتئین محلول افزایش معنی-داری نشان داد ($p<0/05$). در حالیکه درجه آبکافت تا زمان ۱۲۰ دقیقه به طور معنی‌داری افزایش یافت ($p<0/05$). درجه آبکافت ضایعات ماهیان پس از ۱۲۰ دقیقه ثابت بود و اختلاف معنی‌داری با زمان ۱۸۰ دقیقه نداشت ($p>0/05$).

نتایج مربوط به سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد (DPPH) در زمان‌های ۳۰، ۶۰، ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه و با غلظت‌های ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر پروتئین آبکافتی نشان داد که با افزایش غلظت، درصد مهار رادیکال آزاد افزایش پیدا می‌کند (جدول ۳؛ $p<0/05$). با افزایش زمان آبکافت میزان قدرت مهارکنندگی افزایش می‌یابد ($p<0/05$)، اما در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>0/05$).

با توجه به نتایج IC_{50} (جدول ۴)، با افزایش زمان آبکافت تا ۱۲۰ دقیقه، مقدار پروتئین آبکافت شده کمتری برای رسیدن به ۵۰ درصد مهار رادیکال آزاد DPPH نیاز است ($p<0/05$)، ولی در زمان ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری در IC_{50} وجود نداشت ($p>0/05$).

رابطه (۱)
$$DH = \frac{\text{میزان نیتروژن در محلول 10 درصد تری کلرو استیک اسید}}{\text{میزان نیتروژن در نمونه}} \times 100$$

رابطه (۲)
$$DPPH\ (\%) = \frac{(Ab-As)}{Ab} \times 100$$

رابطه (۳)
$$\text{درصد مهار کنندگی} = \frac{\text{جذب نمونه–جذب نمونه شاهد}}{\text{جذب نمونه شاهد}} \times 100$$

جدول ۱. آنالیز تقریبی ضایعات کفال ماهیان و پودر پروتئین آبکافتی (بر حسب درصد وزن ماده خشک)

Table 1. Approximate analysis of fish mullet waste and hydrolyzed protein powder (in percentage of dry matter weight)

Parameters	Moisture (%)	Preotein (%)	Lipid (%)	Ash (%)
Waste	71.5±0.15	40.35±1.01^{b}	29.5±1.26^{a}	21.04±0.64^{b}
Proten hydrolysate powder	4.25±0.22	67.31±1.35^{a}	3.47±0.27^{b}	25.34±1.91^{a}

* Mean±STD. Different letters in each column indicate a significant difference (p<0.05).

جدول ۲. مقدار پروتئین محلول و درجه آبکافت ضایعات کفال ماهیان در زمان‌های مختلف

Table 2. The amount of soluble protein and the degree of hydrolysis of mullet waste at different times

Parameter	Time (min)			
	30	60	120	180
soluble protein (mg/ml)	14.34±0.37^{d}	15.81±0.22^{c}	18.73±0.58^{b}	21.92±0.19^{a}
Degree of hydrolysis (%)	32.84±0.84^{c}	36.05±0.51^{b}	37.53±0.72^{a}	38.56±0.34^{a}

*Mean±STD. Different letters in each raw (different times) indicate a significant difference (p<0.05).

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

Table 3. The results of measuring DPPH free radical inhibitory power (in percentage)

Protein concentration (mg/ml)	Time (min)			
	30	60	120	180
0.5	4.23 ± 0.81^{Cc}	7.1 ± 1.05^{Bc}	17.07 ± 2.01^{Ac}	19.55 ± 1.11^{Ac}
1	21.09 ± 2.21^{Cb}	27.82 ± 2.31^{Bb}	41.61 ± 4.5^{Ab}	42.02 ± 1.08^{Ab}
2	59.24 ± 2.31^{Da}	69.05 ± 1.15^{Ca}	80.49 ± 1.54^{Ba}	87.77 ± 1.30^{Aa}

*Mean±STD. Different uppercased (A, B, C, D) and lowercased (a, b, c, d) letters indicate a significant difference in each raw (different times) and column (different concentrations), respectively ($p<0.05$).

جدول ٤. نتایج حاصل از سنجش قدرت پروتئین آبکافت شده در مهار ۵۰ درصد رادیکال آزاد DPPH (IC_{50})

Table 4. The results of measuring the power of hydrolyzed protein in inhibiting 50% of DPPH free radical (IC_{50})

Time (min)	30	60	120	180
IC_{50} (mg/ml)	1.72 ± 0.04^{a}	1.41 ± 0.05^{b}	1.04 ± 0.06^{c}	1.01 ± 0.01^{c}

*Mean±STD. Different letters in each raw (different times) indicate a significant difference ($p<0.05$)

جدول ۵. نتایج حاصل از قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی در زمان‌های مختلف آبکافت و در غلظت‌های مختلف

Table 5. The results of the reducing power of trivalent iron ion at different times of water extraction and at different concentrations.

Protein concentration (mg/ml)	Time (min)			
	30	60	120	180
4	0.053 ± 0.01^{Dc}	0.100 ± 0.005^{Cc}	0.135 ± 0.01^{Bc}	0.205 ± 0.007^{Ac}
5	0.084 ± 0.01^{Db}	0.155 ± 0.01^{Cb}	0.209 ± 0.007^{Bb}	0.303 ± 0.06^{Ab}
6	0.107 ± 0.003^{Da}	0.184 ± 0.05^{Ca}	0.271 ± 0.006^{Ba}	0.350 ± 0.005^{Aa}

*Mean±STD. Different uppercased (A, B, C, D) and lowercased (a, b, c, d) letters indicate a significant difference in each raw (different times) and column (different concentrations), respectively ($p<0.05$)

جدول ٦. نتایج حاصل از توانایی پروتئین آبکافتی ضایعات کفال ماهیان دریای خزر در مهار رادیکال ABTS

Table 6. Results of the ability of hydrolytic protein of Caspian Sea mullet wastes to inhibit ABTS radical

Protein concentration (mg/ml)	Time (min)			
	30	60	120	180
2	37.64 ± 1.08	$47.06\pm.038^{b}$	55.15 ± 0.78^{a}	56.46 ± 1.28^{a}

*Mean±STD. Different letters in each raw (different times) indicate a significant difference ($p<0.05$)

با افزایش غلظت و زمان آبکافت، قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در تمامی زمان‌ها و غلظت‌ها افزایش معنی‌داری پیدا کرد (جدول ۵؛ $p<۰/۰۵$).

میانگین ± انحراف معیار سه تکرار. حروف بزرگ متفاوت (A,B,C,D) در هر سطر نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین زمان-های مختلف و حروف کوچک متفاوت (a,b,c,d) در هر ستون نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار بین غلظت های مختلف می‌باشد ($p<۰/۰۵$).

قدرت مهارکنندگی رادیکال ABTS با افزایش زمان آبکافت افزایش یافت (جدول ۶؛ $p<۰/۰۵$)، البته بین زمان ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ($p>۰/۰۵$).

٤-بحث و نتیجه‌گیری

به طور کلی هدف اصلی از آبکافت ضایعات ماهی، بازیافت حداکثری اجزاء قابل دسترس به همراه حفظ کیفیت آن‌ها (درجه آبکافت و میزان پروتئین بالا) می‌باشد (Hosseini et al., 2012)، بنابراین ترکیب شیمیایی ضایعات پس از آبکافت دارای

اهمیت است. مقایسه ضایعات کفال ماهیان و پودر پروتئین آبکافتی در تحقیق حاضر نشان‌دهنده افزایش معنی‌دار درصد پروتئین و خاکستر در اثر آبکافت بود. به طوریکه پروتئین از ۱/۰۱± ۴۰/۳۵ درصد در ضایعات ماهی کفال به ۱/۳۵ ± ۶۷/۳۱ درصد در پروتئین آبکافتی رسید. Javadian et al. (2015) میزان پروتئین در کیلکای معمولی خام و آبکافت شده با آنزیم پرومود را به‌ترتیب ۱۵/۵۴ و ۷۸/۹۱ درصد گزارش نمودند. در تحقیق Bakhshan et al. (2014) درصد پروتئین موجود در پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات ماهی آزاد (Salmo salar) با استفاده از آنزیم تریپسین در محدوده ۸۳/۶۳ درصد بدست آمد و به طور مشابه با تحقیق حاضر مقدار پروتئین افزایش یافت. در سایر تحقیقات این میزان ۶۳/۴ تا ۹۰/۸ درصد گزارش شد (Kristinsson and Rasco 2000; Thiansilakul et al., 2007; Ovissipour et al., 2009 a,b; Khantaphant et al., 2011) و با توجه به نوع آنزیم، روش آبکافت و ضایعات مورد استفاده متغیر بود، اما در کلیه این مطالعات میزان پروتئین پس از آبکافت ارتقا یافت که علت آن افزایش حلالیت پروتئین و حذف مواد جامد نامحلول در فرآیند آبکافت عنوان شده است (Chalamaiah et al., 2012). Ovissipour et al. (2009)، میزان پروتئین در پروتئین آبکافت شده امعاء و احشاء تاس‌ماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) با آنزیم آلکالاز را ۶۵/۸۲ درصد و Ovissipour et al. (2010) میزان پروتئین در پروتئین آبکافت شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم را به‌ترتیب ۷۲/۳۴، ۶۷/۳۶ و ۶۳/۶۸ درصد گزارش نمودند. میزان خاکستر نمونه آبکافتی ۲۱/۰۴ درصد در مقابل ۲۵/۳۴ درصد در ضایعات ماهی کفال بود و به طور معنی-داری افزایش پیدا کرد. در مطالعه Bakhshan et al. (2014)، درصد خاکستر پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات ماهی آزاد تفاوت معنی‌داری با درصد خاکستر ضایعات نداشت. Chalamaiah et al. (2012) محتوای خاکستر پروتئین‌های آبکافتی را بین ۰/۴۵ تا ۲۷ درصد گزارش نمودند و Khantaphant et al. (2011)، در مقدار خاکستر موجود در پروتئین آبکافتی حاصل از عضله‌ی red snapper (*Lutjanus vitta*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و فلورزایم تفاوت معنی‌داری مشاهده نکردند و مقدار آن را ۱/۷۶ تا ۱/۷۸ درصد گزارش نمودند، در مقابل در تحقیق Jafari Taraji et al. (2015) خاکستر در نمونه آبکافت‌شده امعاء و احشاء تاس-ماهی سیبری (*Acipenser baerii*) نسبت به ماده خام اولیه افزایش یافت و با تحقیق حاضر همسو بود. علت این افزایش، تغییر میـزان مـاده خشـک و استفاده از اسیدکلریدریک و هیدروکسید سدیم برای تنظیم pH ذکر گردید (Ovissipour et al., 2010; Meshginfar et al., 2014). همچنین درصد چربی پس از فرآیند آبکافت در ضایعات ماهی کفال کاهش یافت. این کاهش در اکثر مطالعات مورد بررسی از جمله مطالعه Bakhshan et al. (2014) و Thiansilakul et al. (2007) عنوان شده است. میزان چربی در پروتئین آبکافت شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم از ۵/۰۸ درصد در ماده خام به‌ترتیب به ۱/۴۳، ۱/۷۶ و ۱/۶۱ کاهش یافت (Ovissipour et al., 2010). میزان چربی در پودر پروتئین آبکافتی حاصل از آبکافت امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز از ۱۲/۹۸ درصد در امعاء و احشاء به‌ترتیب به ۰/۷۷ و ۰/۹۱ درصد کاهش یافت (Reyhani Poul et al., 2018). این محققین علت کاهش چربی را حذف چربی‌ها همراه با بخش‌های نامحلول پروتئین تحت تاثیر سانتریفوژ بیان کردند. به طوری‌که سبب جدایی چربی از کمپلکس پروتئینی شده و بالاتر از مایع رویی قرار گرفته و به راحتی جدا می‌گردد. محصولات آبکافتی معمولاً کم‌چرب هستند و میزان چربی در آن‌ها معمولاً در حدود ۱ درصد می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000). در مطالعه‌ی حاضر میزان چربی به زیر ۱ درصد کاهش پیدا نکرد که می‌تواند به دلیل ماهیت ماده اولیه و یا شرایط آبکافت باشد.

درجه آبکافت به شدت تحت تاثیر زمان آبکافت قرار می‌گیرد (You et al., 2009). درجه آبکافت شاخص مهمی در تعیین خواص کارکردی پروتئین‌های آبکافت شده می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000)، زیرا در نتیجه‌ی افزایش درجه آبکافت و شکست باندهای پپتیدی، طول زنجیره پپتیدی کوتاهتر و توزیع وزن مولکولی کاهش می‌یابد و مقدار آمینواسیدهای آزاد افزایش می‌یابد (Ahmadi et al., 2007; Shahi et al., 2020). افزایش زمان با افزایش درجه آبکافت و در دسترس قراردادن پپتیدهای بیشتر می‌تواند موجب افزایش میزان پروتئین محلول گردد. با طولانی شدن زمان، تعداد پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم کاهش می‌یابد و فعالیت آنزیم به دلیل نبود سوبسترای لازم کاهش پیدا کرده و در نهایت فرآیند آبکافت در یک زمان مشخص ثابت می‌گردد (Kristinsson and Rasco, 2000). همچنین ممکن است پس از گذشت مدت زمان معین، میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاهش یابد و یا ترکیباتی شکل بگیرد که فعالیت آنزیمی را مهار کند (Ovissipour et al., 2010; Javadian et al., 2015). در مطالعه حاضر با افزایش زمان آبکافت از ۳۰ تا ۱۸۰ دقیقه، درجه آبکافت (از ۳۲/۸۴ تا ۳۸/۵۶ درصد) و میزان پروتئین محلول (از ۱۴/۳۴ تا ۲۱/۹۲ درصد) افزایش یافت. این نتیجه در مطالعات مختلف در ارتباط با تولید پروتئین آبکافت شده از منابع گیاهی و حیوانی مشاهده شده است (Ovissipour et al., 2009a; Hosseini et al., 2012; Shahi et al., 2020). در آبکافت امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با سه آنزیم آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم با افزایش زمان از ۱۵ تا ۹۰ دقیقه درجه آبکافت افزایش یافت، اما از شدت و نرخ آبکافت کاسته

شد به طوری‌که بیشترین میزان آبکافت در ۶۰ دقیقه‌ی اول انجام شد (Ovissipour et al., 2010). در مطالعه‌ی Hosseini et al. (2012) در انجام آبکافت سر و امعاء و احشاء ماهی فیتوفاگ (*Hypophthalmichthys molitrix*) با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم‌های داخلی مشخص شد که درجه آبکافت و پروتئین محلول با افزایش زمان از ۲ تا ۴ ساعت افزایش یافت، اما بیشترین میزان آبکافت در ۱۲۰ دقیقه‌ی اول رخ داد.

حذف رادیکال آزاد توسط آنتی‌اکسیدان‌ها انجام می‌گیرد، بنابراین اندازه‌گیری مقدار آن می‌تواند نشان‌دهنده وضعیت آنتی-اکسیدانی یک ترکیب باشد. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار بوده و زمانی‌که از یک آنتی‌اکسیدان الکترون دریافت کند مهار خواهد شد (Shimada et al., 1992). بنابراین انتظار می‌رود در صورت عملکرد پروتئین آبکافت شده ضایعات کفال به عنوان آنتی-اکسیدان، با افزایش غلظت پروتئین آبکافت شده در تحقیق حاضر میزان قدرت مهارکنندگی DPPH افزایش و مقدار رادیکال آزاد DPPH کاهش یابد. طبق نتایج حاصله در مطالعه حاضر با افزایش غلظت پروتئین آبکافت شده، افزایش قدرت مهارکنندگی DPPH در زمان‌های مورد مطالعه مشاهده شد، اگرچه در غلظت ۰/۵ و ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱۲۰ و ۱۸۰ دقیقه تفاوت معنی-داری مشاهده نشد ($p>0/05$). قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH در مطالعه‌ی حاضر از ۴/۲۳ درصد (غلظت ۰/۵ میلی‌گرم در میلی-لیتر در زمان آبکافت ۳۰ دقیقه) تا ۸۷/۷۷ درصد (غلظت ۲ در زمان آبکافت ۱۸۰ دقیقه) متغیر بود. همچنین، با افزایش زمان تا ۱۲۰ دقیقه مقدار میلی‌گرم پروتئین آبکافت شده کمتری برای رسیدن به ۵۰ درصد مهار رادیکال آزاد مورد نیاز بود، در حالی که پس از این زمان روند ثابت مشاهده شد و کمترین IC_{50} در مطالعه حاضر ۱/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آمد. در تحقیق Bougatef et al. (2009) IC_{50} پروتئین آبکافت ماهیچه کوسه برای حذف رادیکال آزاد DPPH مقدار ۰/۶ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد. مقدار IC_{50} برای پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی هوور مسقطی (*Katsuwonus pelamis*) ۰/۲۹۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Esmaeili Kharyeki et al., 2020)، برای پروتئین آبکافتی باله ماهی سالمون ۱/۶۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (Ahn et al., 2014) ، امعاء و احشاء ماهی کاتلا (*Catla catla*) ۳/۴۷ میلی-گرم بر میلی‌لیتر (Hathwar et al., 2011)، ماهی ساردین ۰/۹۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (García-Moreno et al., 2014) گزارش شده است. قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد پروتئین آبکافتی ماهی تن (*Thunnus obesus*) در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۵۷/۸۰ درصد تعیین شده است (Yang et al., 2011). درحالیکه در تحقیق حاضر در بین غلظت‌های مورد مطالعه (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) بیشترین میزان در غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و در زمان ۱۸۰ دقیقه اتفاق افتاد و ۸۷/۷۷ درصد بود. Yang et al. (2009) گزارش کردند با افزایش غلظت ژلاتین آبکافت‌شده پوست ماهی تیلاپیا، قدرت مهار رادیکال DPPHافزایش می‌یابد و بیش‌ترین درصد (۸۰/۳) مهارکنندگی رادیکال آزاد در غلظت ۲۶ تا ۲۸ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بیان شد. Pires et al. (2013) نیز به طور مشابه نشان دادند که بین درصد مهار رادیکال آزاد و غلظت پروتئین آبکافتی ماهی کاد ارتباط مستقیم وجود دارد. Bakhshan et al. (2014) گزارش کردند که مدت زمان آبکافت ممکن است در افزایش شکست گروه‌هایی که باعث تسهیل واکنش میان پپتیدها و رادیکال‌های آزاد، گونه-های واکنش‌پذیر اکسیژن و یون‌های فلزی قابل تغییر که منجر به افزایش فعالیت آنتی‌اکسیدانی می‌شوند تاثیر مستقیم داشته باشد، اما لزوماً افزایش آبکافت به معنای ظرفیت بالای آنتی‌اکسیدانی نمی‌باشد. علاوه بر این، تغییر در اندازه، مقدار و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد. پپتیدهای با اندازه کوتاه‌تر تاثیر گسترده‌تری بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و با درجه آبکافت بیشتر این امر حاصل می-گردد، ولی در نهایت، توالی پپتیدها، ترکیب و درصد آبگریز بودن آن‌ها خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای جداشده را مشخص می-کند (Ren et al., 2008).

یون آهن گونه‌ی کلیدی فعال مسئول تشکیل اکسیدان‌ها در سلول‌ها می‌باشد که منجر به افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها می‌شود (Huang et al., 2002). گروه‌های کربوکسیل و آمین پپتیدها در پروتئین‌های آبکافتی با کلاته‌کردن یون فلزی از جمله یون آهن از اکسیداسیون لیپید جلوگیری کرده و از تشکیل اکسیدان‌ها ممانعت بعمل می‌آورند (Saiga et al., 2003). قدرت کاهندگی یک ترکیب می‌تواند شاخص قابل توجهی به منظور نشان‌دادن پتانسیل ضداکسیدانی آن ترکیب باشد. قدرت کاهندگی آهن III توانایی اهدای الکترون توسط پروتئین آبکافت-شده به عنوان یک آنتی‌اکسیدان به منظور پایداری رادیکال‌های آزاد را نشان می‌دهد (Kumar et al., 2011). بنابراین قدرت آنتی‌اکسیدانی پپتیدهای پروتئین آبکافتی از طریق تبدیل آهن III به آهن II قابل بررسی است (Khiari, 2010). در تحقیق حاضر افزایش غلظت پروتئین آبکافتی منجر به افزایش معنی‌دار در قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در همه زمان‌ها شد و همچنین با افزایش مدت زمان آبکافت نیز قدرت کاهندگی افزایش یافت. افزایش غلظت و مدت زمان آبکافت در تحقیق حاضر به دلیل تاثیر بر میزان آبکافت، واکنش بیشتر پپتیدها با رادیکال‌های آزاد و گونه-های واکنش‌پذیر اکسیژن را به همراه داشت و در کلاته کردن یون فلزی عملکرد بهتری را ایجاد نمود، به طوری که از ۰/۰۵۳ در غلظت ۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان آبکافت ۳۰ دقیقه تا ۰/۳۵۰ در غلظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در زمان آبکافت ۱۸۰ دقیقه متغیر بود. قدرت کاهندگی آهن پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) در غلظت ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۰/۱۷۶ (Esmaeili Kharyeki et al., 2020) و پروتئین

آبکافتی حاصل از ماهی کاد (*Gadus morhua*) در غلظت یک میلی‌گرم بر میلی‌لیتر ۰/۱۴۱ (Farvin et al., 2014) گزارش شده است. 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 بوده است و قدرت کاهنگی آهن با افزایش غلظت افزایش یافت (Yang *et al*., 2011). توانایی کاهندگی یون آهن پروتئین آبکافتی سر ماهی هوور مسقطی (*K. pelamis*) (Esmaeili Kharyeki et al., 2020) ، پروتئین سپر ماهی (*Raja clavata*) (Lassoued et al., 2015) و ماهی کاد (*G. morhua*) (Farvin et al., 2014) نیز با افزایش غلظت، افزایش نشان داد. در تحقیق Bakhshan et al. (2014) با افزایش زمان و میزان آبکافت خواص آنتی‌اکسیدانی کاهش یافت. دلیل این امر بدین گونه بیان شد که ویژگی‌های پپتیدهای حاصل از آبکافت به دلیل شرایط آبکافت و نوع آنزیم به کار رفته متغیر است. همچنین فعالیت ضداکسیدانی پروتئین آبکافت‌شده وابسته به چندین عامل از جمله نوع آنزیم، درجه آبکافت، حلالیت پروتئین‌ها، پپتیدها و حضور اسید آمینه‌های آزاد است (Galla et al., 2012). بنابراین، ممکن است فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی در تحقیقات مختلف مشاهده گردد. Nahvi et al. (2017) به طور مشابه با تحقیق حاضر نشان دادند با افزایش میزان غلظت پروتئین آبکافتی قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی در شرایط یکسان آبکافت افزایش یافت. همچنین دلیل این امر را به اهدای الکترون توسط پروتئین آبکافتی به رادیکال آزاد نسبت دادند و بیان کردند این عمل از انجام این واکنش یعنی تبدیل آهن سه ظرفیتی به دو ظرفیتی ممانعت به عمل می‌آورد (Khantaphant and Benjakul, 2008; Dey and Dora, 2014).

آزمون قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS به منظور تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنتی‌اکسیدان‌های دهنده هیدروژن (مهار رادیکال‌های فاز آبی) و شکستن زنجیره آنتی‌اکسیدان‌ها (مهار رادیکال‌های پروکسیل چربی) انجام می‌گیرد (Leong and Shui, 2002). در مطالعه حاضر قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS در نمونه پروتئین آبکافتی با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از ۳۷/۶۴ در زمان آبکافت ۳۰ دقیقه به ۵۶/۴۶ درصد در زمان آبکافت ۱۸۰ دقیقه رسید. در مطالعه حاضر افزایش قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS می‌تواند به دلیل افزایش حلالیت پروتئین آبکافت با افزایش درجه آبکافت باشد، زیرا با افزایش دسترسی و در معرض قرار گرفتن گروه‌های آبدوست کربوکسیلی و آمینی پروتئین‌ها با مولکول‌های آب، میزان پیوندهای بیشتری بین پپتیدها و آب تشکیل می‌شود و در نهایت حلالیت پروتئین نیز افزایش پیدا می‌کند. پروتئین آبکافتی با ترکیب‌شدن با رادیکال‌های آزاد و تبدیل آن‌ها به محصولات بی‌خطر و همچنین با شکستن برخی واکنش‌ها، از سلول‌ها در مقابل اکسیداسیون محافظت می‌کند (Ovissipour et al., 2012). در مطالعه Foh et al. (2010) مقدار ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پروتئین آبکافت فریز درایر شده گوشت چرخ شده ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) ۰/۲۵ ± ۹۷/۲۱ درصد مهارکنندگی ABTS از خود نشان داد. قدرت مهار رادیکال ABTS در پروتئین آبکافتی حاصل از ماهی آنچوی (*Clupeonella engrauliformis*) با آنزیم‌های مختلف (آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم، پرومود، پاپایین و بروملاین) به ترتیب ۶۱۴، ۹۷۶، ۹۱۴، ۶۸۴، ۹۲۰، ۸۵۸ و ۸۴۰ (µmol TE/g protein) گزارش شد (Ovissipour et al., 2013).

مطالعه حاضر نشان داد که پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات کفال ماهیان دریای خزر توانایی مناسبی در مهار رادیکال آزاد، ABTS و همچنین قدرت کاهندگی آهن سه ظرفیتی داشته است. همچنین با افزایش زمان آبکافت درجه آبکافت افزایش پیدا کرده و با افزایش درجه آبکافت تا زمان ۱۲۰ دقیقه توان آنتی‌اکسیدانی پپتیدها بیشتر شده است. در مجموع با توجه به نتایج می‌توان گفت ضایعات کفال ماهیان دریای خزر دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی مطلوبی بوده و می‌تواند در فراورده‌های غذایی به منظور افزایش ماندگاری جهت جلوگیری از فساد اکسیداسیونی مورد استفاده قرار گیرد.

Refrences:

Agyei, D. and Danquah, M.K., 2012. Rethinking food-derived bioactive peptides for antimicrobial and immunomodulatory activities. *Trends in Food Science & Technology*, *23*(2), pp.62-69. DOI: 10.1016/j.tifs.2011.08.010

Ahmadi, F., Kadivar, M. and Shahedi, M., 2007. Antioxidant activity of Kelussia odoratissima Mozaff. in model and food systems. *Food chemistry*, *105*(1), pp.57-64. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.03.056

Ahn, C.B., Je, J.Y. and Cho, Y.S., 2012. Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, *49*(1), pp.92-98. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.08.002

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

Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G., 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochemistry*, *40*(5), pp.1957-1966.DOI: 10.1016/j.procbio.2004.07.011

Bakhshan AV., Alizadeh Doughikollaee E. and 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)

Bamshad, M., Askari Hesni, M., Teimory, A. and Madjdzadeh, S.M., 2016. Morphology of the sagittal otolith in *Liza aurata* (Risso, 1810) from coastal habitats of Caspian Sea southern basin. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*, *4*(1), pp.33-48. (In Persian). DOI:

Behruz, M., Norouzi, M., AmirJanati, A. and Samie, M.H., 2016. Genetic structure of golden mullet (*Liza aurata*) in Gomishan and Anzali wetlands using microsatellite molecular technique. (In Persian) DOI:

Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2009. Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food chemistry*, *114*(4), pp.1198-1205. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.10.075

Chalamaiah, M., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T., 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: a review. *Food chemistry*, *135*(4), pp.3020-3038. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100

Dey, S.S. and 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 and technology*, *51*, pp.449-457. DOI: 10.1007/s13197-011-0512-z

Esmaeili Kharyeki M., Rezaei M., Khodabandeh S. and 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. DOI:

Esmaeili Kharyeki, M., Rezaei, M., Khodabandeh, S. and Motamedzadegan, A., 2018. Antioxidant activity of protein hydrolysate in skipjack tuna head. *Fisheries Science and Technology*, *7*(1), pp.57-64. (in Persian). DOI:

FAO. (2020). *The State of World Fisheries and Aquaculture 2020: Sustainability in Action*.DOI: 10.4060/ca9229en

Farvin, K.S., Andersen, L.L., Nielsen, H.H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I. and 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*, pp.326-334. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.03.075

Foh, M.B.K., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T. and 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), pp.1851-1869. DOI: 0.3390/ijms11041851

Gajanan, P.G., Elavarasan, K. and 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*, pp.24901-24911. DOI: 10.1007/s11356-016-7618-9

Galla, N.R., Pamidighantam, P.R., Akula, S. and Karakala, B., 2012. Functional properties and in vitro antioxidant activity of roe protein hydrolysates of *Channa striatus* and *Labeo rohita*. *Food Chemistry*, *135*(3), pp.1479-1484. DOI: 10.1016/j.foodchem.2012.05.098

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*, pp.469-476. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.03.061

Hathwar, S.C., Bijinu, B., Rai, A.K. and 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*, pp.115-124. DOI: 10.1007/s12010-010-9119-5

Hosseini, S., Ghoroghi, A., Jamalzadeh, H.R. and Safari, R., 2012. Comparison of produced fish protein hydrolysete from viscera and head of Silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) using Alcalase enzyme and internal tissue enzymes. *ISFJ*, *21*(3), pp.55-62. (In Persian). DOI: 10.22092/ISFJ.2017.110071

Hoyle, N.T., 1994. Quality of fish protein hydrolyzates from herring. *J. Food Sci.*, *59*, p.129. DOI:

Huang, X., Dai, J., Fournier, J., Ali, A.M., Zhang, Q. and Frenkel, K., 2002. Ferrous ion autoxidation and its chelation in iron-loaded human liver HepG2 cells. *Free Radical Biology and Medicine*, *32*(1), pp.84-92. DOI: 10.1016/S0891-5849(01)00770-5

Jafari Taraji, R., Alishahi, A., Ojagh, S.M. and Esmaeili Molla, A., 2015. Protein hydrolysates from viscera of cultured Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) and its

use for bacterial (*Salmonella typhi*) culture medium. *Fisheries Science and Technology*, *4*(3), pp.47-59. (In Persian). DOI:

Javadian, S.R., Roshan, A., Oveisipour, M.R., Keshavarz, M. and Nemati, M., 2015. Optimization of production of conventional Kilka hydrolyzed protein (*Clupeonella cultiventris*) using promody enzyme. Journal of Marine Biology, *26*, pp. 90-82 (In Persian).

Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z. and Liao, D., 2014. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*, *154*, pp.158-163. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.12.074

Khantaphant, S. and Benjakul, S., 2008. Comparative study on the proteases from fish pyloric caeca and the use for production of gelatin hydrolysate with antioxidative activity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, *151*(4), pp.410-419. DOI: 10.1016/j.cbpb.2008.08.011

Khantaphant, S., Benjakul, S. and Kishimura, H., 2011. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from the muscle of brownstripe red snapper prepared using pyloric caeca and commercial proteases. *Process Biochemistry*, *46*(1), pp.318-327. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.09.005

Khiari, Z., 2010. Functional and bioactive components from mackerel (*Scomber scombrus*) and blue whiting (*Micromesistius poutassou*) processing waste. DOI: 10.21427/D7FK50

Khushairay ESI., Ayub MK and Babji AS. 2014. Effect of enzymatic hydrolysis of pancreatin and alcalase enzyme on some properties of edible bird's nest hydrolysate. AIP Conference Proceedings. *1614*(1): 427-432

Kim, J. and Kim, S.K., 2013. Bioactive peptides from marine sources as potential anti-inflammatory therapeutics. *Current Protein and Peptide Science*, *14*(3), pp.177-182. DOI:

Kristinsson, H.G. and Rasco, B.A., 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, *40*(1), pp.43-81. DOI: 10.1080/10408690091189266

Kumar, N.S., Nazeer, R.A. and Jaiganesh, R., 2011. Purification and biochemical characterization of antioxidant peptide from horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) viscera protein. *Peptides*, *32*(7), pp.1496-1501. DOI: 10.1016/j.peptides.2011.05.020.

Lassoued, I., Mora, L., Nasri, R., Aydi, M., Toldrá, F., Aristoy, M.C., Barkia, A. and Nasri, M., 2015. Characterization, antioxidative and ACE inhibitory properties of hydrolysates obtained from thornback ray (*Raja clavata*) muscle. *Journal of proteomics*, *128*, pp.458-468. DOI: 10.1016/j.jprot.2015.05.007

Leong, L.P. and Shui, G., 2002. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. *Food chemistry*, *76*(1), pp.69-75. DOI: 10.1016/S0308-8146(01)00251-5

Li, Y., Zhang, S., Zhijie, B., Sun, N. and Lin, S., 2022. Exploring the activation mechanism of alcalase activity with pulsed electric field treatment: Effects on enzyme activity, spatial conformation, molecular dynamics simulation and molecular docking parameters. *Innovative Food Science and Emerging Tchnology*, *76*, 102918. DOI: 10.1016/j.ifset.2022.102918

Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A.L. and Randall, R., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biological chemistry*, *193*(1), pp.265-275. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6

Meshginfar N., Sadeghi Mahoonak AR., Ziaiifar AM., Ghorbani M. and Kashaninejad M. 2014. Optimization of the production of protein hydrolysates from meat industry by products by response surface methodology. *Journal of Food Research (University of Tabriz). 24*(2): 215-225. DOI:

Mishra K., Ojha H. and Chaudhury NK. 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

Movahednia, E., Moradi, M., Motamedzadegan, A. and Bahri, A., 2016. optimization of enzymatic hydrolysis of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) by using method RSM. *Journal of Marine Science and Technology*. DOI: 10.22113/jmst.2016.38961

Nahvi, Z., Hosseini, S.F. and Zandi, M., 2017. Production of hydrolyzed protein from Kilka by enzymatic hydrolysis and evaluation of its bioactive properties. *Journal of Aquatic Physiology and Biotechnology*, *5*(3), pp.39-58. (In Persian). DOI: 10.22124/japb.2017.2565

Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N. and Berdutina, A.V., 2000. Properties and uses of protein hydrolysates. *Applied Biochemistry and Microbiology*, *36*, pp.452-459. DOI: 10.1007/BF02731888

Ovissipour, M., Abedian, A., 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 Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food chemistry*, *115*(1), pp.238-242. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.12.013

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*(2), p.87. DOI:

Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Modanlow, M., Gholami, S. and Nemati, M., 2013. 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), pp.1718-1726. DOI: 10.1002/jsfa.5957

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, *5*, pp.460-465. DOI: 10.1007/s11947-009-0284-x

Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. and Molla, A.E., 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. *International Aquatic Research*, *1*(1), p.31. DOI:

Ovissipour, M.R., Kenari, A.A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M., 2010. The study on the properties of the Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) visceral protein hydrolysates using commercial enzymes. *Iranian Food Science & Technology Research Journal*, *6*(1), pp.68-76. (In Persian) DOI:

Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *The Japanese journal of nutrition and dietetics*, *44*(6), pp.307-315. DOI: 10.5264/eiyogakuzashi.44.307

Pasupuleti, V.K., Holmes, C. and Demain, A.L., 2010. *Applications of protein hydrolysates in biotechnology* (pp. 1-9). Springer Netherlands. DOI: 10.1007/978-1-4020-6674-0_1

Pires, C., Clemente, T. and Batista, I., 2013. Functional and antioxidative properties of protein hydrolysates from Cape hake by-products prepared by three different methodologies. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*(4), pp.771-780. DOI: 10.1002/jsfa.5796

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*(2), pp.727-736. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.11.010

Reyhani Poul, S., Jafapour, S.A. and 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), pp.162-176. DOI: 10.22067/ifstrj.v1395i0.53714

Roshan, S.A., Ovissipour, M., Keshavarz, M. and 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), pp.83-90. (In Persian). DOI:

Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J.M., Gildberg, A. and Rasco, B., 2012. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, *5*, pp.73-79. DOI: 10.1007/s11947-009-0225-8

Saiga, A.I., Tanabe, S. and Nishimura, T., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. Journal of agricultural and food chemistry, 51(12), pp.3661-3667. DOI: 10.1021/jf021156g

Sarmadi, B.H. and Ismail, A., 2010. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides*, *31*(10), pp.1949-1956. DOI: 10.1016/j.peptides.2010.06.020

Shahi, Z., Sayyed-Alangi, S.Z. and Najafian, L., 2020. Effects of enzyme type and process time on hydrolysis degree, electrophoresis bands and antioxidant properties of hydrolyzed proteins derived from defatted Bunium persicum Bioss. press cake. *Heliyon*, *6*(2). DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e03365

Shahidi, F. and Zhong, Y., 2015. Measurement of antioxidant activity. *Journal of functional foods*, *18*, pp.757-781. DOI: 10.1016/j.jff.2015.01.047

Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. and Nakamura, T., 1992. Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. Journal of agricultural and food chemistry, 40(6), pp.945-948. DOI: 10.1021/jf00018a005

Statistical Year Book of the Fisheries organization of Iran. 2018-2022. Deputy Director of Planning and Planning Management. pp, 33. (in Persian)

Thiansilakul, Y., Benjakul, S. and Shahidi, F., 2007. Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). Food chemistry, 103(4), pp.1385-1394. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.10.055

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), pp.1152-1157. DOI; 10.1016/j.procbio.2009.06.013

Yang, P., Ke, H., Hong, P., Zeng, S. and Cao, W., 2011. Antioxidant activity of bigeye tuna (*Thunnus obesus*) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *International Journal of Food Science & Technology*, *46*(12), pp.2460-2466. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02768.x

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 & emerging technologies*, *10*(2), pp.235-240. DOI: 10.1016/j.ifset.2008.08.007.

Journal of Marine Science and Technology

Winter 2023, Vol. 22, No.4, pp. 44-56.

Available Online: *http://jmst.kmsu.ac.ir*

Original Article

Investigation of antioxidant properties of protein hydrolysate derived from Caspian Sea Mullet by-products

Seyed Mahmoud Rabiei, Sakineh Yeganeh*, Mina Esmaeili Kharyeki

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

***Corresponding author Email:** s.yeganeh@sanru.ac.ir

Received: 21 February 2021 **Revise Date:** 29 May 2021 **Accepted:** 1 June 2021

DOI: 10.22113/JMST.2021.274219.2421

Abstract

In the present study, the antioxidant properties of protein hydrolysate produced from Caspian mullet by-products at different hydrolysis times were investigated. For this purpose, 20 pieces of Mullet fish with average weight of 300±50 g were prepared, and their by-products including head, fins and viscera were used for hydrolysis by alcalase enzyme 2.4 L (concentration 1.5%, temperature 55 ° C and pH 8) at different hydrolysis times including 30, 60, 120 and 180 minutes. Results showed that protein and ash content of protein hydrolysate powder were significantly increased and fat content significantly decreased compared to the raw samples ($p < 0.05$). The soluble protein and the degree of hydrolysis of Mullet by-products increased with increasing the hydrolysis time up to 120 min ($p > 0.05$). Free radical scavenging (DPPH) assay showed that increased with increasing the protein concentration up to 120 min. ($p < 0.05$). The lowest IC_{50} value of DPPH scavenging activity was obtained at 120 and 180 min (1.04±0.06 and 1.01±0.01 mg/ml, respectively) ($p < 0.05$). With increasing protein concentration and time of hydrolysis, the reduction ferric ion power increased significantly at all times and protein concentrations ($p < 0.05$). Moreover, ABTS increased with increasing hydrolysis time up to 120 min ($p < 0.05$). In general, due to the proper performance of the Mullet by-products protein hydrolysate on DPPH and ABTS free radicals scavenging and the ferric ion reduction, it can be stated that, this product can be used as an antioxidant compound.

Keywords: Caspian Sea, Mullet, protein hydrolysate, antioxidant properties, DPPH scavenging activity, reduction ferric ion power

Copyrights:
Copyright for this article is retained by the author(s), with publication rights granted Journal of Marine Science and Technology. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons. org/licenses/ by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.