



تولید پروتئین هیدرولیز شده از سر فیل ماهی (*Huso huso*): اثر اولتراسوند و مایکروویو بر خصوصیات آنتی اکسیدانی

سیده محدثه حسینی^۱، مینا اسمعیلی خاریکی^{*}، سکینه یگانه^۱

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

اطلاعات مقاله	چکیده
تاریخ های مقاله :	این مطالعه با هدف ارزیابی تاثیر پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر فیل ماهی (<i>Huso huso</i>) انجام شد. سر ماهی پس از پیش تیمار با اولتراسوند (فرکانس ۲۰ کیلوهرتز و شدت ۷۵ وات) و مایکروویو (فرکانس ۲۴۵۰ هرتز و دمای ۹۰ درجه سانتی گراد) در دو زمان ۵ و ۱۰ دقیقه، با آنزیم آلكالاز با غلظت ۲ درصد، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد و pH ۸ هیدرولیز شد و تاثیر پیش تیمارهای مختلف بر درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که تحت تیمار با اولتراسوند و مایکروویو، درجه هیدرولیز به صورت معناداری افزایش پیدا کرد ($p < 0/05$) و کمترین مقدار درجه هیدرولیز $0/25 \pm 34/48$ درصد و بیشترین مقدار آن $0/18 \pm 50/42$ درصد بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای حمام آبی و مایکروویو ۱۰ دقیقه می باشد. بیشترین و کمترین اثر آنتی اکسیدانی (توانایی مهار رادیکال های DPPH و ABTS و قدرت احیاکنندگی یون آهن) پروتئین هیدرولیز شده به ترتیب مربوط به تیمار اولتراسوند ۵ دقیقه و حمام آبی بود. مقادیر IC_{50} این تیمار در مهار رادیکال های DPPH و ABTS به ترتیب $0/01 \pm 2/97$ میلی گرم بر میلی لیتر و $0/03 \pm 3/95$ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد که به طور معنی داری کمتر از سایر تیمارها بوده است ($p < 0/05$). همچنین در همه نمونه ها با افزایش غلظت، فعالیت آنتی اکسیدانی به صورت معنی داری افزایش پیدا کرد ($p < 0/05$). در مجموع می توان بیان نمود که پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو اثر مطلوبی بر خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده سر فیل ماهی داشته و تیمارهای مختلف می توانند منجر به تولید محصولاتی با خصوصیات متفاوت گردند.
تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۸/۱۳	
تاریخ داوری: ۱۴۰۴/۰۹/۱۸	
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۲۳	
کلمات کلیدی:	
اولتراسوند، مایکروویو، پروتئین هیدرولیز شده، درجه هیدرولیز، فعالیت آنتی-اکسیدانی، فیل ماهی	
DOI: 10.48311/fsct.2026.117483.82920	
* مسئول مکاتبات:	
Mina.smaily@gmail.com	

۱-مقدمه

آبزیان، منابع غنی از پروتئین با کیفیت بالا و اسیدهای چرب ضروری (مانند امگا-۳) محسوب شده و سهم مهمی در تأمین نیازهای تغذیه‌ای بشر دارند. اخیراً، تقاضا برای مصرف محصولات دریایی افزایش چشمگیری یافته که نشان‌دهنده رشد قابل توجه صنعت آبی‌پروری و بخش غذاهای دریایی در سطح جهانی است [۱ و ۲]. افزایش تولید آبزیان منجر به افزایش تولید محصولات جنبی حاصل از فرآوری شده است ولی این ضایعات به ندرت برای مصرف انسانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. پس از فرآوری ماهیان مقادیر بسیار زیادی باقی مانده‌های خام حاصل از فرآوری شامل ستون فقرات، استخوان‌های تنه، سر، پوست، باله، فلس و اندرونه به جا می‌ماند که گاهی تا حدود ۷۵٪ از وزن کل ماهی را شامل می‌شود. این محصولات جنبی منبع عالی از پروتئین‌ها، لیپیدها، مواد معدنی، پلی‌ساکاریدها و کاروتنوئیدها هستند. با این حال، می‌توان ارزش محصولات جانبی ماهی را با استفاده از فرآورده‌های ملایم و سازگار با محیط‌زیست برای تولید محصولات با کیفیت بالا افزایش داد [۳-۵]. ارزیابی ترکیبات شیمیایی ضایعات گونه‌های مختلف ماهی نشان داده است که بیش از ۵۰٪ وزن خشک آن‌ها را پروتئین تشکیل می‌دهد. سر ماهی یکی از عمده‌ترین این ضایعات است و دارای حدود ۶۴٪ پروتئین می‌باشد [۶]. پروتئین‌های ماهی منبعی از پروتئین‌های غذایی با کیفیت بالا هستند که برای دریافت تغذیه‌ای انسان‌ها اهمیت زیادی دارند [۷]. بنابراین می‌توان از روش‌های مختلف فرآوری برای استفاده از این ترکیبات ارزشمند استفاده نمود تا حداکثر بهره‌برداری و بازیافت صورت گیرد. در حال حاضر روش‌های زیادی برای استخراج پروتئین ماهی وجود دارد [۸]. اگرچه هیدرولیز آنزیمی یک روش متداول برای تولید پپتیدهای زیست‌فعال

است، اما همچنان با محدودیت‌هایی از قبیل بازده پایین و زمان فرآوری طولانی مواجه است [۹ و ۱۰].

علاوه بر نوع آنزیم، شرایط واکنش هیدرولیز نیز بر فعالیت زیستی پروتئین هیدرولیز شده و نوع پپتیدهای آزاد شده تأثیرگذار است. تحقیقات نشان داده‌اند که پیش‌ تیمار پروتئین‌ها قبل از هیدرولیز آنزیمی می‌تواند به بهبود آزادسازی پپتیدهای زیست‌فعال از انواع مختلف پروتئین‌ها کمک کند. این روش‌ها شامل فن‌آوری‌های فشار هیدرواستاتیک بالا (HP^1)، اولتراسوند (US^2)، مایکروویو (MV^3) و میدان الکتریکی پالسی (PEF^4) می‌باشند [۱۱-۱۳]. اولتراسوند، به عنوان امواج مکانیکی با فرکانس بالا، به عنوان یک تکنیک کمکی برای بهبود کارایی هیدرولیز آنزیمی پروتئین و تولید پپتیدهای زیست‌فعال به کار گرفته شده‌است. در مقایسه با هیدرولیز آنزیمی مرسوم، هیدرولیز آنزیمی با کمک اولتراسوند به طور چشمگیری درجه هیدرولیز و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولیزات را بهبود بخشیده است [۱۴ و ۱۵]. استفاده از اولتراسوند در هیدرولیز آنزیمی از طریق ایجاد اثرات مکانیکی، کاویتاسیون و حرارتی، سرعت واکنش آنزیمی را افزایش داده و تبدیل پروتئین‌ها به پپتیدهای هدف را تسریع می‌کند. بنابراین، استفاده از هیدرولیز آنزیمی با کمک اولتراسوند در حد متوسط، به منظور شکستن ساختار پروتئین و افزایش فعالیت آنزیم در مراحل اولیه، و به دنبال آن استفاده از هیدرولیز آنزیمی مرسوم برای ادامه فرآیند، می‌تواند روشی کارآمدتر و کم‌مصرف‌تر برای تهیه پپتیدهای زیست‌فعال باشد [۱۶]. همچنین مطالعات مختلف نشان داده‌اند که پیش‌ تیمار با مایکروویو نیز می‌تواند بر فرآیند هیدرولیز اثر گذاشته و باعث کوتاه شدن زمان هیدرولیز و حفظ کیفیت آمینواسیدها گردد [۱۷]. مایکروویو نوعی تابش الکترومغناطیسی غیریونیزه است که می‌تواند از طریق امواج نفوذ کند تا به اجزای مورد نظر برسد. این یک وسیله موثر و

3-Microwave

4-Pulsed Electric Field

1-High Pressure

2-Ultrasound

[۲۲]. با در نظر گرفتن این موضوع که سر فیل ماهی^۵ یکی از ضایعات حاصل از فرآوری است که درصد بالایی از وزن اولیه آن را شامل می‌شود، این مطالعه به بررسی هیدرولیز آنزیمی آن با استفاده از آنزیم آلکالاز پرداخته است و تأثیر پیش‌تیمارهای التراسوند و مایکروویو بر میزان هیدرولیز و خاصیت زیست‌فعال (فعالیت آنتی‌اکسیدانی) پروتئین هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تهیه ماده اولیه

تعداد پنج عدد سر فیل ماهی از مرکز پرورش ماهیان خاویاری قره‌برون واقع در منطقه چپکرد استان مازندران تهیه شدند و به صورت منجمد و در جعبه‌های یونولیتی حاوی یخ در کوتاه‌ترین زمان به آزمایشگاه فرآوری دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری انتقال یافتند. سپس سرهای ماهی پس از شستشو و آبکشی با آب خنک، در حالت منجمد با استفاده از چرخ گوشت نیمه‌صنعتی چرخ شده و در بسته‌های پلی‌اتیلنی بسته‌بندی و تا زمان شروع آزمایشات در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

۲-۲- تولید پروتئین هیدرولیز شده

- نمونه بدون پیش‌تیمار:

به منظور آماده‌سازی نمونه‌ها، ابتدا ۵۰ گرم نمونه چرخ شده سر فیل ماهی در دمای $0/2 \pm 4$ درجه سانتی‌گراد انجماد- زدایی شده و با آب مقطر با نسبت ۱:۲ (W/V) مخلوط و با هموژنایزر (IKA T25-Digital Ultra-Turrax) به مدت ۲ دقیقه هموژن شد. سپس ظروف حاوی نمونه به منظور غیرفعال کردن آنزیم‌های داخلی، به مدت ۱۵ دقیقه در حمام آبی (Memmert wub 29, Germany) با دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. غلظت آنزیم آلکالاز ۲ درصد،

جدید برای تامین انرژی یک سیستم شیمیایی، تسهیل و تقویت استخراج پروتئین گیاهی، حیوانی و دریایی است. این بدان معناست که انرژی مایکروویو را می‌توان برای استخراج سریع و کارآمد ترکیبات مورد نظر بدون آسیب رساندن به آن‌ها استفاده کرد که باعث بازده و خلوص بالاتر می‌شود [۱۸، ۱۹ و ۲۰].

پروتئین‌های هیدرولیز شده بسته به ساختار، اندازه و توالی اسیدهای آمینه فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی متفاوتی دارند و منبع پروتئین و شرایط هیدرولیز بر این ویژگی‌ها تأثیر می‌گذارد [۲۱]. پروتئین هیدرولیز شده مخلوطی از فرکشن‌های مختلف پپتیدی با محدوده متنوعی از وزن‌های مولکولی و خواص زیست‌فعال می‌باشد [۲۲]. پپتیدها را می‌توان از قسمت‌های مختلف ماهی استخراج کرد و کاربردهای متفاوتی دارند [۲۱]. پپتیدهای زیست‌فعال ویژگی‌های کارکردی متفاوتی همانند عملکرد ضد میکروبی، تقویت سیستم ایمنی، مهارکنندگی آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتنسین I، بازدارندگی رنین، عملکرد ضد انعقاد، خواص ضد سرطان، ضد تومور، ضد دیابت و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی، نشان می‌دهند [۲۲-۳۵].

درجه هیدرولیز، یکی از پارامترهای حیاتی در بررسی ویژگی‌های پروتئین‌های هیدرولیز شده است که نشان‌دهنده میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی است و باید به دقت کنترل شود. زیرا بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، میزان اسیدهای آمینه آزاد، حلالیت و وزن مولکولی پپتیدهای تولید شده، به شدت و درجه هیدرولیز وابسته هستند [۳۶]. پروتئین‌های هیدرولیز شده و پپتیدهای مشتق از منابع دریایی گوناگون، از جمله ماهی‌ها، نرم‌تنان، سخت‌پوستان و ضایعات فرآوری آبزیان، پتانسیل آنتی‌اکسیدانی قابل توجهی دارند و می‌توانند در غذاهای فرا-سودمند، صنایع دارویی و غذا-داروها کاربرد داشته باشند

برای پیش تیمار با التراسوند نیز نمونه‌های هموژن شده پیش از افزودن آنزیم، با فرکانس ۲۰ کیلوهرتز، شدت ۷۰ وات و به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه تحت تیمار با التراسوند قرار گرفتند [۳۹ و ۴۰]. بقیه مراحل هیدرولیز به روش ذکر شده برای تیمار کنترل صورت گرفت.

بدین ترتیب در مجموع ۵ تیمار در نظر گرفته شد:

تیمار کنترل: نمونه آماده شده به روش متداول بدون پیش-تیمار

تیمار ۱: نمونه تیمار شده با مایکروویو به مدت ۵ دقیقه

تیمار ۲: نمونه تیمار شده با مایکروویو به مدت ۱۰ دقیقه

تیمار ۳: نمونه تیمار شده با التراسوند به مدت ۵ دقیقه

تیمار ۴: نمونه تیمار شده با التراسوند به مدت ۱۰ دقیقه

۳-۲- سنجش پروتئین محلول

مقدار پروتئین محلول به روش لوری [۴۱] و با استفاده از آلبومین سرم گاوی (۱-۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد سنجش شد. خواندن جذب نمونه‌ها با استفاده از اسپکتروفتومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy)، در طول موج ۷۵۰ نانومتر صورت گرفت. منحنی استاندارد سنجش پروتئین نیز با استفاده از آلبومین سرم گاوی (۱-۰/۱ میلی‌گرم/میلی‌لیتر) به عنوان پروتئین استاندارد رسم شد (شکل ۱).

دما ۵۵ درجه سانتی‌گراد و pH ۸ در نظر گرفته شد [۳۷]. پس از افزودن آنزیم آلکالاز، ظروف حاوی نمونه در انکوباتور شیکردار قرار گرفته و مدت زمان هیدرولیز نیز ۱۲۰ دقیقه در نظر گرفته شد. در نهایت برای قطع واکنش آنزیمی ظروف حاوی نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آبی ۹۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا دمای اتاق، به مدت ۳۰ دقیقه و با دور ۶۰۰۰g با استفاده از سانتریفیوژ یخچال‌دار (Sigma, 3-30KS, United States)، سانتریفیوژ شدند. قسمت سوپرناتانت به وسیله سمپلر جدا شده و در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. بخشی از نمونه پروتئین هیدرولیز شده، با دستگاه خشک کن انجمادی (Vaco 2 Zirbus, Germany) خشک شده و برای آنالیزهای مربوطه در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

- پیش تیمار با مایکروویو:

نمونه‌ها پس از طی مراحل آماده‌سازی ذکر شده برای نمونه کنترل، پیش از افزودن آنزیم آلکالاز تحت تیمار با مایکروویو قرار گرفتند. بدین منظور نمونه‌های هموژن شده در ظروف درب‌دار مخصوص مایکروویو، در دمای ۹۰ درجه سانتی-گراد و فرکانس ۲۴۵۰ هرتز، به مدت ۵ و ۱۰ دقیقه تحت تیمار با مایکروویو قرار داده شدند [۳۸]. بقیه مراحل هیدرولیز به روش ذکر شده در بالا انجام شد.

- پیش تیمار با اولتراسوند:

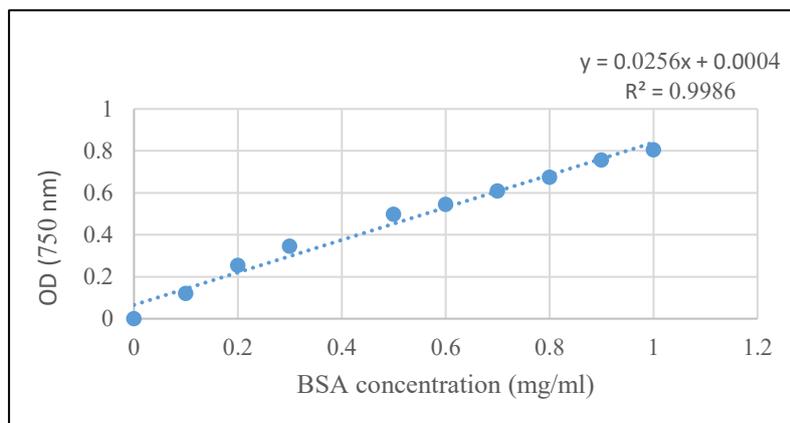


Figure 1- Standard curve of protein assay using bovine serum albumin (BSA)

۴-۲- تعیین درجه هیدرولیز (DH)

درجه هیدرولیز بر اساس روش Hoyle و Merritt (۱۹۹۴) سنجش شد. بدین منظور ۵۰۰ میکرولیتر از پروتئین آبکافت شده با ۵۰۰ میکرولیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰٪ مخلوط شده و سپس با دور ۸۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. مقدار پروتئین در فاز محلول به روش لوری تعیین و درجه هیدرولیز با معادله زیر محاسبه شد [۴۲]:

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

میزان نیتروژن در نمونه

۵-۲- سنجش فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده

۱-۲-۵- قدرت مهار رادیکال آزاد ۲ و ۲ دیفنیل -۱

پیکریل هیدرازیل (DPPH)

برای انجام این آزمایش حجم برابری از محلول نمونه در غلظت‌های مختلف با محلول ۰/۱ میلی مولار DPPH در متانول مخلوط شد. سپس مخلوط حاصل به خوبی تکان داده شده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۲ درجه سانتی گراد در تاریکی قرار داده شد و در نهایت عدد جذب مخلوط به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) در طول موج ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. درصد مهار رادیکال طبق رابطه زیر محاسبه گردید [۴۳]:

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

جذب شاهد AS: جذب نمونه

As = جذب نمونه خوانده شده - جذب رنگ نمونه (۱ میلی لیتر نمونه + ۱ میلی لیتر متانول)

۲-۲-۵- سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS

برای سنجش فعالیت مهارکنندگی رادیکال ABTS از روش Alemán و همکاران (۲۰۱۱) استفاده شد. محلول ۷ میلی مولار ABTS در پتاسیم پرسولفات ۲/۴۵ میلی مولار

تهیه و به مدت ۱۶ ساعت در دمای محیط و در جای تاریک نگه‌داری شد، پس از طی زمان مورد نظر، رقیق‌سازی با آب مقطر تا رسیدن به میزان جذب 0.7 ± 0.2 در طول موج ۷۳۴ نانومتر انجام گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر نمونه با ۹۸۰ میکرولیتر محلول رقیق‌سازی شده ABTS مخلوط و به مدت ۱۰ دقیقه در مکان تاریک و دمای ۳۰ درجه سانتی گراد انکوبه شد. پس از طی زمان مورد نظر جذب نمونه‌ها در ۷۳۴ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) خوانده شد. درصد مهارکنندگی رادیکال ABTS با رابطه زیر محاسبه گردید [۴۴]:

$$100 \times \frac{\text{جذب نمونه شاهد} / \text{جذب نمونه} - \text{جذب نمونه شاهد}}{\text{درصد مهارکنندگی}}$$

۳-۲-۵- قدرت کاهندگی یون آهن سه ظرفیتی (یون فریک)

بر اساس روش Oyaizu (۱۹۸۶) ۰/۵ میلی لیتر پروتئین آبکافتی با غلظت‌های مختلف با ۲/۵ میلی لیتر بافر فسفات ۰/۲ مولار (با pH=۶/۶) و ۲/۵ میلی لیتر محلول پتاسیم فری-سیناید ۱ درصد مخلوط شد. سپس ترکیب بدست آمده ۲۰ دقیقه در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد انکوبه و متعاقب آن ۲/۵ میلی لیتر محلول تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به آن اضافه گردید. سپس این محلول ۱۰ دقیقه با گردش ۳۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد. ۲/۵ میلی لیتر از فاز رویی برداشته شده و با ۲/۵ میلی لیتر آب مقطر و ۲/۵ میلی لیتر محلول فریک کلرید ۰/۱ درصد ترکیب شد. جذب محلول حاصل در طول موج ۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر (Spectrophotometr UV-M51 UV/Vis, Italy) قرائت شد. عدد جذب بیشتر نشان‌دهنده قدرت کاهندگی بالاتر می‌باشد [۴۵].

۶-۲- تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم‌افزار SPSS 17 انجام گرفت. این تحقیق در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. پس از

اولتراسوند ۵ دقیقه (USH5)، اولتراسوند ۱۰ دقیقه (USH10) و حمام آبی (HTH) بر غلظت پروتئین محلول پروتئین هیدرولیز شده سر فیل ماهی در جدول ۱ نشان داده شده است. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای HTH, USH10, USH5, MWH10 تفاوت معناداری وجود داشت ($p < 0.05$). ولی بین تیمار MWH5 با تیمار-های USH5 و HTH اختلاف معناداری مشاهده نشد. بیش‌ترین مقدار غلظت پروتئین $1/21 \pm 49/37$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و کم‌ترین مقدار آن $1/27 \pm 40/48$ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای USH10 و HTH می‌باشد.

بررسی نرمال بودن داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیروویلیک، برای مقایسه تأثیر تیمارهای مختلف بر درجه هیدرولیز و عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده، از آنالیز واریانس یک طرفه استفاده شد و برای بررسی تفاوت معنی-دار بین میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح ۵ درصد استفاده گردید. تمام آزمایشات با سه تکرار انجام شد و برای رسم نمودارها نیز از نرم افزار Excel استفاده گردید.

۳- نتایج

۳-۱- پروتئین محلول

نتایج حاصل از بررسی تأثیر پیش‌تیمارهای میکروویو ۵ دقیقه (MWH5)، میکروویو ۱۰ دقیقه (MWH10)،

Table 1- Soluble protein concentration of the protein hydrolysate obtained from Beluga head

Pretreatment	Protein concentration (mg/ml)
HTH	40.48 ± 1.27^d
USH5	43.32 ± 1.25^c
USH10	49.37 ± 0.21^a
MWH5	42.25 ± 1.08^{cd}
MWH10	47.37 ± 1.03^b

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment

فیل ماهی در جدول ۲ نشان داده شده است. بررسی آماری داده‌ها نشان داد که بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی‌داری وجود داشت ($p < 0.05$). همان‌طور که در جدول مشاهده می‌شود کمترین مقدار درجه هیدرولیز $0/25 \pm 34/48$ درصد و بیش‌ترین مقدار آن $0/18 \pm 50/42$ درصد بود که به ترتیب مربوط به تیمارهای HTH و MWH10 می‌باشد.

۳-۲- درجه هیدرولیز

نتایج حاصل از بررسی تأثیر تیمارهای میکروویو ۱۰ دقیقه (MWH10)، میکروویو ۵ دقیقه (MWH5)، اولتراسوند ۱۰ دقیقه (USH10)، اولتراسوند ۵ دقیقه (USH5) و حمام آبی (HTH) بر درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده سر

Table 2- Degree of hydrolysis (DH) of Beluga head protein hydrolysate

Pretreatment	DH%
HTH	34.48 ± 0.25^e
USH5	38.55 ± 0.38^d

USH10	43.51 ± 0.20^b
MWH5	41.78 ± 0.13^c
MWH10	50.42 ± 0.18^c

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

شده بیشترین و کمترین مقدار قدرت مهارکنندگی رادیکال آزاد DPPH به ترتیب مربوط به تیمارهای USH5 و HTH می‌باشد. هم‌چنین مقایسه مقادیر IC_{50} تیمارها (جدول ۴) نشان داد که بین تیمارها اختلاف معنی‌داری وجود داشت و مقدار IC_{50} تیمار USH5 ($2/97 \pm 0/01$) میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) به طور معنی‌داری کم‌تر از سایر تیمارها بود ($p < 0/05$) که نشان‌دهنده بالاترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در این تیمار است. بیشترین مقدار IC_{50} و کمترین توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH نیز مربوط به تیمار HTH می‌باشد. همان‌طور که در جدول ۴ مشاهده می‌شود بین تیمارهای MWH5 و MWH10 تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

۳-۳- فعالیت آنتی‌اکسیدانی

۳-۳-۱- تاثیر تیمارهای مختلف بر توانایی حذف رادیکال

آزاد DPPH

نتایج حاصل از سنجش قدرت مهار رادیکال آزاد DPPH پروتئین‌های هیدرولیز شده سر فیل ماهی حاصل از تیمارهای مایکروویو ۱۰ دقیقه (MWH10)، مایکروویو ۵ دقیقه (MWH5)، اولتراسوند ۱۰ دقیقه (USH10)، اولتراسوند ۵ دقیقه (USH5) و حمام‌آبی (HTH) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در جدول ۳ مشاهده می‌شود. با توجه به نتایج، در هر غلظت تفاوت معنی‌داری بین تیمارها مشاهده شد ($p < 0/05$). در همه‌ی غلظت‌های اندازه‌گیری

Table 3- DPPH free radical scavenging activity (%) of Beluga head protein hydrolysate

Concentration (mg/ml)	0.5	1	2.5	5
HTH	11.29 ± 0.31^d	14.34 ± 0.6^d	33.26 ± 0.35^c	68.49 ± 0.57^d
USH5	15.48 ± 0.51^a	19.32 ± 0.30^a	45.57 ± 0.45^a	78.15 ± 0.67^a
USH10	14.37 ± 0.44^b	16.53 ± 0.44^b	39.64 ± 1.14^{ab}	74.7 ± 0.46^b
MWH5	12.89 ± 0.35^c	15.4 ± 0.34^c	34.53 ± 0.54^c	70.24 ± 0.75^c
MWH10	12.42 ± 0.57^c	14.76 ± 0.25^{cd}	33.75 ± 0.54^c	70.58 ± 0.6^c

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

Table 4- The ability of Beluga head protein hydrolysate to inhibit 50% of DPPH free radical (IC_{50})

Treatment	IC_{50}
HTH	3.64 ± 0.02^a
USH5	2.97 ± 0.01^c

USH10	3.64 ± 0.02^a
MWH5	3.53 ± 0.04^b
MWH10	3.54 ± 0.03^b

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

شود. همان گونه که قابل مشاهده است، بین تیمارهای مختلف در غلظت‌های ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر اختلاف معنی داری مشاهده شد ($p < 0/05$). بیشترین مقدار در غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر برابر $1/86 \pm 0/2$ میلی گرم بر میلی لیتر و کمترین مقدار در غلظت ۰/۱۲۵ میلی گرم بر میلی لیتر برابر $0/13 \pm 0/21$ میلی گرم بر میلی لیتر به ترتیب مربوط به تیمارهای USH5 و HTH می باشد.

۲-۳-۳- توانایی احیای یون آهن

نتایج حاصل از بررسی قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده سر فیل ماهی حاصل از تیمارهای مایکروویو ۱۰ دقیقه (MWH10)، مایکروویو ۵ دقیقه (MWH5)، اولتراسوند ۱۰ دقیقه (USH10)، اولتراسوند ۵ دقیقه (USH5) و حمام آبی (HTH) در غلظت‌های ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱، ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر در جدول ۵ مشاهده می -

Table 5- Iron ion reducing power of Beluga head protein hydrolysate

Concentration (mg/ml)	0.125	0.25	0.5	1	2.5
HTH	0.21 ± 0.013^e	0.45 ± 0.014^e	0.46 ± 0.014^e	0.63 ± 0.018^e	1.47 ± 0.11^e
USH5	0.44 ± 0.023^a	0.62 ± 0.018^a	0.78 ± 0.016^a	0.95 ± 0.027^a	1.86 ± 0.2^a
USH10	0.37 ± 0.022^b	0.55 ± 0.018^b	0.68 ± 0.01^b	0.88 ± 0.02^b	1.76 ± 0.19^b
MWH5	0.32 ± 0.014^c	0.42 ± 0.016^c	0.6 ± 0.014^c	0.78 ± 0.017^c	1.64 ± 0.25^c
MWH10	0.26 ± 0.017^d	0.39 ± 0.018^d	0.52 ± 0.016^d	0.72 ± 0.016^d	1.52 ± 0.11^d

Data are expressed as mean \pm standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

USH5 و HTH بدست آمد. مقدار IC_{50} پروتئین‌های هیدرولیز شده نیز با استفاده از درصدهای بازدارندگی در غلظت‌های مختلف محاسبه گردید و همان گونه که در جدول ۷ قابل مشاهده است، بین تیمارهای مختلف تفاوت معنی داری وجود داشت ($p < 0/05$). بیشترین مقدار IC_{50} ($4/94 \pm 0/06$ میلی گرم بر میلی لیتر) و کمترین مقدار آن ($3/95 \pm 0/03$ میلی گرم بر میلی لیتر) به ترتیب برای تیمارهای HTH و USH5 بدست آمد. همچنین بین IC_{50} تیمار HTH و MWH10 تفاوت معنی وجود نداشت ($p > 0/05$).

۳-۳-۳- توانایی حذف رادیکال آزاد ABTS

جدول ۶ بررسی تغییرات توانایی حذف رادیکال ABTS در غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده سر فیل ماهی حاصل از تیمارهای مختلف را نشان می دهد. با توجه به نتایج، بین تیمارهای مختلف در تمامی غلظت‌های مورد بررسی تفاوت معنی دار مشاهده گردید ($p < 0/05$). در تمامی غلظت‌های اندازه گیری شده بیشترین و کمترین درصد توانایی حذف رادیکال ABTS به ترتیب در تیمارهای

Table 6- ABTS free radical scavenging activity (%) of Beluga head protein hydrolysate

Concentration (mg/ml)	0.25	0.5	1	2.5	5
HTH	8 ± 0.12 ^c	10.34 ± 0.26 ^c	11.86 ± 0.15 ^b	23.43 ± 0.36 ^d	52.5 ± 0.61 ^d
USH5	9.85 ± 0.76 ^a	12.82 ± 0.45 ^a	13.65 ± 0.68 ^a	30.39 ± 0.60 ^a	63.72 ± 0.56 ^a
USH10	9.1 ± 0.45 ^{ab}	12.15 ± 0.27 ^{ab}	13.1 ± 0.93 ^a	27.7 ± 0.33 ^{ab}	57.96 ± 0.45 ^b
MWH5	8.86 ± 0.75 ^{abc}	11.14 ± 0.57 ^{bc}	12.86 ± 0.63 ^{ab}	25.87 ± 1.35 ^c	55.29 ± 0.93 ^c
MWH10	8.44 ± 0.26 ^{bc}	10.66 ± 0.18 ^c	12.53 ± 0.25 ^{ab}	24.09 ± 0.36 ^d	55.45 ± 0.45 ^c

Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different (p<0.05).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

Table 7- The ability of Beluga head protein hydrolysate to inhibit 50% of ABTS radical (IC₅₀)

Treatment	IC ₅₀ (mg/ml)
HTH	4.94 ± 0.06 ^a
USH5	3.95 ± 0.03 ^d
USH10	4.38 ± 0.04 ^c
MWH5	4.63 ± 0.1 ^b
MWH10	4.84 ± 0.1 ^b

Data are expressed as mean ± standard deviation (n=3). Means followed by different letters are significantly different (p<0.05).

HTH: Control Treatment, USH5: 5 min Ultrasound Treatment, USH10: 10 min Ultrasound Treatment, MWH5: 5 min Microwave treatment & MWH10: 10 min Microwave treatment.

۴- بحث

استفاده می شود درجه هیدرولیز افزایش می یابد [۴۷] که در این مطالعه نیز این نتیجه تأیید شده است. در هیدرولیز آنزیمی به کمک اولتراسوند، پدیده کاویتاسیون باعث دنا توره شدن جزئی پروتئین شده و گروه های آب دوست را آزاد می کند و در نهایت اتصال آنزیم به سوبسترا را آسان تر می کند، که می تواند نرخ شکسته شدن باندهای پپتیدی را افزایش داده و در نتیجه کارایی کلی فرآیند هیدرولیز آنزیمی را افزایش می دهد [۴۷]. همچنین شواهدی وجود دارد که تشعشعات مایکروویو ممکن است سرعت باز شدن ساختار پروتئین های کروی را افزایش دهند [۴۸ و ۴۹]. Izquierdo

مطالعه حاضر با هدف بررسی درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر فیل ماهی تحت تیمار حمام آبی، مایکروویو و اولتراسوند انجام شد.

درجه هیدرولیز نشان دهنده درصد کاهش تعداد پیوندهای پپتیدی در طی فرآیند هیدرولیز است [۴۶] و مستقیم ترین شاخص بررسی ویژگی های محصول هیدرولیز شده است. مطالعات نشان داده اند زمانی که از فناوری هایی مانند مایکروویو و اولتراسوند در طول یا قبل از هیدرولیز آنزیمی

کوتاه کردن زمان مورد نیاز برای هیدرولیز آنزیمی بر درجه هیدرولیز تأثیر بگذارد [۵۱]. همچنین Yang و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای بر روی ماهی کپور سرگنده^۲ درجه هیدرولیز بالاتری را برای نمونه تیمار شده با اولتراسوند نسبت به نمونه بدون پیش تیمار گزارش دادند [۵۶] و بیان کردند که پیش تیمار فراصوت می‌تواند کارایی هیدرولیز آنزیمی را بهبود بخشد که می‌تواند به ضربه‌های مکانیکی ناشی از فروپاشی ریز حباب‌ها طی پدیده کاویتاسیون مرتبط باشد که سطح سوبستراهای جامد را به سمت مکان‌های فعال آنزیم‌ها باز می‌کند [۵۷].

DPPH یک ترکیب ناپایدار است که با پذیرفتن الکترون یا هیدروژن به یک مولکول پایدار تبدیل می‌شود [۳۴]. این ترکیب با گرفتن یک الکترون از ترکیب آنتی‌اکسیدان، از رنگ بنفش به زرد تغییر رنگ می‌دهد. هر چه بر مقدار ماده آنتی-اکسیدان افزوده شود، DPPH بیشتری مصرف شده و رنگ بنفش بیشتر به سمت زرد متمایل شود [۴۳]. فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده تنها به یک مکانیسم وابسته نیست. پروتئین‌های هیدرولیز شده حاوی توالی‌های مختلف پپتیدی با مکانیسم‌های اثر متفاوت هستند. برخی از پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی به عنوان جاذب یا مهارکننده رادیکال موثرتر هستند و برخی دیگر کاهنده فلزات هستند [۴۰]. فعالیت مهار رادیکال یک پروتئین هیدولیز شده به تعداد پپتیدهای فعال زیستی آزاد شده بستگی دارد که به نوبه خود عمدتاً توسط شرایط هیدرولیز مورد استفاده همانند نوع سوبسترا، نوع آنزیم پروتئولیتیک مورد استفاده، شرایط پیش تیمار، pH، دما، نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان هیدرولیز تعیین می‌شود [۵۸].

در مطالعه حاضر درصد فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH با افزایش غلظت پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت و بیشترین مقدار آن در تیمار اولتراسوند ۵ دقیقه مشاهده شد، که نشان می‌دهد احتمالاً پیش تیمار اولتراسوند

و همکاران (۲۰۰۸) بیان نموده‌اند که امواج مایکروویو بسته به شدت، فرکانس و مدت زمان قرار گرفتن در معرض امواج، اثرات متفاوتی ایجاد می‌کنند [۵۰]. در مطالعه حاضر نمونه پیش تیمار شده با مایکروویو اثر بهتری را نسبت به نمونه‌های اولتراسوند و حمام‌آبی نشان داد. افزایش درجه هیدرولیز در تیمار مایکروویو ۱۰ دقیقه نسبت به سایر تیمارها نیز می‌تواند نتیجه اثرات امواج مایکروویو باشد که باعث باز شدن ساختار پروتئین و بهبود دسترسی آنزیم می‌شود و در نتیجه هیدرولیز آنزیمی را تسریع می‌کند [۵۱]. در مطالعه Bruno و همکاران (۲۰۱۹) نیز پیش تیمارهای اولتراسوند، مایکروویو و حمام آبی اثرات متفاوتی بر مقدار درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی *Labeo rohita* نشان دادند [۴۰]. در این پژوهش استفاده از پیش تیمار مایکروویو بدون در نظر گرفتن نوع آنزیم، باعث افزایش درجه هیدرولیز نسبت به تیمار شاهد شد. همچنین نمونه تیمار شده با اولتراسوند اثر بهتری را نسبت به نمونه بدون پیش تیمار نشان داد که مشابه با پژوهش حاضر می‌باشد. Uluko و همکاران (۲۰۱۳) نیز تأثیر پیش تیمارهای US و MW بر افزایش درجه هیدرولیز پروتئین شیر را گزارش نمودند [۵۲]. در مطالعه Zou و همکاران (۲۰۱۵) بر روی مغز خوک نیز نمونه پیش تیمار شده با اولتراسوند درجه هیدرولیز بهتری را نسبت به نمونه بدون پیش تیمار نشان داد [۵۳]. Wu و همکاران (۲۰۱۸) با مطالعه بر روی پروتئین آب پنیر نیز، درجه هیدرولیز بالاتری را برای نمونه تیمار شده با اولتراسوند نسبت به نمونه بدون پیش تیمار گزارش دادند [۵۴] و بیان کردند که این نتیجه ممکن است به دلیل تأثیر اولتراسوند بر ساختار پروتئین باشد که باعث می‌شود مکان‌های اتصال آنزیمی بیشتری در دسترس آنزیم قرار گیرد [۴۹ و ۵۵]. در مطالعه Ketnawa و Ligeaga (۲۰۱۷) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان^۱ درجه هیدرولیز بهتری برای نمونه تحت تیمار با مایکروویو نسبت به نمونه بدون پیش تیمار گزارش شده است [۳۸]. این محققین بیان کردند که پیش تیمار با مایکروویو می‌تواند با

مطالعات نشان داده‌اند که تغییرات در اندازه، تعداد، سطح و ترکیب اسیدهای آمینه آزاد و پپتیدهای کوچک در طول زمان هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی تاثیر می‌گذارد [۵۳]. نتایج Chabeaud و همکاران (۲۰۰۹) نشان داد که شرایط هیدرولیز تأثیر مستقیم بر میزان فعالیت آنزیم و تولید پپتیدهای آنتی‌اکسیدانی دارد. همچنین غلظت پپتید می‌تواند بر ظرفیت مهارکنندگی رادیکال آزاد تأثیر بگذارد [۶۰]. در پژوهش حاضر مقدار درجه هیدرولیز نمونه‌های با پیش‌تیمار اولتراسوند و مایکروویو بیش‌تر از نمونه‌های بدون پیش‌تیمار است و با توجه فعالیت بالاتر این نمونه‌ها در مهار رادیکال آزاد DPPH، می‌توان تاثیر به‌سزای پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بر افزایش توانایی پروتئین هیدرولیز شده در مهار رادیکال آزاد DPPH را مشاهده کرد.

روش ارزیابی قدرت کاهندگی اغلب جهت بررسی توانایی یک آنتی‌اکسیدان برای اهدای الکترون استفاده می‌شود [۶۱]. در مطالعات مختلف بیان شده است که ارتباط مستقیمی بین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی و قدرت کاهندگی یک ترکیب زیست‌فعال وجود دارد. در این روش توانایی پروتئین‌های هیدرولیز شده برای کاهش یون فریک به یون فرو ارزیابی می‌شود [۳۷]. تغییر در اندازه، ساختار، تعداد آمینواسیدها و پپتیدها در اثر گذشت زمان و افزایش درجه آب‌کافت، بر روی کاهندگی یون آهن تأثیرگذار است [۶۲]. در مطالعه حاضر پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو بهترین فعالیت احیاکنندگی یون آهن در تمامی غلظت‌ها دارا بودند. در پژوهش Zou و همکاران (۲۰۱۳) بر روی مغز خوک نمونه پیش‌تیمار شده با اولتراسوند اثر احیاکنندگی بهتری را نسبت به نمونه بدون تیمار نشان داد. نتایج احیای آهن در این مطالعه نشان داد تیمار اولتراسوند منجر به توانایی بهتر در اهدای الکترون می‌شود که در فعالیت آنتی‌اکسیدانی دخیل است [۵۴]. در مطالعه Kangsanant (۲۰۱۴) بر روی ماهی تیلاپیا نیز بهترین

منجر به تولید مقادیر زیادی از پپتیدهای اهدا کننده هیدروژن گردید که می‌تواند با رادیکال آزاد DPPH واکنش دهند و آن‌ها را به ترکیبات پایدارتر تبدیل کنند [۴۰]. در مطالعه Bruno و همکاران (۲۰۱۹) بر روی سر ماهی *Labeo rohita* نیز نمونه پیش‌تیمار شده با اولتراسوند فعالیت مهار-کنندگی DPPH بهتری را نسبت به تیمار کنترل نشان داد [۴۰]. در مطالعه Kangsanant و همکاران (۲۰۱۴) بر روی ماهی تیلاپیا^۳ نیز نمونه پیش‌تیمار شده با اولتراسوند اثر مهار-کنندگی DPPH بهتری را نسبت به نمونه‌های دیگر نشان داد [۳۹]. همچنین در مطالعه Zou و همکاران (۲۰۱۳) بر روی خوک نیز نمونه پیش‌تیمار شده با اولتراسوند اثر مهارکنندگی DPPH بهتری را نسبت به نمونه بدون پیش‌تیمار نشان داد این محققین بیان کردند که احتمالاً نمونه تیمار شده با اولتراسوند حاوی پپتیدهای کوچک با وزن مولکولی نسبتاً کم است که به عنوان دهنده هیدروژن عمل می‌کنند و رادیکال‌های آزاد را به محصولات پایدارتر تبدیل می‌کنند [۵۴]. همچنین Yang و همکاران (۲۰۱۶) در مطالعه‌ای بر روی کپور سر گنده نیز برای نمونه تیمار شده با اولتراسوند فعالیت مهارکنندگی رادیکال DPPH بهتری را نسبت به نمونه‌های بدون تیمار و تیمار مایکروویو گزارش دادند [۵۶]. همچنین در مطالعه حاضر درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH برای تیمارهای MWH10 و MWH5 در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تقریباً مشابه با مطالعه Nguyen و همکاران (۲۰۱۷) می‌باشد [۵۹]. در مطالعه Bruno و همکاران (۲۰۱۹) بر روی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی *Labeo rohita* و Uluko و همکاران (۲۰۱۴) نیز درصد مهارکنندگی رادیکال DPPH نمونه تیمار شده با مایکروویو بهتر از نمونه بدون تیمار گزارش شد [۱۳ و ۱۴]. توانایی مهار رادیکال DPPH تیمار مایکروویو را می‌توان به افزایش حلالیت پپتیدهای کوچکتر (DH بالاتر) و حضور احتمالی درصد بالای اسیدهای آمینه آب‌گریز نسبت داد.

آنزیم اجازه می‌دهد تا به جایگاه‌های هدف بیشتری دسترسی پیدا کند و پپتیدهای فعال را آزاد کند [۳۸].

از دیگر شاخص‌های بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی، بررسی قدرت مهار رادیکال آزاد ABTS است. رادیکال ABTS یک رادیکال ناپایدار است که به آسانی توسط یک آنتی-اکسیدان مهار می‌گردد [۶۶]. سنجش فعالیت مهار رادیکال ABTS می‌تواند هم برای ترکیبات چربی دوست و هم برای ترکیبات آبدوست به کار برد، و به طور گسترده به عنوان یک روش سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی استفاده می‌شود [۶۷]. در مطالعه حاضر بهترین فعالیت حذف رادیکال ABTS در تمامی غلظت‌های اندازه‌گیری شده در تیمار USH5 مشاهده شد و بیشترین مقدار حذف رادیکال ABTS در این تیمار در غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی-لیتر بدست آمد.

مطالعه‌ی Jeevitha و همکاران (۲۰۱۴) بر روی عملکرد آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی ماهی ساردین^۴ نیز نشان داد که با افزایش غلظت تا ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر توانایی مهار رادیکال ABTS افزایش می‌یابد [۶۶]. در مطالعه Zou و همکاران (۲۰۱۳) بر روی پروتئین هیدرولیز شده مغز خوک نیز نمونه تیمار شده با اولتراسوند اثر مهارکنندگی رادیکال ABTS بهتری نسبت به نمونه کنترل نشان داد. این محققین علت این مشاهده را درصد بالای پپتیدهای با وزن مولکولی پایین و حضور مقادیر زیاد پپتیدهای آبدوست و آبگریز بیان کردند [۵۴]. در مطالعه Kangasanant و همکاران (۲۰۱۴) بر روی پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیلپیا فعالیت مهار رادیکال ABTS برای پیش‌تیمار اولتراسوند در شدت ۷۰ وات بالاتر از نمونه‌های بدون پیش‌تیمار بود [۳۹]. همچنین افزایش زمان پیش‌تیمار باعث کاهش فعالیت مهار رادیکال ABTS در تمام شرایط تیمار شد که مشابه با نتایج پژوهش حاضر بود. در مطالعه Ketnawa و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان درصد مهارکنندگی

مقدار احیای یون آهن در نمونه تیمار شده با اولتراسوند نسبت به نمونه بدون تیمار گزارش شد [۳۹]. Moure و همکاران (۲۰۰۶) بیان کردند که اندازه و غلظت پروتئین به وضوح بر قدرت احیای یون آهن تأثیر می‌گذارد [۶۳]. احیای یون آهن بالاتر را می‌توان به محتوای بالای پپتیدهای اهدا-کننده الکترون یا هیدروژن نسبت دادند [۲۵]. در مطالعه Nguyen و همکاران (۲۰۱۷) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نمونه تحت تیمار با مایکروویو اثر احیاکنندگی بهتری را نسبت به نمونه بدون تیمار نشان داد [۵۹]. نتایج این مطالعه مشخص کرد که اندازه پپتید نقش مهمی در ظرفیت کاهندگی پپتیدهای زیست‌فعال دارد. به طور کلی فعالیت کاهندگی به وزن مولکولی، ساختار، ترکیب اسید آمینه و شکل فضایی پپتیدها بستگی دارد [۶۴ و ۶۵]. در مطالعه Bruno و همکاران (۲۰۱۹) بر روی سر ماهی *Labeo rohita* نیز نمونه‌های حاصل از پیش‌تیمار مایکروویو و اولتراسوند بالاترین فعالیت احیاکنندگی یون آهن را دارا بودند. به طور کلی، پیش‌تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده سر ماهی *Labeo rohita* را بهبود بخشیدند. این محققین بیان کردند که بهبود فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه‌های حاصل از تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو به احتمال زیاد به دلیل باز شدن ساختار پروتئین و یا بازآرایی مجدد آن می‌باشد که منجر به در دسترس قرار گرفتن بخش‌های آبگریز برای آنزیم پروتئاز گردید. این تغییرات در نهایت منجر به افزایش سرعت هیدرولیز و تولید مقادیر زیادی از پپتیدهای با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا می‌گردد [۴۰]. در مطالعه Ketnawa و Ligeaga (۲۰۱۷) بر روی ماهی قزل‌آلای رنگین کمان نیز برای نمونه پیش‌تیمار شده با مایکروویو اثر احیاکنندگی آهن بهتری نسبت به نمونه بدون پیش‌تیمار گزارش دادند. در این پژوهش بیان شد که این نتیجه را می‌توان به تابش امواج مایکروویو ربط داد که ساختار پروتئین را تغییر می‌دهد و به

هیدرولیز شده سر فیل ماهی نشان داد که تیمارهای اولتراسوند ۵ و ۱۰ دقیقه نسبت به سایر تیمارها تاثیر به سزایی بر فعالیت آنتی اکسیدانی داشته و به دنبال آن تیمار مایکروویو ۱۰ دقیقه نسبت به سایر تیمارها بر فعالیت آنتی اکسیدانی اثر داشت. پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تیمار اولتراسوند ۵ دقیقه کمترین مقدار IC_{50} و بالاترین توانایی مهارکنندگی رادیکال-های آزاد را در مقایسه با سایر تیمارها داشت. در مجموع این یافته‌ها حاکی از آن است که استفاده از فناوری‌های نوین اولتراسوند و مایکروویو می‌تواند به طور موثری بر درجه هیدرولیز و فعالیت آنتی اکسیدانی هیدرولیزات پروتئین تاثیر بگذارد و شرایط مختلف پیش تیمار می‌تواند منجر به تولید محصولاتی با ویژگی‌های عملکردی متفاوت شود.

رضایت نامه کتبی

رضایت نامه کتبی و آگاهانه از همه شرکت کنندگان در مطالعه اخذ شد.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام کردند که هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

بیانیه دسترسی‌ها

داده‌های پژوهش به اشتراک گذاشته نمی‌شوند.

۶-منابع

- [1] Akhila, D. S., Ashwath, P., Manjunatha, K. G., Akshay, S. D., Surasani, V. K. R., Sofi, F. R., ... & Ozogul, F. (2024). Seafood processing waste as a source of functional components: Extraction and applications for various food and non-food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 145, 104348.
- [2] Zheng, X., Zou, B., Zhang, J., Cai, W., Na, X., Du, M., ... & Wu, C. (2024). Recent advances of ultrasound-assisted technology on aquatic protein processing: Extraction, modification, and freezing/thawing-induced oxidation. *Trends in Food Science & Technology*, 144, 104309.
- [3] de la Fuente, B., Aspevik, T., Barba, F. J., Kousoulaki, K., & Berrada, H. (2023). Mineral

رادیکال ABTS برای نمونه با پیش تیمار مایکروویو گزارش شد [۳۸] و همانند پژوهش حاضر، تیمار حاصل از مایکروویو نسبت به نمونه شاهد عملکرد بهتری داشت. در مطالعه Zheng و همکاران (۲۰۲۱). بر روی استخوان گاو نمونه‌های تیمار شده با اولتراسوند و مایکروویو درصد مهار-کنندگی رادیکال ABTS بهتری را نسبت به نمونه بدون تیمار نشان داد [۶۸]. این محققین دلیل احتمالی برای عملکرد بهتر نمونه تیمار شده با مایکروویو در مقایسه با تیمار شاهد را این گونه بیان کردند که ممکن است در اثر امواج مایکروویو ساختار ثانویه پروتئین‌ها باز شده و تغییرات در ناحیه آبگریز پروتئین‌ها ایجاد شده باشد که منجر به تولید پپتیدهایی با عملکرد آنتی اکسیدانی مطلوب می‌گردد [۶۹] و همچنین منجر به افزایش درجه هیدرولیز و تولید پپتیدهای کوچک‌تر شود [۷۰]. در مطالعه Yang و همکاران (۲۰۱۶) بر روی کپور سرگنده نیز همانند پژوهش حاضر، برای نمونه تیمار شده با اولتراسوند فعالیت مهارکنندگی ABTS بهتری را نسبت به نمونه بدون تیمار و نمونه تیمار شده با مایکروویو گزارش دادند [۵۶].

۵- نتیجه گیری

در پژوهش حاضر نتایج ارزیابی درجه هیدرولیز نشان داد که پیش تیمارهای اولتراسوند و مایکروویو کارایی بالایی در تولید پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز مناسب داشتند. نتایج بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین

bioaccessibility and antioxidant capacity of protein hydrolysates from salmon (*Salmo salar*) and mackerel (*Scomber scombrus*) backbones and heads. *Marine Drugs*, 21(5), 294.

- [4] Ghaly, A. E., Ramakrishnan, V. V., Brooks, M. S., Budge, S. M., & Dave, D. (2013). Fish processing wastes as a potential source of proteins. *Amino acids and oils: A critical review. J. Microb. Biochem. Technol*, 5(4), 107-129.
- [5] Dave, D., & Routray, W. (2018). Current scenario of Canadian fishery and corresponding underutilized species and fishery byproducts: A potential source of omega-3 fatty acids. *Journal of Cleaner Production*, 180, 617-641.
- [6] Yang, P., Ke, H., Hong, P., Zeng, S., & Cao, W. (2011). Antioxidant activity of bigeye tuna

- (Thunnus obesus) head protein hydrolysate prepared with Alcalase. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(12), 2460-2466.
- [7] Wang, Y., Chang, Y., Hou, H., Wang, J., & Xue, C. (2023). Recent advance in the investigation of aquatic “blue foods” at a molecular level: A proteomics strategy. *Trends in Food Science & Technology*, 131, 196-209.
- [8] Lu, S., Lu, Q., Xiao, L., Zhang, L., Liu, J., Hu, Y., ... & Li, C. (2024). Fish protein as a new emulsifier: Mechanism, enhancement, application. *Food Frontiers*, 5(3), 1096-1107.
- [9] Qian, J., Chen, D., Zhang, Y., Gao, X., Xu, L., Guan, G., & Wang, F. (2023). Ultrasound-assisted enzymatic protein hydrolysis in food processing: Mechanism and parameters. *Foods*, 12(21), 4027.
- [10] Ulug, S. K., Jahandideh, F., & Wu, J. (2021). Novel technologies for the production of bioactive peptides. *Trends in food science & technology*, 108, 27-39.
- [11] Knežević-jugović, z.d., stefanović, a.b., žuža, m.g., milovanović, s.l., jakovetić, s.m., manojlović, v.b. And bugarski, b.m., (2012). Effects of sonication and high-pressure carbon dioxide processing on enzymatic Hydrolysis of egg white proteins. *Acta periodica technologica*, (43), pp.33-41.
- [12] Quiros, a., chichón, r., recio, i., and lópez-fandiño, r., (2007). The use of high hydrostatic pressure to promote the proteolysis and release of bioactive peptides from ovalbumin. *Food chemistry*, 104, 1734–1739.
- [13] Uluko, h., liu, l., li, h., cui, w., zhang, s., zhao, l., xue, h., and lv, j. (2014). Effect of power ultrasound pretreatment on peptidic profiles and angiotensin converting enzyme inhibition of milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of the science of food and agriculture*, 94, 2420–2428.
- [14] Nadar, S. S., & Rathod, V. K. (2017). Ultrasound assisted intensification of enzyme activity and its properties: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 33(9), 170.
- [15] Hao, Y., Xing, L., Wang, Z., Cai, J., Toldrá, F., & Zhang, W. (2023). Study on the anti-inflammatory activity of the porcine bone collagen peptides prepared by ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Ultrasonics sonochemistry*, 101, 106697.
- [16] Liu, H., Sun, H. N., Zhang, M., Mu, T. H., & Khan, N. M. (2023). Production, identification and characterization of antioxidant peptides from potato protein by energy-divergent and gathered ultrasound assisted enzymatic hydrolysis. *Food Chemistry*, 405, 134873.
- [17] He, S., Franco, C. and Zhang, W., (2013). Functions, applications and production of protein hydrolysates from fish processing co-products (FPCP). *Food Research International*, 50(1), pp.289-297.
- [18] Li, Y., Fabiano-Tixier, A. S., Abert-Vian, M., & Chemat, F. (2013). Microwave-assisted extraction of antioxidants and food colors. *Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice*, 103-125.
- [19] Tsiaka, T., Zoumpoulakis, P., Sinanoglou, V. J., Makris, C., Heropoulos, G. A., & Calokerinos, A. C. (2015). Response surface methodology toward the optimization of high-energy carotenoid extraction from *Aristeus antennatus* shrimp. *Analytica chimica acta*, 877, 100-110.
- [20] Viji, P., Rao, B. M., Debbarma, J., & Ravishankar, C. N. (2022). Research developments in the applications of microwave energy in fish processing: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 123, 222-232.
- [21] Ganjeh, A. M., Saraiva, J. A., Pinto, C. A., Casal, S., & Silva, A. M. (2023). Emergent technologies to improve protein extraction from fish and seafood by-products: an overview. *Applied Food Research*, 3(2), 100339.
- [22] Kim, S. K. (Ed.). (2013). *Marine proteins and peptides: biological activities and applications*. John Wiley & Sons.
- [23] Rajapakse, N., Mendis, E., Jung, W. K., Je, J. Y., & Kim, S. K. (2005). Purification of a radical scavenging peptide from fermented mussel sauce and its antioxidant properties. *Food research international*, 38(2), 175-182.
- [24] Shahidi, F., & Zhong, Y. (2008). Bioactive peptides. *Journal of AOAC international*, 91(4), 914-931.
- [25] Je, J. Y., Lee, K. H., Lee, M. H., & Ahn, C. B. (2009). Antioxidant and antihypertensive protein hydrolysates produced from tuna liver by enzymatic hydrolysis. *Food Research International*, 42(9), 1266-1272.
- [26] Zhu, K. X., Su, C. Y., Guo, X. N., Peng, W., & Zhou, H. M. (2011). Influence of ultrasound during wheat gluten hydrolysis on the antioxidant activities of the resulting hydrolysate. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(5), 1053-1059.
- [27] Gu, Y., & Wu, J. (2013). LC-MS/MS coupled with QSAR modeling in characterising of angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean proteins. *Food chemistry*, 141(3), 2682-2690.
- [28] Rajanbabu, V., & Chen, J. Y. (2011). Applications of antimicrobial peptides from fish and perspectives for the future. *Peptides*, 32(2), 415-420.
- [29] Zhong, S., Ma, C., Lin, Y. C., & Luo, Y. (2011). Antioxidant properties of peptide fractions from silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) processing by-product protein hydrolysates evaluated by electron spin resonance

- spectrometry. *Food chemistry*, 126(4), 1636-1642.
- [30] Ahn, C. B., Je, J. Y., & Cho, Y. S. (2012). Antioxidant and anti-inflammatory peptide fraction from salmon byproduct protein hydrolysates by peptic hydrolysis. *Food Research International*, 49(1), 92-98.
- [31] Wang, M., Nie, Y., Peng, Y., He, F., Yang, J., Wu, C., & Li, X. (2011). Purification, characterization and antitumor activities of a new protein from *Syngnathus acus*, an officinal marine fish. *Marine Drugs*, 10(1), 35-50.
- [32] Girgih, A. T., Udenigwe, C. C., Hasan, F. M., Gill, T. A., & Aluko, R. E. (2013). Antioxidant properties of Salmon (*Salmo salar*) protein hydrolysate and peptide fractions isolated by reverse-phase HPLC. *Food Research International*, 52(1), 315-322.
- [33] Ko, J. Y., Lee, J. H., Samarakoon, K., Kim, J. S., & Jeon, Y. J. (2013). Purification and determination of two novel antioxidant peptides from flounder fish (*Paralichthys olivaceus*) using digestive proteases. *Food and Chemical Toxicology*, 52, 113-120.
- [34] Farvin, K. S., Andersen, L. L., Nielsen, H. H., Jacobsen, C., Jakobsen, G., Johansson, I., & Jessen, F. (2014). Antioxidant activity of Cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysates: In vitro assays and evaluation in 5% fish oil-in-water emulsion. *Food chemistry*, 149, 326-334.
- [35] Jiang, H., Tong, T., Sun, J., Xu, Y., Zhao, Z., & Liao, D. (2014). Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus maruadsi*) muscle protein hydrolysate. *Food Chemistry*, 154, 158-163.
- [36] Šližytė, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., & Rustad, T. (2005). Characteristics of protein fractions generated from hydrolysed cod (*Gadus morhua*) by-products. *Process Biochemistry*, 40(6), 2021-2033.
- [37] Esmaeili Kharyeki, M., Rezaei, M., Khodabandeh, S., & Motamedzadegan, A. (2018). Antioxidant activity of protein hydrolysate in skipjack tuna head. *Fisheries Science and Technology*, 7(1), 57-64.
- [38] Ketnawa, S. and Liceaga, A.M., (2017). Effect of microwave treatments on antioxidant activity and antigenicity of fish frame protein hydrolysates. *Food and Bioprocess Technology*, 10(3), pp.582-591.
- [39] Kangsanant, S., Murkovic, M., & Thongraung, C. (2014). Antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of tilapia (*Oreochromis niloticus*) protein hydrolysate: Effect of ultrasonic pretreatment and ultrasonic-assisted enzymatic hydrolysis. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(8), 1932-1938.
- [40] Bruno, S. F., Kudre, T. G., & Bhaskar, N. (2019). Effects of different pretreatments and proteases on recovery, umami taste compound contents and antioxidant potentials of *Labeo rohita* head protein hydrolysates. *Journal of food science and technology*, 56(4), 1966-1977.
- [41] Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of biology Chemistry*, 193(1), 265-275.
- [42] Hoyle N.T. and Merritt J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *Journal of Food Science*, 59, 76-79.
- [43] Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- [44] Alemán, A., Pérez-Santín, E., Bordenave-Juchereau, S., Arnaudín, I., Gómez-Guillén, M. C., & Montero, P. (2011). Squid gelatin hydrolysates with antihypertensive, anticancer and antioxidant activity. *Food Research International*, 44(4), 1044-1051.
- [45] Oyaizu, m., (1986). Studies on products of browning reactions: antioxidative activities of products of Browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese journal of nutrition*, 44(6): 307-315.
- [46] Wang, B., Meng, T., Ma, H., Zhang, Y., Li, Y., Jin, J., & Ye, X. (2016). Mechanism study of dual-frequency ultrasound assisted enzymolysis on rapeseed protein by immobilized Alcalase. *Ultrasonics sonochemistry*, 32, 307-313.
- [47] Umego, E. C., He, R., Huang, G., Dai, C., & Ma, H. (2021). Ultrasound-assisted fermentation: Mechanisms, technologies, and challenges. *Journal of Food Processing and Preservation*, 45(6), e15559.
- [48] Bohr, H., & Bohr, J. (2000). Microwave-enhanced folding and denaturation of globular proteins. *Physical Review E*, 61(4), 4310.
- [49] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Tsakama, M., Lu, J., & Lv, J. (2015). Effects of thermal, microwave, and ultrasound pretreatments on antioxidative capacity of enzymatic milk protein concentrate hydrolysates. *Journal of Functional Foods*, 18, 1138-1146.
- [50] Izquierdo, F. J., Alli, I., Yaylayan, V., & Gomez, R. (2007). Microwave-assisted digestion of β -lactoglobulin by pronase, α -chymotrypsin and pepsin. *International dairy journal*, 17(5), 465-470.
- [51] Rejasse, B., Lamare, S., Legoy, M. D., & Besson, T. (2007). Influence of microwave irradiation on enzymatic properties: applications in enzyme chemistry. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 22(5), 519-527.
- [52] Uluko, H., Zhang, S., Liu, L., Chen, J., Sun, Y., Su, Y., ... & Lv, J. (2013). Effects of microwave and ultrasound pretreatments on enzymolysis of

- milk protein concentrate with different enzymes. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(11), 2250-2257.
- [53] Wu, Q., Zhang, X., Jia, J., Kuang, C., & Yang, H. (2018). Effect of ultrasonic pretreatment on whey protein hydrolysis by alcalase: Thermodynamic parameters, physicochemical properties and bioactivities. *Process Biochemistry*, 67, 46-54.
- [54] Zou, Y., Ding, Y., Feng, W., Wang, W., Li, Q., Chen, Y., ... & Wu, X. (2016). Enzymolysis kinetics, thermodynamics and model of porcine cerebral protein with single-frequency countercurrent and pulsed ultrasound-assisted processing. *Ultrasonics Sonochemistry*, 28, 294-301.
- [55] Jia, J., Ma, H., Zhao, W., Wang, Z., Tian, W., Luo, L., & He, R. (2010). The use of ultrasound for enzymatic preparation of ACE-inhibitory peptides from wheat germ protein. *Food Chemistry*, 119(1), 336-342.
- [56] Yang, F., Hu, F., Jiang, Q., Xu, Y., & Xia, W. (2016). Effect of pretreatments on hydrolysis efficiency and antioxidative activity of hydrolysates produced from bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 25(6), 916-927.
- [57] Yachmenev, V., Condon, B., Klasson, T., & Lambert, A. (2009). Acceleration of the enzymatic hydrolysis of corn stover and sugar cane bagasse celluloses by low intensity uniform ultrasound. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy*, 3(1), 25-31.
- [58] Sila, A., & Bougatef, A. (2016). Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *Journal of Functional Foods*, 21, 10-26.
- [59] Nguyen, E., Jones, O., Kim, Y. H. B., San Martin-Gonzalez, F., & Liceaga, A. M. (2017). Impact of microwave-assisted enzymatic hydrolysis on functional and antioxidant properties of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* by-products. *Fisheries science*, 83(2), 317-331.
- [60] Chabeaud, A., Vandanjon, L., Bourseau, P., Jaouen, P., Chaplain-Derouiniot, M., & Guérard, F. (2009). Performances of ultrafiltration membranes for fractionating a fish protein hydrolysate: Application to the refining of bioactive peptidic fractions. *Separation and Purification Technology*, 66(3), 463-471.
- [61] Yaqubzadeh, Z., and Safari, R., (2017). antioxidant activity of enzyme hydrolysates of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *In the second international conference on new technologies in science*, Amol (in persian) <https://civilica.com/doc/899668>.
- [62] Bougatef, A., Nedjar-Arroume, N., Manni, L., Ravallec, R., Barkia, A., Guillochon, D., & Nasri, M. (2010). Purification and identification of novel antioxidant peptides from enzymatic hydrolysates of sardinelle (*Sardinella aurita*) by-products proteins. *Food chemistry*, 118(3), 559-565.
- [63] Moure, A., Gullón, P., Domínguez, H., & Parajó, J. C. (2006). Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochemistry*, 41(9), 1913-1923.
- [64] Yıldırım, A., Mavi, A., & Kara, A. A. (2001). Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49(8), 4083-4089.
- [65] Guo, L., Hou, H., Li, B., Zhang, Z., Wang, S., & Zhao, X. (2013). Preparation, isolation and identification of iron-chelating peptides derived from Alaska pollock skin. *Process Biochemistry*, 48(5-6), 988-993.
- [66] Jeevitha, K., Mohana, P. K., & Khora, S. S. (2014). Antioxidant activity of fish protein hydrolysates from *Sardinella longiceps*. *International Journal of Drug Development and Research*, 6(4), 137-45.
- [67] Miliuskas, G., Venskutonis, P. R., & Van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food chemistry*, 85(2), 231-237.
- [68] Zheng, Z., Zhang, M., Fan, H., & Liu, Y. (2021). Effect of microwave combined with ultrasonic pretreatment on flavor and antioxidant activity of hydrolysates based on enzymatic hydrolysis of bovine bone. *Food Bioscience*, 44, 101399.
- [69] Habinshuti, I., Mu, T. H., & Zhang, M. (2020). Ultrasound microwave-assisted enzymatic production and characterisation of antioxidant peptides from sweet potato protein. *Ultrasonics Sonochemistry*, 69, 105262.
- [70] Mei, Z. H. O. U., & Min, Z. H. A. N. G. (2012). Preparation of Anti-oxidation Bioactive Peptide of Rice Bran Protein. *Natural Product Research & Development*, 24(6).



Scientific Research

Production of Hydrolyzed Protein from Beluga (*Huso huso*) Head: Effect of Ultrasound and Microwave on Antioxidant Properties

Seyede Mohaddese Hoseyni¹, Mina Esmaili^{1*}, Sakineh Yeganeh¹

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

ARTICLE INFO

ABSTRACT

Article History:

Received: 2025/11/04

Review: 2025/12/09

Accepted: 2025/12/15

Keywords:

Ultrasound,
Microwave,
Hydrolyzed protein,
Degree of hydrolysis,
Antioxidant activity,
Beluga

DOI: 10.48311/fsct.2026.117483.82920

*Corresponding Author E-

Mina.smaily@gmail.com

This study aimed to evaluate the effects of ultrasound and microwave pretreatments on the degree of hydrolysis and antioxidant activity of hydrolyzed proteins derived from beluga sturgeon (*Huso huso*) head. Fish heads were pretreated using ultrasound (frequency 20 kHz, intensity 75 W) and microwave (frequency 2450 Hz, temperature 90 °C) for 5 and 10 minutes, followed by enzymatic hydrolysis with alcalase (2% enzyme concentration) at 55 °C and pH 8. The effect of different pretreatments on the degree of hydrolysis (DH) and antioxidant activity was subsequently investigated. Results indicated that both ultrasound and microwave pretreatments significantly increased DH values ($p < 0.05$). The minimum degree of hydrolysis was $34.48 \pm 0.25\%$ and the maximum was $50.42 \pm 0.18\%$, corresponding to water bath and 10-minute microwave treatments, respectively. The highest and lowest antioxidant activities (DPPH and ABTS radical scavenging activity and iron ion reducing power) were observed in 5-minute ultrasound and water bath treatments, respectively. The IC_{50} values for DPPH and ABTS radical scavenging of the 5-minute ultrasound treatment were 2.97 ± 0.01 mg/mL and 3.95 ± 0.03 mg/mL, which were significantly lower than other treatments ($p < 0.05$). Also, in all samples, with increasing concentration, antioxidant activity increased significantly ($p < 0.05$). In general, it can be stated that ultrasound and microwave pretreatments have a favorable effect on the properties of hydrolyzed protein from beluga head, and different treatments can lead to the production of products with different characteristics.