اثرات استفاده از پروتئین آبکافتی تهیه شده از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) در جیره‌ی غذایی بر برخی فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان

شقایق جواهردوست[۱]، سکینه یگانه*[۱]، عبدالصمد کرامت امیرکلایی[۱]

*skyeganeh@gmail.com

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

تاریخ دریافت: مهر ۱۳۹۷ تاریخ پذیرش: دی ۱۳۹۷

چکیده

هدف از این تحقیق تهیه پروتئین آبکافتی (هیدرولیزی) از اندرونه (امعاء و احشاء) قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، تعیین وزن مولکولی پپتیدهای حاصله و استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره غذایی بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان برای بررسی تاثیر آن بر برخی از فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی ماهی بود. برای این منظور آبکافت اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان به‌وسیله آنزیم آلکالاز انجام شد. فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) پروتئین آبکافتی حاصله از اندرونه قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱/۶± ۸۵ درصد به دست آمد. پروتئین آبکافتی با مقادیر مختلف صفر (شاهد)، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد جیره برای مرحله‌ی دوم آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. ۲۵۲ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن متوسط ۰/۲۲ ± ۹/۷۴ گرم به‌صورت تصادفی در ۴ تیمار (سه تکرار) به مدت ۶۰ روز با جیره‌های مورد نظر روزی ۳ بار تا حد سیری تغذیه شدند. وزن مولکولی پپتیدهای حاصله از آبکافت در دامنه ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون متغیر بود و در پایان آزمایش فاکتورهای خونی (تعداد گلبول قرمز، هموگلوبین، هماتوکریت، تعداد گلبول سفید، MCV، MCH و MCHC)، فاکتورهای بیوشیمیایی سرم خون (پروتئین کل، آلبومین، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسرید) و ایمنی (فعالیت لیزوزیم) ارزیابی شدند. افزایش مکمل پروتئین آبکافتی تا سطح ۲ درصد باعث و هموگلوبین شد (P<۰/۰۵). مقدار گلبول قرمز و گلبول سفید تفاوت معنی‌داری بین تیمارها نشان نداد (P>۰/۰۵). کمترین مقدار هماتوکریت در تیمار ۱ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین مقدار آلبومین و کلسترول در تیمار ۲ درصد مشاهده شد (P<۰/۰۵). بیشترین میزان تری‌گلیسرید و کمترین میزان گلوکز در تیمار شاهد به دست آمد (P<۰/۰۵). فعالیت لیزوزیم در تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان داد، به‌طوری‌که با افزایش میزان پروتئین آبکافت‌شده تا سطح ۲ درصد مقدار افزایش یافت و کم‌ترین فعالیت لیزوزیم نیز در تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵). با توجه به نتایج به نظر می‌رسد استفاده از پروتئین آبکافت شده تا میزان ۲ درصد در جیره ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌تواند بر برخی فاکتورهای خونی و سرمی بیان‌شده موثر بوده و ایمنی ماهی را بهبود بخشد.

لغات کلیدی: پروتئین آبکافتی، قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*)، ایمنی، سلامت

*نویسنده مسئول

مقدمه

غذاهایی که به طور موثر سبب حفظ سلامتی و بهبود فعالیت های حیاتی شده یا کاهش خطر بیماری را موجب می‌شوند، اغلب دارای ترکیبات زیست فعال هستند (Diplock *et al*., 1999). ترکیبات زیست فعال با منشاء دریایی مانند پروتئین آبکافتی، روغن ماهی، کیتوزان، فوکوئیدان و ... حاصل از ماهیان کم‌مصرف، صید ضمنی، ضایعات ماهیان، سخت‌پوستان و جلبک‌های دریایی می‌باشند (Alamed *et al*., 2006). تولیدات کل آبزیان شامل ماهیان، سخت‌پوستان، نرم‌تنان و گیاهان آبزی روند رو به رشدی داشته و در سال ۲۰۱۶ به ۱۷۰/۹ میلیون تن رسیده است، اگرچه صید کاهش یافته است، اما آبزی‌پروری با میزان ۸۰ میلیون تن در سال ۲۰۱۶، نسبت به سال قبل حدود ۵/۲ درصد افزایش داشته است (FAO, 2018). بدیهی است که این مقدار تولید، دارای حجم بالایی از ضایعات شامل فلس، پوست، امعاء و احشاء و استخوان‌ها و ستون فقرات خواهد بود (Benjakul and Morrissey, 1997). یکی از تکنیک‌های زیستی جهت استفاده از ضایعات و گونه‌های کم مصرف و دور ریز ماهیان غنی از پروتئین و مدیریت ضایعات، آبکافت آنزیمی پروتئین‌های ماهی است که موجب تولید پروتئین آبکافتی با فعالیت زیستی می‌گردد (اصغرنیا و همکاران، ۱۳۹۶). پروتئین آبکافتی ماهی، حاصل از تجزیه آنزیمی و تبدیل پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر است. فعالیت زیستی این پروتئین‌های آبکافتی شامل فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خواص آنتی‌میکروبی، کاهش کلسترول و ضد فشار خون بالا می‌باشد (Samaranayaka and Li-Chan, 2008; Khaled *et al*., 2012; Chalamaiah *et al*., 2012; Xiao and Zhong, 2017). این مواد به دلیل داشتن پپتیدهای زیست‌فعال و کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، قابلیت هضم بالایی دارند و می‌توانند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان استفاده شوند (Ovissipour *et al*., 2012a). همچنین مطالعات نشان‌داده است پپتیدهای حاصل از پروتئین آبکافت‌شده می‌تواند محرک فعالیت ایمنی و محرک ماکروفاژی باشد (Gildberg *et al*., 1996; Bui *et al*., 2014). آنزیم‌های مختلفی با منشا گیاهی، جانوری و میکروبی برای آبکافت مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ovissipour *et al*., 2012a, b) که از این میان آنزیم آلکالاز به‌دلیل عملکرد در pH قلیایی، تولید پروتئین آبکافتی با درجه آبکافت بالاتر و طول زنجیره پپتیدی کوتاه‌تر بیشترین توجه را بخود اختصاص داده است (Aspmo *et al*., 2005). خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده به توالی پپتیدها، وزن مولکولی پپتیدها، خواص شیمیایی و توانایی انتقال الکترون اسیدهای آمینه در توالی وابسته می‌باشد (Qian *et al*., 2008)،

افزایش تولید جهانی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) طی سال‌های ۲۰۱۶-۲۰۰۸، از ۶۷۳۷۴۱ به ۸۱۴۰۹۱ تن (FAO, 2018) و همچنین تولید این ماهی در ایران طی سال‌های ۹۵-۱۳۹۱، از ۱۳۱۰۰۰ به ۱۶۵۷۸۷ تن (معاونت برنامه‌ریزی منابع، ۱۳۹۶)، نشانگر اهمیت این ماهی در تغذیه جهانی و داخل کشور می‌باشد. به دلیل روی‌آوردن به پرورش متراکم و افزایش مواجهه با انواع بیماری‌ها و استرس‌های محیطی، افزایش مقاومت ماهیان با استفاده از محرک‌ها و افزودنی‌های غذایی مورد توجه قرار گرفته است (شیخ‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). از میان محرک‌های طبیعی و مصنوعی، محرک‌های طبیعی با توجه به خصوصیات سلامتی‌بخش آنها دارای اهمیت است (Citarasu, 2010). غالب محرک‌های طبیعی مورد استفاده در مطالعات مختلف، با منشا گیاهی می‌باشد (Zheng *et al*., 2009) که به دلیل دارا بودن خواص آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی (Velioglu *et al*., 1998; Lin *et al*., 2010)، اثرات مفیدی را بر رشد، فاکتورهای خونی، سرمی و ایمنی ماهی در مقابل بیماری‌ها و استرس‌های محیطی ایجاد کرده‌اند (مهدوی و همکاران، ۱۳۹۵؛ Zheng *et al*, 2009; Yeganeh *et al*., 2017). مطالعاتی در ارتباط با تهیه پروتئین آبکافتی و خصوصیات عملکردی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (ریحانی‌پول و همکاران، ۱۳۹۵ الف و ب) و ضایعات سایر ماهیان (اویسی‌پور و همکاران، ۱۳۸۹؛ ریحانی‌پول و جعفرپور، ۱۳۹۶؛ Benjakul and Morrissey, 1997; Jun *et al*., 2004; Aspmo *et al*., 2005; Ovissipour *et al*., 2009, 2012a,b; Chalamaiah *et al*., 2012; Taheri *et al*., 2013; Elavarasan *et al*., 2014;) و استفاده از پروتئین آبکافتی در جیره ماهیان (Duarte *et al*., 2006; Hermannsdottir *et al*., 2009; Bui *et al*., 2014; Khosravi *et al*., 2015) انجام شده است، اما تاکنون مطالعه‌ای با هدف بررسی تاثیر استفاده از پروتئین آبکافتی حاصل از اندرونه قزل‌آلای رنگین‌کمان به عنوان یک افزودنی در جیره غذایی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان صورت نگرفته است. لذا، در این مطالعه پروتئین آبکافتی از امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان تهیه و وزن مولکولی آن تعیین شد و به دلیل امکان دارا بودن خصوصیات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌میکروبی پروتئین آبکافتی با توجه به مطالعات گذشته، از آن به عنوان افزودنی در تغذیه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان استفاده گردید و اثرات آن بر فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی سرم و فعالیت لیزوزیم مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه پروتئین آبکافتی، تعیین وزن مولکولی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا اندرونه (همه اندام‌های داخلی) ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انجمادزدایی و با بافر فسفات با نسبت (2:1v/w) مخلوط و با همزن به‌مدت ۲ دقیقه هموژن شدند و جهت غیرفعال‌کردن آنزیم‌های درونی در حمام آب گرم در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه قرار داده شد. غلظت آنزیم آلکالاز ۱/۵ درصد، دما ۵۵ درجه و pH ۸/۵ در نظر گرفته شد. برای انجام آبکافت به مدت ۳ ساعت انکوبه شدند. در نهایت به‌منظور غیر فعال‌سازی آنزیم آلکالاز، نمونه‌ها در حمام آبی به‌مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس نمونه‌ها به منظور جداسازی مواد غیرمحلول از پروتئین‌های محلول، توسط سانتریفوژ یخچال‌دار سانتریفیوژ شدند (۲۰ دقیقه با دور g۸۰۰۰). قسمت سوپرناتانت به وسیله سمپلر جدا شد و در فریزر ۱۸- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت (Ovissipour *et al.*, 2009). سوپرناتانت جهت تعیین خصوصیات پروتئین آبکافت شده، لیوفیلیزه (انجماد خشک) گردید.

برای تعیین وزن مولکولی پروتئین آبکافتی لیوفیلیزه شده، ابتدا از نمونه پروتئینی، محلول ۱ درصد در آب مقطر دیونیزه تهیه شد و سپس به دستگاه GPC یا کروماتوگرافی ژل تراوایی (Gel Permeation Chromatography) (Agilent 1100 series) با حلال و فاز متحرک آب دیونیزه دارای ستون PL Aquagel-OH Mixed-H و آشکارساز Refractive (RID) index detector تزریق شد. دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد و سرعت شویش ۱ میلی‌لیتر در دقیقه بود و کالیبراسیون دستگاه با استفاده از نمونه‌های استاندارد پلی‌اتیلن گلیکول انجام شد (Jun *et al.*, 2004).

خاصیت آنتی‌اکسیدانی با تعیین قدرت مهار رادیکال DPPH (DPPH[1] free radical-scavenging activity) پروتئین آبکافتی، بر طبق روش Morales و Jimenez-Perez (۲۰۰۱) اندازه‌گیری گردید. ۲۰۰ میکرولیتر از این نمونه با یک میلی‌لیتر از محلول DPPH (این محلول به صورت روزانه با غلظت ۷۴ میلی‌گرم بر لیتر اتانول تهیه گردید) مخلوط گردید. این مخلوط برای یکساعت هم زده شد. نمونه در g ۱۰۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شد و جذب سوپرناتانت در ۵۲۰ نانومتر قرائت شد قدرت مهار رادیکال DPPH (DPPH radical scavenging activity) به صورت درصد ناپدیدی DPPH بیان شد:

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (1-([DPPH]_i/[DPPH]_{H2O}) \times 100)$$

که $[DPPH]_{H2O}$ = غلظت DPPH در حضور آب به جای پروتئین آبکافتی می‌باشد. مهار رادیکال به صورت AC_{50} بیان می‌شود که با درصدی از پپتیدها (۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) می‌باشد که قادر به مهار ۵۰ درصد از رادیکال DPPH می‌باشند.

شرایط پرورش و جیره‌های آزمایشی

تعداد ۲۵۲ قطعه بچه‌ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با وزن اولیه ۰/۲۲ ± ۹/۷۴ گرم در ۱۲ تانک ۳۰۰ لیتری با حجم آبگیری ۲۵۰ لیتر در سالن پرورش توزیع شد. در طول دوره‌ی پرورش تعویض آب به صورت روزانه به میزان ۹۰ درصد صورت می‌گرفت. میانگین دما به صورت روزانه بوسیله دماسنج و سایر شاخص‌های کیفی آب از قبیل اکسیژن (اکسیژن‌متر AL15- AQUA LYTIC، ساخت کشور آلمان)، pH (pH متر AL15- AQUA LYTIC، ساخت کشور آلمان) به صورت هفته‌ای دو بار و TDS، هدایت الکتریکی و شوری (Senciun5- Hach، ساخت کشور امریکا) هر دو هفته یکبار اندازه‌گیری گردید و بترتیب۲/۷۰±۹/۲۸ درجه سانتی‌گراد، ۰/۳±۷/۳۱ میلی‌گرم بر لیتر، ۰/۲±۷/۵، ۲۳/۷±۶۳۱/۱۸ میلی‌گرم بر لیتر کربنات کلسیم، ۰/۰± ۰/۶ گرم بر لیتر و ۱۲۳±۱۰۲۱/۱۸ میکروزیمنس بر سانتی‌متر بود.

آنالیز تقریبی پروتئین آبکافتی و جیره بر اساس روش AOAC (۲۰۰۵) انجام شد. اندازه‌گیری رطوبت از طریق قراردادن نمونه در آون با دمای ۱۰۵ درجه سانتی‌گراد و توزین آن پس از خنک‌شدن در دسیکاتور انجام شد. تعیین مقدار پروتئین با روش کجلدال و چربی با روش سوکسوله و حلال اتر صورت گرفت. خاکستر نمونه‌ها از طریق سوزاندن نمونه در کوره با دمای ۵۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶ ساعت و توزین آن صورت گرفت. میزان پروتئین، چربی، خاکستر و رطوبت پروتئین آبکافتی به‌ترتیب ۰/۲۸±۷۹/۲۳، ۰/۰۵±۲/۱، ۰/۵۶±۳/۳۸ و ۰/۳۵±۱۴/۳۶ درصد به دست آمد و برای جیره شاهد مواد اولیه پودر ماهی، سویا، گلوتن گندم، آرد گندم، آرد

[1] 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl

ذرت، روغن گیاهی، مکمل ویتامینی[1]، مکمل معدنی[2] به ترتیب، ۴۰، ۱۹، ۱۰، ۱۰، ۸، ۱۰، ۱/۵ و ۱/۵ درصد استفاده شد و به دلیل تشابه میزان پروتئین در پودر ماهی و پروتئین آبکافتی، پروتئین آبکافتی در سطوح مختلف صفر، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد جایگزین پودر ماهی شد. مواد اولیه مورد نیاز برای ساخت هر یک از جیره‌های غذایی وزن شده در ظرف باهم مخلوط شدند و سپس پروتئین آبکافت‌شده به صورت مایع (با محاسبه ماده خشک آن) بر اساس ۰/۵، ۱ و ۲ درصد به آنها اضافه شد. پس از آن روغن گیاهی به مخلوط مواد اضافه شده و برای ۱۵ دقیقه کاملا با هم مخلوط شدند. سپس آب بتدریج به مخلوط مواد اضافه تا حدی که مخلوط حاصل شکل خمیری بخود گرفت. سپس مخلوط حاصل به کمک چرخ گوشت به صورت رشته‌هایی با قطر ۲ میلی‌متر درآمد. رشته‌های خارج شده از چرخ گوشت در محیط آزمایشگاه با پهن‌کردن روی روزنامه به مدت دو روز خشک شدند. در زمان خشک‌شدن رشته‌های غذا بهم زده شدند تا تمام رشته‌ها به‌طور یکنواخت خشک کردند. پس از خشک‌شدن، جیره‌های غذایی خرد شدند تا اندازه مناسب یابند. ترکیب پروتئین، چربی و خاکستر جیره شاهد بترتیب ۴۵/۶، ۱۶/۴ و ۸/۱، تیمار ۰/۵ درصد پروتئین آبکافتی بترتیب ۴۶/۸، ۱۶/۳ و ۸/۲، تیمار ۱ درصد بترتیب ۴۴/۸، ۱۶/۲ و ۸/۶ و تیمار ۲ درصد بترتیب ۴۵/۶، ۱۶/۴ و ۸/۵ بود (AOAC, 2005). جیره‌های آماده شده در بسته‌های شماره‌گذاری شده و در پلاستیک بسته‌بندی و تا زمان مصرف در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همزمان با شروع فعالیت کارگاهی، مقدار غذای مورد نیاز به صورت روزانه از فریزر خارج گردیده و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و مورد استفاده قرار گرفت. ماهیان در طول دوره ۶۰ روزه تا حد سیری، سه بار در روز تغذیه شدند.

بررسی فاکتورهای خونی، بیوشیمیایی سرم و فعالیت لیزوزیم

در انتهای آزمایش سه قطعه ماهی از هر تکرار به طور تصادفی توسط پودر گل میخک (۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر) بیهوش (فلاحتکار و همکاران، ۱۳۸۵) و خونگیری از ساقه دمی انجام شد. به منظور بررسی فاکتورهای خونی، نمونه‌های خون در لوله‌های حاوی ماده ضد انعقاد خون قرار گرفتند، تا شمارش گلبول قرمز (RBC) و شمارش گلبول سفید (WBC) بر اساس روش Hoston (۱۹۹۰)، غلظت هموگلوبین (Hb) و میزان هماتوکریت (Hct) بر اساس روش Drabkin (۱۹۴۵)، صورت گیرد. شمارش گلبول قرمز و سفید خون با استفاده از لام هماسیتومتر انجام شد. اندازه‌گیری میزان هماتوکریت خون توسط میکروهماتوکریت صورت گرفت. همچنین میانگین حجم گلبول قرمز (MCV)، میانگین هموگلوبین در گلبول قرمز (MCH) و میانگین غلظت هموگلوبین در گلبول قرمز (MCHC) بر اساس روابط ذیل محاسبه شد (Yeganeh *et al.*, 2016). بررسی فاکتورهای خونی در همان روز نمونه‌گیری انجام گرفت.

$$(MCV)=(Hct\div RBC)\times 10$$

$$(MCH)=(Hb\div RBC)\times 10;\ (MCHC)=(Hb\div Hct)\times 100$$

برای اندازه‌گیری فاکتورهای بیوشیمیایی سرم، نمونه‌های خون بدون ماده‌ی ضد انعقاد جهت جداسازی سرم سانتریفوژ (به مدت ۱۵ دقیقه و دور ۶۰۰۰ rpm) شد و شاخص‌های مختلف از قبیل پروتئین تام بر اساس روش Lowry و همکاران (۱۹۵۲)، آلبومین بر اساس روش Wotton و Freeman(۱۹۸۲)، گلوکز، کلسترول و تری‌گلیسیرید بر اساس روش Trinder (۱۹۶۹) و فعالیت لیزوزیم بر اساس روش Kumari و همکاران (۲۰۰۶) انجام شد.

تجزیه و تحلیل آماری

این آزمایش در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۴ تیمار و هر تیمار با سه تکرار انجام شد. پس از بررسی نرمال‌بودن داده‌ها از طریق آزمون shapiro wilk، تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده به روش آنالیز واریانس یک طرفه انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون آماری دانکن در سطح احتمال ۹۵ درصد استفاده شد. از نرم‌افزار SPSS۱۷ برای آنالیز آماری و از نرم‌افزار Excel برای رسم نمودارها استفاده گردید.

نتایج

وزن مولکولی پپتیدهای پروتئین آبکافتی و خاصیت آنتی‌اکسیدانی

میانگین وزن مولکولی پپتیدها (Dalton) $1/09\times10^{3}$ g mol^{-1} و میانگین وزنی وزن مولکولی $1/30\times10^{3}$ g mol^{-1} به دست آمد. احتمال ۹۰ درصد وزن مولکولی پپتیدهای حاصله $2/156\times10^{3}$ g mol^{-1} و به احتمال ۵۰ درصد وزن مولکولی پپتیدهای

[1] هر ۱۰۰ میلی‌گرم پرمیکس ویتامینی حاوی IU ۱۵۰۰ ویتامین A، IU ۳۰۰۰ ویتامین تیامین، ۵ گرم ریبوفلاوین، ۶ گرم نیاسین، ۴گرم پیریدوکسین، ۱ گرم اسیدفولیک، ۴ میلی‌گرم سیانوکوبالامین، ۳۰ گرم ویتامین C، ۳ گرم ویتامین K_3، ۹ گرم توکوفرول

[2] هر ۱۰۰ گرم پرمیکس معدنی ۳۰۰۰ میلی‌گرم آهن، ۵۰۰۰۰ میلی‌گرم روی، ۱۰ میلی‌گرم سلنیوم، ۵۰ میلی‌گرم کبالت، ۳۰۰ میلی‌گرم مس، ۲۵۰ میلی‌گرم منگنز، ۳۰۰ میلی‌گرم کولین‌کلراید

موجود در نمونه پروتئین آبکافتی $g\ mol^{-1}$ ۱/۱۴ × ۱۰^{۳} بود و وزن مولکولی از ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون متغیر بود. بیشترین نسبت وزنی برای وزن مولکولی حدود ۱ کیلودالتون و به میزان تقریبی ۲/۱۷۵ بدست آمد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) پروتئین آبکافتی حاصله از اندرونه قزل‌آلای رنگین‌کمان ۱/۶± ۸۵ درصد بود.

فاکتورهای خونی و بیوشیمیایی سرم

با توجه به داده‌های مربوط به فاکتورهای خونی که در جدول ۱ نشان داده شده است، مقدار گلبول قرمز و سفید، در تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). بیشترین میزان هموگلوبین در تیمار ۱ و ۲ درصد مشاهده شد که به طور معنی‌داری از تیمار شاهد و ۰/۵ درصد بیشتر بود (P<۰/۰۵). میزان هماتوکریت در تیمارهای شاهد، ۰/۵ و ۲ درصد تفاوت معنی‌دار نشان نداد (P>۰/۰۵)، اما در تیمار ۱ درصد به طور معنی‌داری کمتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). میزان MCV در تیمارهای شاهد و ۰/۵ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از دو تیمار ۱ و ۲ درصد بود (P<۰/۰۵). میزان MCH در تیمارهای مختلف آزمایش تفاوت معنی‌داری نشان نداد (P>۰/۰۵). میزان MCHC در تیمارهای حاوی مکمل پروتئین آبکافتی، نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان‌داد و در تیمارهای ۱ و ۲ درصد به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵). مطابق داده‌های مربوط به فاکتورهای سرمی در جدول ۲، بیشترین میزان پروتئین تام در تیمار ۱ درصد مشاهده شد که تفاوت معنی‌داری با سایر تیمارها داشت (P<۰/۰۵). اختلاف معنی داری در مقدار آلبومین سرم بین تیمار شاهد و ۰/۵ درصد نبود (P>۰/۰۵) و این دو تیمار آلبومین کمتری نسبت به تیمار ۱ و ۲ داشتند (P<۰/۰۵). تیمار ۲ به طور معنی داری بالاترین مقدار آلبومین را بین تیمارها داشت (P<۰/۰۵). میزان تری‌گلیسرید در تیمار شاهد به طور معنی‌داری بیشتر از سایر تیمارها بود (P<۰/۰۵)، کمترین میزان تری‌گلیسرید در تیمار ۱ درصد به‌دست آمد. بیشترین میزان کلسترول مربوط به تیمار ۲ درصد و کمترین آن مربوط به تیمار ۱ درصد بود. تمامی تیمارها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر داشتند (P<۰/۰۵). مقدار گلوکز در تمامی تیمارهای حاوی پروتئین آبکافت‌شده بیشتر از گروه شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵)، بیشترین مقدار گلوکز در تیمار ۰/۵ و ۱ درصد و پس از آن در تیمار ۲ درصد بدست آمد (P>۰/۰۵).

فعالیت لیزوزیم

در تمامی تیمارهای حاوی پروتئین آبکافتی فعالیت لیزوزیم نسبت به تیمار شاهد افزایش معنی‌دار نشان دادند (جدول ۳)، به‌طوری‌که با افزایش میزان پروتئین آبکافت‌شده تا سطح ۲ درصد مقدار آن افزایش یافت و کمترین فعالیت لیزوزیم در تیمار شاهد مشاهده شد (P<۰/۰۵).

جدول ۱: فاکتورهای خونی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافتی

Table 1: Hematological parameters of rainbow trout juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

تیمار / شاخص‌ها	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
RBC (× ۱۰^{۶} در میلی‌متر مکعب)	۰/۹۹±۰/۰۹۸^{a}	۰/۹۷±۰/۳۰^{a}	۱/۰۰±۰/۰۵۵^{a}	۱/۱۴±۰/۱۰۰^{a}
WBC (× ۱۰^{۳} در میلی‌متر مکعب)	۱۷/۷۶±۱/۷۹^{a}	۱۵/۲۰±۱/۲۴^{a}	۱۶/۴۰±۱/۲۰^{a}	۱۶/۶۶±۱/۶۱^{a}
Hb (گرم بر دسی‌لیتر)	۷/۴۸±۰/۳۷^{b}	۷/۵۹±۰/۳۸^{b}	۸/۲۰±۰/۱۴^{a}	۸/۵۹±۰/۲۷^{a}
HCT(درصد)	۴۶/۷۵±۳/۱۸^{a}	۴۵/۱۹±۴/۰۰^{a}	۳۷/۳۲±۱/۹۲^{b}	۴۳/۷۵±۱/۵۷^{a}
MCV (فمتولیتر)	۴۷۵/۴۱±۹/۷۸^{a}	۴۶۵/۶۶±۳/۹^{a}	۳۷۰/۸۶±۶/۳۵^{b}	۳۸۳/۹۲±۷/۰۸^{b}
MCH (پیکوگرم)	۷۷/۸۵±۸/۴^{a}	۷۶/۱۰±۲/۰۷^{a}	۸۰/۹۴±۴/۲۸^{a}	۷۶/۵۹±۱/۶۴^{a}
MCHC (گرم بر دسی‌لیتر)	۱۶/۰۱±۰/۹۲^{c}	۱۷/۱۴±۰/۹۳^{b}	۲۰/۵۳±۰/۱۲^{a}	۲۰/۳۸±۰/۲۱^{a}

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف کوچک نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در هر ردیف می‌باشد (P<۰/۰۵).

جدول ۲: فاکتورهای سرمی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافتی
Table 2: Serum biochemical parameters of rainbow trout juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

شاخص / تیمار	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
پروتئین تام (گرم بر دسی‌لیتر)	۶/۴۴±۰/۳۵^{b}	۶/۹۹±۰/۶۸^{b}	۸/۱۷±۰/۵۰^{a}	۷/۲۲±۰/۴۵^{b}
آلبومین (گرم بر دسی‌لیتر)	۱/۶۳±۰/۰۲۶^{c}	۱/۶۶±۰/۰۳۵^{c}	۱/۷۶±۰/۰۸۱^{b}	۱/۸۶±۰/۰۱۱^{a}
تری‌گلیسرید (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۲۲۷/۴۵±۱/۱۵^{a}	۲۱۵/۲۵±۱/۳۰^{b}	۱۴۷/۱۳±۲/۹۰^{d}	۲۱۰/۷۴±۱/۴۰^{c}
کلسترول (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۱۶۷/۱۲±۸/۶۱^{d}	۱۸۳/۱۷±۲/۴۴^{c}	۸۹/۱۷±۳/۱۷^{b}	۲۳۴/۱۴±۳/۴۲^{a}
گلوکز (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)	۸۸/۱۶±۰/۳۳^{c}	۱۳۳/۵۵±۰/۶۶^{a}	۱۳۶/۴۵±۴/۸۰^{a}	۱۲۳/۰۲±۲/۴۴^{b}

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵)

جدول ۳: فعالیت لیزوزیم سرم در بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان تغذیه‌شده با سطوح مختلف پروتئین آبکافتی
Table 3: Lysosyme amount in rainbow trrou juveniles fed by different levels of protein hydrolysate.

شاخص / تیمار	شاهد (صفر)	FPH (۰/۵ درصد)	FPH (۱ درصد)	FPH (۲ درصد)
فعالیت لیزوزیم	۱۶/۳۳±۱/۱۵^{c}	۲۴/۶۶±۱/۵۲^{b}	۲۷/۶۶±۲/۵۱^{b}	۴۱/۰۰±۳/۶۰^{a}

اعداد به صورت میانگین ± انحراف معیار هستند. حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده اختلاف معنی‌دار در بین تیمارها می‌باشد (P<۰/۰۵).

بحث

خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافت شده به توالی پپتیدها، وزن مولکولی پپتیدها، خواص شیمیایی و توانایی انتقال الکترون آمینواسیدها در توالی وابسته می‌باشد (Qian *et al*., 2008). بنابراین، شرایط آبکافت و نوع آنزیم مورد استفاده با تاثیر بر اندازه پپتیدها و توالی آمینواسیدها در خاصیت آنتی‌اکسیدانی موثر می‌باشد. در مطالعه حاضر، آبکافت انجام شده توسط آنزیم آلکالاز توانست پروتئین امعاء و احشاء ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان را بخوبی آبکافت کند و اوزان مختلفی از آن در دامنه ۷۰۰ دالتون تا ۲ کیلودالتون در محلول دیده شد که در نتیجه منجر به خاصیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) ۱/۶ ± ۸۵ درصد شد. در پروتئین آبکافت شده گاوماهی (*Zosterisessor ophiocephalus*) با استفاده از عصاره پروتئاز قلیایی امعاء و احشاء ماهیان مختلف، دامنه وزن مولکولی از زیر ۱۰۰، ۳۰۰-۱۰۰، ۷۰۰-۳۰۰، ۱۷۰۰-۷۰۰، ۳۰۰۰-۱۷۰۰، ۵۰۰۰-۳۰۰۰ و بیش از ۵۰۰۰ دالتون بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اندازه پپتیدها نسبت عکس یعنی با کاهش اندازه پپتیدها (کمتر از ۳۰۰ دالتون) زیاد و باافزایش اندازه پپتیدها (بیش از ۷۰۰ دالتون) کاهش یافت، ولی با درجه آبکافت نسبت مستقیم داشت. بیشترین فعالیت آنتی‌اکسیدانی ۶۴/۸ و ۵۵ درصد و بیشترین درجه آبکافت ۲۸/۴ درصد بود (Nasri *et al*., 2013).

تعیین وزن مولکولی پپتیدهای حاصله از عضله ماهی northern whiting fish (*Sillago sihama*) با استفاده از آنزیم‌های پپسین، تریپسین و آلفا کیموتریپسین با روش sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) نشان داد که وزن مولکولی بین ۳/۵-۴۵ کیلودالتون بوده است (Venkatesan and Nazeer, 2014). در این مطالعه نیز بیشترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در پروتئین آبکافت شده با بیشترین درجه آبکافت بدست آمد. در مطالعات مختلف ارتباط سینرجیستی مستقیمی بین زمان هضم پروتئین، درجه آبکافت و خاصیت آنتی اکسیدانی گزارش شد (Wu *et al*., 2003; Tanzadehpanah *et al*., 2012; Ko *et al*., 2013; Venkatesan and Nazeer, 2014). پروتئین‌های آبکافتی خاصیت آنتی‌اکسیدانی قابل ملاحظه‌ای دارند (Klompong *et al*., 2007; Elavarasan *et al*., 2014) و در بعضی مواقع با آنتی‌اکسیدان‌های سنتتیک مانند بوتیل هیدروکسی آنیزول (BHA) و بوتیل هیدروکسی تولوئن (BHT) برابری می‌کنند (Elavarasan *et al*., 2014). فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافت‌شده به نوع پروتئاز (Jun *et al*., 2004; Elavarasan *et al*., 2014) و شرایط آبکافت بستگی دارد (Jao and Ko, 2002; Jun *et al*., 2004;) و در طول آبکافت بسته به نوع آنزیم استفاده شده، دامنه وسیعی از پپتیدهای کوچک و اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک روی خواص آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های آبکافتی اثرگذارند (Wu *et al*., 2003). در مطالعه Klompong و همکاران (۲۰۰۷) خاصیت آنتی اکسیدانی پودر حاصله از آبکافت گوشت ماهی *Selaroids leptolepis* با آنزیم آلکالاز و فلاورزایم در درجه‌های مختلف آبکافت بررسی و مشخص شد که آنزیم‌های مختلف و درجه‌های

مختلف آبکافت بر خصوصیات آنتی‌اکسیدانی (chelating activity, DPPH radical-scavenging activity, reducing power,metal-chelating activity) متفاوت می‌باشد و با افزایش درجه آبکافت با آنزیم آلکالاز DPPH radical-scavenging activity و reducing power کاهش یافت، اما تفاوت معنی‌داری در پروتئین آبکافت شده توسط فلاورزایم مشاهده نشد. در درجه هیدرولیز پایین پروتئین آبکافتی حاصل از آلکالاز خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH radical-scavenging activity) بیشتر و در درجه هیدرولیز بالا پروتئین آبکافتی حاصل از فلاورزایم خاصیت آنتی اکسیدانی (DPPH radical-scavenging activity) بیشتری نشان داد.

پارامترهای خونی به‌عنوان شاخص‌های زیستی ارزشمندی هستند که نشان‌دهنده پاسخ به تنش‌های فیزیولوژیک و همچنین وضعیت سلامت عمومی می‌باشد (Rey Vázquez and Guerrero, 2007; Siwicki *et al*., 1994). مطالعات Kader و همکاران (۲۰۱۱) و Bui و همکاران (۲۰۱۴) نشان‌داد که وجود پروتئین‌های آبکافتی اثر معنی‌دار منفی بر پارامترهای خونی ماهیان نوجوان سی‌بریم قرمز (*Pagrus major*) ندارد که این نشان‌دهنده تغذیه و شرایط محیطی خوب ماهیان می‌باشد. بنابراین، احتمال می‌رود که پروتئین‌های ماهیان حاوی مقادیر زیادی از توالی‌های زیست‌فعال است که می‌تواند بر شاخص‌های ایمنی خونی موثر باشد (Duarte *et al*., 2006). پروتئین تام و گلوکز با افزودن پروتئین آبکافتی در سرم بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان افزایش یافت و افزودن پروتئین آبکافتی (غلظت ۱ درصد) میزان تری‌گلیسرید، کلسترول و سرم خون ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان در کمترین میزان خود بود که نشان‌دهنده کاهش این فاکتورها در سرم ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان می‌باشد. آبکافت آنزیمی پروتئین‌ها ممکن است منجر به تشکیل پپتیدهای زیست‌فعال شود (Korhonen and Pihlanto, 2006; Kotzamanis *et al*., 2007; Kim and Wijesekara, 2010) که دارای خواص فیزیکی و شیمیایی متعدد و فعالیت‌های زیستی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی، خواص ایمنی و ضدباکتریایی می‌باشد که بستگی به وزن مولکولی و توالی آمینواسید دارد (Venkatesan and Nazeer, 2014؛ Kim and Mendis, 2006). ارزیابی پروتئین تام، آلبومین و گلبولین به‌عنوان شاخص‌های مهم در پاسخ به استرس‌های محیطی می‌باشد، در شرایط استرس، ترکیبات اکسیداتیو به عنوان اصلی‌ترین اندام‌های سازنده آلبومین و گلیولین، در کبد و کلیه سبب آسیب شده و میزان آنها را کاهش می‌دهند (Banaee *et al*., 2011؛ Pascual *et al*., 2003). آلبومین پایین می‌تواند در نتیجه وجود مشکل در ساخت آن، از دست رفتن از طریق اوره یا مدفوع و نیز افزایش کاتابولیسم آن باشد (Nguyen, 1999). افزایش آلبومین می‌تواند به علت افزایش تولید آن در کبد بواسطه تغییر در جیره غذایی باشد (Abdel-Tawwab *et al*., 2007; Acar *et al*., 2015) که در این مطالعه نتایج بدست آمده افزایش آلبومین را نشان داد. نتایجی که در مورد کلسترول بدست آمد نیز احتمالاً به‌دلیل اثر کاهندگی کلسترول توسط پروتئین آبکافتی بود (Kotzamanis *et al*., 2007).

لیزوزیم یکی از ترکیبات عمده در سیستم دفاع ایمنی مهره‌داران و بی‌مهرگان می‌باشد (Song *et al*., 2006). لیزوزیم به عنوان یکی از عوامل ایمنی غیر اختصاصی در برابر انگل‌ها، باکتری‌ها و عفونت‌های ویروسی عمل می‌کند و میزان آن در خون ماهیان، هنگامی که علیه عفونت فعالیت می‌کنند، بالا می‌رود (Puangkaew *et al*., 2004). غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ درصد از پروتئین ماهی آبکافت‌شده در ماهی شوریده زرد بزرگ (*Pseudosciaena crocea* R.) توانست فعالیت لیزوزیم و کمپلمان‌های سرم، و غلظت ایمونوگلوبین M را افزایش دهد (Tang *et al*., 2008). همچنین در ماهی سی‌باس ژاپنی (*Lateolabrax japonicus*) نیز این افزایش فعالیت لیزوزیم و کمپلمان‌ها در سطوح میانه (۱۵ درصد) دیده شد (Liang *et al*., 2006). در مطالعات قبل، عملکردهای زیستی پروتئین‌های آبکافت‌شده را به عنوان پپتیدهای زیست‌فعال معرفی شدند (Gildberg *et al*., 1996; Harnedy and FitzGerald, 2012). سیستم ایمنی ماهیان می‌تواند با استفاده از مکمل‌های پروتئینی آبکافت‌شده تقویت شود (Kotzamanis *et al*., 2007; Zheng *et al*., 2013) و استفاده از پروتئین‌های آبکافت‌شده می‌تواند پاسخ ایمنی غیر اختصاصی را در ماهیان افزایش دهد. تغذیه ماهی هالیبوت اقیانوس اطلس (*Hippoglossus hippoglossus*) با ارگانیسم‌های غذایی زنده غنی‌شده با پپتیدها، تولید لیزوزیم و کمپلمان‌ها را تحریک می‌کند (Hermannsdottir *et al*., 2009). اثر مثبت معنی‌دار چندین نوع پروتئین آبکافت‌شده بر سیستم ایمنی ماهی سالمون و توربوت گزارش شده است (Murray *et al*., 2003; Zheng *et al*., 2012). وجود پروتئین آبکافت‌شده در جیره غذایی بچه‌ماهیان قزل‌آلای رنگین‌کمان سبب افزایش فعالیت لیزوزیم شد و لذا، نتایج این مطالعه با نتایج مطالعات پیشین در فعالیت لیزوزیم همخوانی داشت. بهبود عملکرد ایمنی سلولی و خونی در مطالعات قبلی گزارش شده است (Kotzamanis *et al*., 2007; Liang *et al*., 2006; Murray *et al*., 2003). با این وجود، شواهد مستدلی برای حمایت از این چنین ادعایی وجود ندارد که اثرات تحریک ایمنی از طریق پروتئین‌های

آبکافت‌شده می‌تواند به عنوان بخش بالقوه‌ای از جیره برای ارتقاء مقاومت در برابر بیماری در ماهیان باشد (Khosravi *et al*., 2015).

نتیجه‌گیری کلی

بر اساس نتایج این مطالعه، افزودن پروتئین آبکافتی تهیه شده از اندرونه (امعاء و احشاء) ماهی می‌تواند تا میزان ۲ درصد فاکتورهای خونی هموگلوبین، هماتوکریت، MCV و MCHC و بر شاخص‌های سرمی پروتئین تام، آلبومین، تری‌گلیسرید، کلسترول و گلوکز موثر بوده و ایمنی لیزوزیم را در ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان بهبود بخشد.

منابع

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

اویسی‌پور، م.ر.، عابدیان کناری، ع.، معتمدزادگان، ع، و نظری، ر.م. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله با استفاده از آنزیم‌های تجاری (*Thunnus albacares*). *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، ۶ (۱): ۶۸-۷۶.

ریحانی‌پول، س. و جعفرپور، س.ع. ۱۳۹۶. اثر درجه آبکافت بر خواص عملکردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از فریم و سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *علوم و صنایع غذایی*، ۶۸ (۱۴): ۱۱۳-۱۲۴.

ریحانی‌پول، س.، جعفرپور، س.ع. و صفری، ر. و ۱۳۹۵ الف. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز. *نشریه پژوهش‌های علوم صنایع غذایی ایران*، ۱۴: ۱۶۲-۱۷۶.

ریحانی‌پول، س.، جعفرپور، س.ع. و صفری، ر.، ۱۳۹۵ ب. خواص کارکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش آنزیمی. *مجله علوم و فنون شیلات*، ۵(۴): ۱۳-۲۸.

شیخ‌زاده، ن.، سلطانی، م.، ابراهیم‌زاده موسوی، ح.، خسروی، ع.، باقری، ه.، فتحی، ع. و زرگر، ا. ۱۳۸۸. مطالعه اثر اسانس اوکالیپتوس (*Eucalyptus globules*) بر برخی فاکتورهای ایمنی ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *مجله تحقیقات دامپزشکی*، ۶۴(۱): ۴۷-۵۴.

فلاحتکار، ب.، سلطانی، م.، ابطحی، ب.، کلباسی، م.ر.، پورکاظمی، م. و یاسمی، م. ۱۳۸۵. تاثیر ویتامین C بر برخی پارامترهای رشد، نرخ بازماندگی و شاخص کبدی در فیل ماهیان (*Huso huso*) جوان پرورشی. *پژوهش و در امور دام و آبزیان*، ۱۹ (۳): ۹۸-۱۰۳.

معاونت برنامه‌ریزی و مدیریت منابع سازمان شیلات ایران، ۱۳۹۶. سالنامه آماری سازمان شیلات ایران ۱۳۹۱-۱۳۹۵، انتشارات شیلات ایران، ۶۴ صفحه.

مهدوی، س.، یگانه، س.، فیروزبخش، ف. و جانی خلیلی، خ. ۱۳۹۵. اثرات اسانس رازیانه (*Foeniculum vulgare*) بر برخی فراسنجه‌های بیوشیمیایی سرم و مقاومت به استرس شوری در بچه‌ماهی سفید دریای خزر (*Rutilus kutum*). مجله علمی شیلات ایران، ۲۵ (۴): ۱-۱۷.

Abdel-Tawwab, M., Mousa, M.A. and Abbass, F.E. 2007. Growth performance and physiological response of African catfish, (*Clariasgariepinus*) (B.) fed organic selenium prior to the exposure to environmental copper toxicity. *Aquaculture*, 272 (1): 335–345. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2007.09.004

Acar, Ü., Kesbiç, O.S., Yılmaz, S., Gültepe, N. and Türker, A. 2015. Evaluation of the effects of essential oil extracted from sweet orange peel (*Citrus sinensis*) on growth rate of tilapia (*Oreochromismossambicus*) and possible disease resistance against *Streptococcus iniae*. *Aquaculture*, 437: 282-286. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.12.015

Alamed, J., McClements, D.J. and Decker, E.A. 2006. Influence of heat processing and calcium ions on the ability of EDTA to inhibit lipid oxidation in oil-in-water emulsions containing omega-3 fatty acids. *Journal of Food Chemistry*, 95(4): 585–590. DOI: 10.1016/j.foodchem.2005.01.041

AOAC. 2005. *Official methods of analysis of AOAC International*. AOAC International.

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

Banaee, M., Surede, A., Mirvaghefi, A.R. and Rafei, G.R. 2011. Effects of longterm siltymarin oral supplementation on the blood biochemical profile of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 37: 887-896. DOI: 10.1007/s10695-011-9486-z.

Benjakul, S. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(9): 3423-3430. DOI: 10.1021/jf970294g

Bui, H.T.D., Khosravi, S., Fournier, V., Herault, M. and Lee, K.J. 2014. Growth performance, feed utilization, innate immunity, digestibility and disease resistance of juvenile red seabream (*Pagrus major*) fed diets supplemented with protein hydrolysates. *Aquaculture*, 418: 11-16. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2013.09.046

Chalamaiah, M., Dinesh Kumar, B., Hemalatha, R. and Jyothirmayi, T. 2012. Fish protein hydrolysates: proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review. *Journal of Food Chemistry*, 135(4): 3020-3038. Doi: 10.1016/j.foodchem.2012.06.100.

Citarasu, T. 2010. Herbal biomedicines: a new opportunity for aquaculture industry. *Aquaculture International*, 18(3): 403-414.

Diplock, A.T., Aggett, P.J., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E.B. and Roberfroid, M.B. 1999. Scientific concept of functional foods in Europe, *Consensus document*. *British Journal of Nutrition*, 81(1): 1–27.

Drabkin, D.L. 1945, January. Crystallographic and optical properties of human hemoglobin-a proposal for the standardization of hemoglobin. In American journal of the medical sciences (vol. 209, no. 2, pp. 268-270). 227 east washington sq, philadelphia, pa 19106: lippincott williams & wilkins.

Duarte, J., Vinderola, G., Ritz, B., Perdigón, G. and Matar, C. 2006. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation. *Immunobiology*, 211(5): 341-350. DOI:10.1016/j.imbio.2005.12.002.

Elavarasan, K., Naveen Kumar, V. and Shamasundar, B.A. 2014. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp *(Catla catla)* as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38 (3): 1207-1214. DOI: 10.1111/jfpp.12081

FAO, 2018. The state of world fisheries and aquaculture, Food and Agriculture Organization 414 of the United Nations**.** Pp. 108.

Gildberg, A., Bøgwald, J., Johansen, A. and Stenverg E. 1996. Isolation of acid peptide fractions from a fish protein hydrolysate with strong stimulatory effect on Atlantic salmon (*Salmo salar*) head kidney leucocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 114B: 97-101. DOI: 10.1016/0305-0491(96)00011-9

Harnedy, P.A. and FitzGerald, R.J. 2012. Bioactive peptides from marine processing waste and shellfish: A review. *Journal of Functional Foods*, 4: 6-24. DOI: 10.1016/j.jff.2011.09.001

Hermannsdottir, R., Johannsdottir, J., Smaradottir, H., Sigurgisladottir, S., Gudmundsdottir, B.K. and Bjornsdottir, R. 2009. Analysis of effects induced by a pollock protein hydrolysate on early development,

innate immunity and the bacterial community structure of first feeding of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) larvae. *Fish and shellfish immunology*, 27(5): 595-602. DOI: 10.1016/j.fsi.2009.05.007

Hoston, A.H. 1990. Blood and circulation. In: Shreck CB, Moyle PB. Methods in fish biology. Bethesda, Maryland: American Fisheries Society, 273-335.

Jao, C-L. and Ko, W-C. 2002. 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging by protein hydrolyzates from tuna cooking juice. *Fisheries Science*, 68(2): 430-435. DOI:10.1046/j.1444-2906.2002.00442.x.

Jun, Sh-Y., Park, P-J., Jung, W-K. and Kim, S-K., 2004. Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *European Food Research and Technology*, 219(1): 20-26. DOI:10.1007/s00217-004-0882-9.

Kader, M.A., Koshio, S., Ishikawa, M., Yokoyama, S., Bulbul, M., Honda, Y., Mamauag, R.E. and Laining, A., 2011. Growth, nutrient utilization, oxidative condition, and elemen composition of juvenile red sea bream (*Pagrus major*) fed with fermented soybean meal and scallop by-product blend as fishmeal replacement. *Fisheries Science*, 77: 119-128. DOI: 10.1007/s12562-010-0312-9

Khaled, H.B., Ghlissi, Z., Chtourou, Y., Hakim, A., Ktari, N., Fatma, M.A., Barkia, A., Sahnoun, Z. and Nasri, M., 2012. Effect of protein hydrolysates from sardinelle (*Sardinella aurita*) on the oxidative status and blood lipid profile of cholesterol-fed rats. *Food Research International*, 45(1): pp.60-68. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.10.003

Khosravi, S., Bui, H.T.D., Rahimnejad, S., Herault, M., Fournier, V, Kim, S, Jeong, J. and Lee, K.-J. 2015. Dietary supplementation of marine protein hydrolysates in fish-meal based diets for red sea bream (*Pagrus major*) and olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Aquaculture*, 435: 371–376. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.019

Kim, S.-K. and Mendis, E. 2006. Bioactive compounds from marine processing byproducts — a review. *Food Research International*, 39: 383–393. Doi: 10.1016/j.foodres.2005.10.010

Kim, S.-K. and Wijesekara, I. 2010. Development and biological activities of marine derived bioactive peptides: a review. *Journal of Functional Foods*, 2: 1–9. DOI: 10.1016/j.jff.2010.01.003

Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D. and Shahidi, F. 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally *(Selaroides leptolepis)* as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chemistry*, 102(4): 1317-1327. DOI: 10.1016/j.foodchem.2006.07.016

Ko, J-Y., Lee, J-H., Samarakoon, K., Kim, J-S. and Jeon, Y-J. 2013. Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52:113–120. DOI: 10.1016/j.fct.2012.10.058

Korhonen, H. and Pihlanto, A. 2006. Review: bioactive peptides: production and functionality. *International Dairy Journal*, 16: 945–960. DOI: 10.1016/j.idairyj.2005.10.012

Kotzamanis, Y.P., Gisbert, E., Gatesoupe, F.J., Infante, J.Z. and 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 and Physiology Part A: Molecular*

and Integrative Physiology, 147(1): 205-214. Doi: 10.1016/j.cbpa.2006.12.037

Kumari, J., Sahoo, P.K., Swain, T., Sahoo, S.K., Sahu, A.K. and Mohanty, B.R. 2006. Seasonal variation in the innate immune parameters of the Asian catfish *Clarias batrachus*. Aquaculture, 252(2-4): 121-127. DOI: 10.1016/j.aquaculture.2005.07.025

Liang, M., Wang, J., Chang, Q. and Mai, K. 2006. Effects of different levels of fish protein hydrolysate in the diet on the nonspecific immunity of Japanese sea bass, (*Lateolabrax japonicus*) (Cuvieret Valenciennes, 1828). Aquaculture Research, 37: 102-106. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2005.01392.x

Lin, C-M., Sheu, S-R., Hsu, S-C. and Tsai, Y-H. 2010. Determination of bactericidal efficacy of essential oil extracted from orange peel on the food contact surfaces. Food Control, 21: 1710-1715**. Doi:** 10.1016/j.foodcont.2010.06.008

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1952. Protein measurement with folin phenol reagent. Biological Chemistry, 193-256.

Morales, F.J. and Jimenez-Perez, S. 2001. Free radical scavenging capacity of Maillard reaction products as related to colour and fluorescence. Food Chemistry, 72 (1): 119-125. DOI: 10.1016/S0308-8146(00)00239-9

Murray, A.L., Pascho, R.J., Alcorn, S.W., Fairgrieve, W.T., Shearer, K.D. and Roley, D. 2003. Effects of various feed supplements containing fish protein hydrolysate or fish processing by-products on the innate immune functions of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquaculture, 220: 643-653. DOI: 10.1016/S0044-8486(02)00426-X

Nasri, R., Younes, I., Jridi, M., Trigui, M., Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Dhulster, P., Nasri, M. and Karra-Châabouni, M. 2013. ACE inhibitory and antioxidative activities of Goby (*Zosterissessor ophiocephalus*) fish protein hydrolysates: Effect on meat lipid oxidation. *Food Research International*, 54: 552–561. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.07.001

Nguyen, H.T. 1999. Transport proteins, In: Loeb, W.F., Quimby, F.W. (Eds.), The Clinical Chemistry of Laboratory Animals, SecondEdition. Taylor and Francis, Philadelphia, PA, USA, pp. 309–335.

Ovissipour, M., Safari R., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Pourgholam, R., Mohagheghi, E. and Mola. A.E. 2009. Use of hydrolysates from yellowfin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-product as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research, 1: 73-77.

Ovissipour, M., Kenari A.A., Motamedzadegan, A. and Nazari, R.M. 2012a. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioprocess Technology, 5: 696-705. DOI: 10.1080/10498850.2010.548910

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

Pascual, P., Pedrajeas, J.R., Toribio, F., Ló pezBerea, J. and Peinado, J. 2003. Effect of food deprivation on oxidative stress biomarkers in fish (*Sparus aurata*). Chemico-Biological Interactions, 145: 191-199. DOI: 10.1016/S0009-2797(03)00002-4

Puangkaew, J., Kiron, V., Somamoto, T., Okamoto, N., Satoh, S., Takeuchi, T. and Watanabe, T. 2004. Nonspecific immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*W) in relation to different status of vitamin E and highly unsaturated fatty acids.

Fish and Shellfish Immunlogy, 16 (1): 25-39. DOI:10.1016/S1050-4648(03)00028-7.

Qian, Z.J., Jung, Q.K. and Kim, S.K. 2008. Free radical scavenging activity of a novel antioxidative peptide purified from hydrolysate of bullfrog skin, *Rana catesbeiana* Shaw. Bioresource Technology, 99: 1690–1698. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.04.005

Rey Vázquez, G. and Guerrero, G.A. 2007. Characterization of blood cells and hematological parameters in *Cichlasoma dimerus* (Teleostei, Perciformes). Tissue and Cell, 39: 151-160. Doi: 10.1016/j.tice.2007.02.004

Samaranayaka, A.G. and Li-Chan, E.C. 2008. Autolysis-assisted production of fish protein hydrolysates with antioxidant properties from Pacifichake (*Merluccius productus*). Journal of Food chemistry, 107(2): 768-776. DOI: 10.1016/j.foodchem.2007.08.076

Siwicki, A.K., Anderson, D.P. and Rumsey, G.L. 1994. Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. Veterinary Immunology and Immunopathology, 41: 125-139. DOI: 10.1016/0165-2427(94)90062-0

Song, Z., Wu, T., Cai, L., Zhang, L. and Zheng, X., 2006. Effects of dietary supplementation with Clostridium butyricum on the growth performance and humoral immune response in *Miichthys miiuy*. Journal of Zhejiang University Science, B, 7(7): 596-602. DOI:10.1631/jzus.2006.B0596.

Taheri, A., Anvar, S.A.A., Ahari H. and Fogliano, V. 2013. Comparison the functional properties of protein Hydrolysates from poultry byproducts and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. Iranian Journal of Fisheries Sciences, 12(1) 154-169.

Tang, H.G., Wu, T.X., Zhao, Z.Y. and Pan, X.D. 2008. Effects of fish protein hydrolysate on growth performance and humoral immune response in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea* R.). Journal of Zhejiang University Science, B, 9(9): 684-690. DOI: 10.1631/jzus.B0820088.

Tanzadehpanah, H., Asoodeh, A. and Chamani, J. 2012. An antioxidant peptide derived from Ostrich (*Struthio camelus*) egg white protein hydrolysates. Food Research International, 49: 105–111. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.08.022

Trinder, P. 1969. Determination of glucose concentration in the blood. Ann. Clin. Biochem, 6, p.24.

Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L. and Oomah, B.D. 1998. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 46(10): 4113-4117. DOI: 10.1021/jf9801973

Venkatesan, K. and Nazeer, R.A. 2014. Antioxidant activity of purified protein hydrolysates from northern whiting fish (*Sillago sihama*) muscle. International Journal of Peptide Research and Therapeutics, 20: 209–219. DOI: 10.1007/s10989-013-9384-6

Wotton, I.D. and Freeman, H. 1982. Microanalysis in Medical Biochemistry. Churchill, New York, USA

Wu, H.C., Chen, H.M. and Shiau, C.Y. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949–957. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00104-2

Xiao, J. and Zhong, Q. 2017. Suppression of retrogradation of gelatinized rice starch by anti-listerial grasscarp protein hydrolysate. Food Hydrocolloids, 72: 338-345. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2017.06.016

Yeganeh, S., Adel, M., Ahmadvand, Sh., Ahmadvand, Sh. and Velisek, J., 2016.

Toxicity of organic selenium (Selemax) and its effects on haematological and biochemical parameters and histopathological changes of common carp (*Cyprinus carpio* L., 1758). Toxin Reviews, 207-213. DOI:10.1080/15569543.2016.1213749.

Yeganeh, S., Sotoudeh, A. and Movaffagh, A.N. 2017. Effects of *Tribulus terrestris* extract on growth and reproductive performance of male convict cichlid (*Cichlasoma nigrofasciatum*). *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 17: 1003–1007. DOI: 10.4194/1303-2712-v17_5_15

Zheng, Z.L., Tan, J.Y. W., Liu, H.Y., Zhou, X.H., Xiang, X. and Wang, K.Y. 2009. Evaluation of oregano essential oil (*Origanum heracleoticum* L.) on growth, antioxidant .effect and resistance against *Aeromonas hydrophila*in channel catfish *(Ictalurus punctuatus*). Aquaculture, 229: 214–218. DOI:10.1016/j.aquaculture.2009.04.025

Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J. and Chang, Q. 2012. Effect of dietary fish protein hydrolysate on growth, feed utilization and IGF-I level of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture Nutrition, 18: 297-303. DOI: 10.1111/j.1365-2095.2011.00896.x

Zheng, K., Liang, M., Yao, H., Wang, J. and Chang, Q. 2013. Effect of size-fractionated fish protein hydrolysate on growth and feed utilization of turbot (*Scophthalmusmaximus* L.). Aquaculture Research, 44: 895–902. DOI: 10.1111/j.1365-2109.2012.03094.x

Effects of dietary rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) viscera protein hydrolysate on some hematological and blood serum biochemical parameters of rainbow trout juvenile

Javaherdoust Sh.[1]; Yeganeh S.[1*]; Keramat Amirkolaie A.[1]

*skyeganeh@gmail.com

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

Abstract

The aim of this study was to prepare rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) visceral protein hydrolysate (VPH), determine the peptide molecular weight and using rainbow trout visceral protein hydrolysate in diet of rainbow trout juvenile to investigate its effects on some hematological and blood serum biochemical parameters. The viscera of rainbow trout were hydrolyzed by alcalase enzyme and Antioxidant activity of protein hydrolysate was obtained 85±1.6 %. The protein hydrolysate was used for the second phase of the experiment. For this purpose, four diets were prepared including VPH free as the control and three diets with 0.5, 1, and 2 percent VPH inclusions. Juvenile rainbow trout (n = 252; 9.74 ± 0.22 g) were randomly distributed in the treatments (with three replicates) and fed with the prepared diets based on satiation, 3 times a day for 60 days. Peptide polecular weight ranged from 700 D to 2 KD. Final evaluated parameters were hematological (RBC, hemoglobin, hematocrit, WBC, MCV, MCH and MCHC), serum biochemical (total protein, albumin, glucose, cholesterol and triglyseride) indices and lysosyme. Increasing the VPH up to 2 % caused to increase hemoglobin ($P<0.05$). RBC and WBC showed no significant differences among treatments ($P>0.05$). The lowest hematocrit was observed in 1 % treatment ($P<0.05$). The highest amounts of albumin and cholesterol were observed in 2 % treatment and the highest amount triglyseride and the lowest amount of glucose were observed in control group ($P<0.05$). All VPH-containing treatments had higher amount Lysosyme activity than control as such with inceasing VPH up to 2 % coused to increase the lysosyme activity and the lowest amount of that was observed in control ($P<0.05$). The results indicate that a diet containing 2 % of VPH cause to affect on some mentioned haemetological and serum biochemical parameters and could improve immunity in in juvenile rainbow trout.

Keywords: Protein hydrolysat, Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), Immunity, Health

*Corresponding author