اثر شرایط هیدرولیز بر اندازه مولکولی و درجه هیدرولیز پروتئین سر ماهی تون زردباله *(Thunus albacara)* با آنزیم آلکالاز

نسیم پاسدار[1]*، علی معتمد زادگان[2]، رضا صفری[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم وصنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین_ پیشوا، ورامین، ایران

[2] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران

[3] پژوهشکده اکولوژی آبزیان دریای خزر، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۴/۳ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۸/۱۷

Archive of SID

چکیده

ضایعات جامد تولید شده در صنایع کنسرو سازی، ۵۰ تا ۷۰ درصد از مواد خام اولیه را شامل می‌شوند. هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی، دست‌یابی به مواد با ارزش با راندمان و کیفیت بالا می‌باشد. هدف از انجام این تحقیق، بهینه سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده (به لحاظ کاربردهای فراوان آن در صنایع غذایی) بوده است. در تحقیق حاضر هیدرولیز آنزیمی سر ماهی تون زرد باله با به‌کارگیری آنزیم آلکالاز با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار مطالعه شد. هیدرولیز در شرایط (دما : ۵۵ درجه سانتی گراد ، pH =۸/۵ ، فعالیت آنزیمیAu/Kg ۳۵ و سه مرحله متوالی زمان ۲۰، ۱۰و ۳۰ دقیقه) انجام شده و راندمان استحصال پروتئین، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و الگوی الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیز شده بررسی شد. نتایج نشان داد با افزایش زمان هیدرولیز، میزان بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیز افزایش و طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. از میان سه زمان فوق زمان ۳۰ دقیقه با بالاترین درجه هیدرولیزاسیون با میزان (۷/۳۰) بهترین زمان برای آنزیم آلکالاز در نظر گرفته شد. حداکثر بازیافت پروتئین و درجه هیدرولیز مربوط به مرحله اول هیدرولیز در هر سه زمان بوده است($p<0.01$). در مطالعه الگوی الکتروفورز با SDS-PAGE، وزن مولکولی اکثریت پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از سر ماهی تون زرد باله حدود ۱۲ کیلو دالتون بوده است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، آلکالاز، درجه هیدرولیز، تون زردباله.

* مسوول مکاتبه: nasim_pasdar@yahoo.com

www.SID.ir

۱- مقدمه

با توجه به پیشرفت تکنولوژی، افزایش جمعیت در جهان و افزایش میزان صید فراورده‌های دریایی و به دنبال آن افزایش میزان ضایعات، پژوهشگران به دنبال روش‌هایی برای استخراج مواد با ارزش از ضایعات می‌باشند. برای تبدیل ضایعات ماهی به پروتئین می‌توان از روش‌های هیدرولیز آنزیمی و شیمیایی استفاده نمود. هیدرولیز آنزیمی فرایندی نسبتاً ساده ، موثر و کارا است که مانع از تخریب پروتئین‌ها در اثر واکنش‌های مشابه، می‌شود (۱۰). آنزیم‌های مورد استفاده به منظور هیدرولیز آنزیمی، از منابع مختلف گیاهی (پاپائین) (۲۴) ، جانوری (تریپسین) و میکروبی (آلکالاز) بوده که به طور گسترده مورد استفاده قرارمی گیرند. در مقایسه با سایر آنزیم‌ها بیشترین درجه هیدرولیز مربوط به آنزیم آلکالاز بوده که قادر به انجام هیدرولیز در زمان نسبتاً کوتاه و pH قلیایی می‌باشد (۱۰). پروتئین هیدرولیز شده ماهی منبع غنی از اسید های آمینه ضروری، مواد معدنی و آمین‌های بیوژنیک می‌باشد(۱۷). از جمله کاربرد های پروتئین هیدرولیز شده می‌توان به کاربرد آن به عنوان مکمل‌های پروتئینی ، پایدار کننده نوشیدنی‌ها اشاره کرد (۲۲). این پروتئین‌ها علاوه بر ارزش تغذیه‌ای دارای خواص عملکردی (حلالیت، جذب چربی، ویسکوزیته و ...) نیز می‌باشند که موجب استفاده آن‌ها در مواد غذایی می‌شود. یکی از مهم‌ترین فاکتورهای مورد بررسی در خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیزاسیون بوده که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را نشان می‌دهد(۲۳). بازیافت نیتروژنی، یکی دیگر از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول می‌باشد (۱۵). بسیاری از تحقیقات، اثر آنزیم‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده‌اند، برخی دیگر اثر عوامل مختلف مانند دما، زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و pH را بررسی نموده‌اند. در سال ۲۰۰۰ اثر آنزیم Alcalase بر درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت نیتروژنی پروتئین‌های عضله *Atlantic salmon* در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد و مدت زمان ۱۸۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت(۱۰). به نظر می‌رسد که در تحقیقات انجام شده در شرایط مختلف پروتئین‌ها با میزان بالایی هیدرولیز شدند و نظر به اینکه اندازه وزن مولکولی متفاوت در پروتئین‌ها بر خواص عملکردی آن‌ها تأثیرگذار می‌باشد لذا در تحقیق حاضر پروتئین‌ها در فواصل زمانی مختلف هیدرولیز شدند تا بررسی شود می‌توان در زمان کوتاه‌تر پپتیدهایی با وزن مولکولی بالاتر و خواص عملکردی بهتر داشت. یکی از مهم‌ترین گونه‌های تون ماهیان، ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) می‌باشد که بر اساس آمار رسمی سازمان شیلات ایران، از ۲۰۰ هزار تن صید تون ماهیان در سال، رقمی معادل ۴۱ هزار تن را به خود اختصاص داده است(۷). تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر زمان هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و الگوی الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیز شده در بازه‌های زمانی هیدرولیز(۱۰،۲۰ و ۳۰) دقیقه با آنزیم آلکالاز انجام شده است.

۲- مواد و روش ها

سر ماهی تن زرد باله به عنوان ماده خام اولیه ، از کارخانجات کنسرو تولید ماهی تن در شهرک صنعتی امیر آباد تهیه شد. نمونه‌های تهیه شده، به منظور جلوگیری از فرایند اتولیز آنزیمی و میکروبی ، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد ، تا شروع آزمایش نگه داری گردیدند .

آنزیم مورد استفاده، آنزیم میکروبی آلکالاز بوده که از شرکت Novozymes دانمارک خریداری شد تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. آنزیم آلکالاز(۲/ ۴L) پروتئاز قلیایی است که از باکتری *Bacillus licheniformis* استخراج می‌شود. فعالیت آنزیمی و چگالی آن به ترتیب Au/Kg ۲/۴ و ۱/۸g/ml می باشد

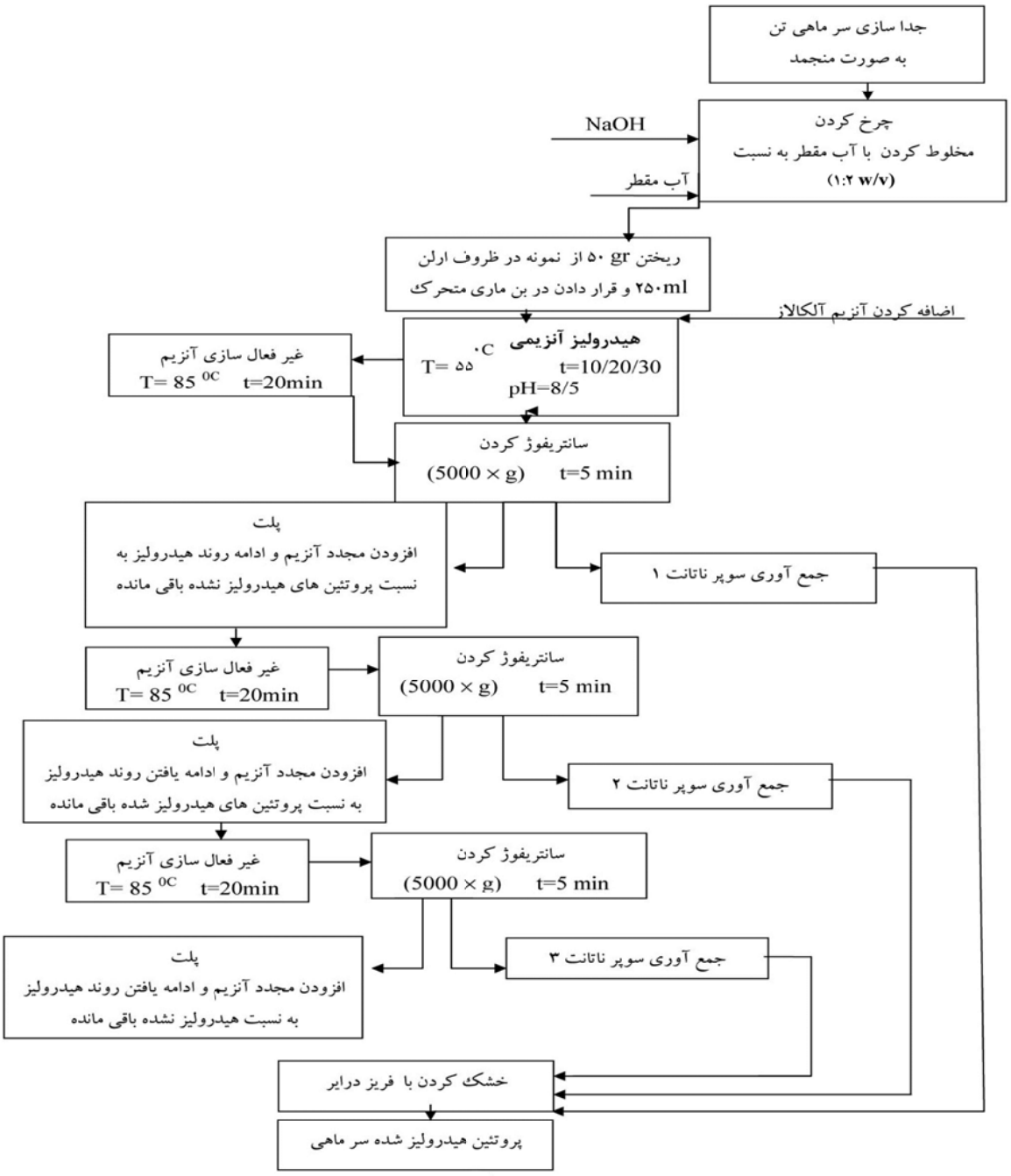
تهیه پروتئین هیدرولیز شده بر اساس مراحل نشان داده شده در شکل ۱ انجام گردید(۱۰،۱۹).

میزان کل پروتئین در مواد خام (N×6.25) به روش کلدال بدست آمد(۱).

برای تعیین غلظت پروتئین محلول و میزان پروتئین خارج شده به صورت درصد هیدرولیز محلول، از روش بیورت استفاده شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد، از پروتئین استاندارد سرم آلبومین استفاده شد. میزان جذب دستگاه اسپکتروفتومتر روی ۵۴۰ نانومتر تنظیم گردید(۱۳).

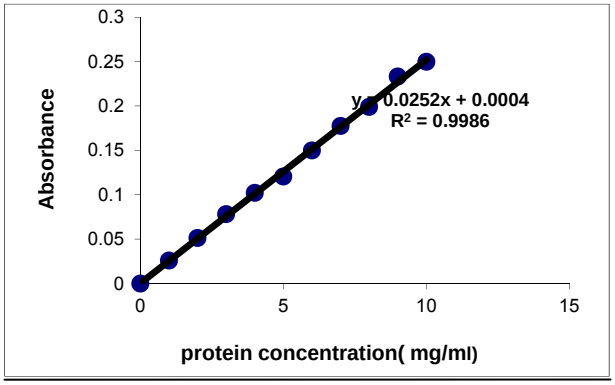
Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- تهیه پروتئین هیدرولیز شده

www.SID.ir



شکل ۲- منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی جهت تعیین میزان پروتئین به روش بیورت

میزان بازیافت پروتئینی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

$$PR\ (\%) = \frac{\text{هیدرولیز شده}}{\text{مقدار پروتئین اولیه}} \times ۱۰۰$$

محاسبه درجه هیدرولیز مطابق روش Kristinsson & (Rasco., 2000) انجام شد. مطابق این روش بعد از انجام هر آزمایش ، محلول ۲۰٪ اسید تری کلرواستیک (TCA) به حجم برابری از محلول حاوی پروتئین هیدرولیز شده اضافه گردید و محلول ۱۰٪ اسید تری کلرواستیک (TCA) بدست آمد و سپس ترکیب فوق تحت سانتریفوژ قرار گرفته و ماده رویی برداشته شد.

درجه هیدرولیزاسیون مطابق فرمول زیر محاسبه گردید :

$$DH\ (\%) = \frac{\text{نیتروژن محلول در نمونه TCA ۱۰٪}}{\text{نیتروژن کل در نمونه}} \times ۱۰۰$$

برای اندازه گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل(PCL) حاصل از هیدرولیز آنزیمی به روش Adler_Nissen از فرمول زیر محاسبه گردید.

$$PCL = 100/DH$$

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز به روش لاملی (۱۹۷۹)انجام شد. غلظت ژل جدا کننده آن نیز (۲۰-۱۵٪) بود (۱۲).

طرح آماری کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین ساده به روش‌های آنالیز واریانس یک‌طرفه و دانکن برای مقایسه صفات مربوط به هیدرولیز در سه فاصله زمانی ۱۰,۲۰,۳۰ دقیقه، هیدرولیز با سه تکرار (سه تیمار و سه تکرار) و آنالیز آماری در سطح معنی دار ۵ درصد (α =۰/۰۵) استفاده شده و نرم افزار مورد استفاده SPSS بود. صفات مورد بررسی شامل : بازیافت نیتروژنی، درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی بودند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه گیری شیمیایی

میزان کل پروتئین در مواد خام در هر ۱۰۰ گرم نمونه (۱ ±۲۲/۷۵) بدست آمد(۱).

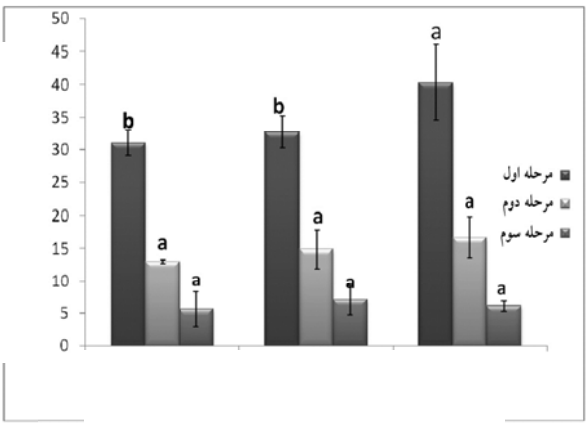
۳-۲- بازیافت نیتروژنی

در شکل۳ کم‌ترین میزان استخراج مربوط به مایع رویی یا سوپرناتانت (پروتئین‌های هیدرولیز شده محلول) مرحله اول هیدرولیز زمان ۱۰ دقیقه با مقدار ۳۱/۰۸٪، و بیشترین میزان استخراج مربوط به مایع رویی مرحله اول زمان ۳۰ دقیقه با میزان ۴۰/۳۳٪، بوده است. در مرحله دوم هیدرولیز میزان بازیافت پروتئین در زمان‌های ۱۰،۲۰،۳۰، به ترتیب ٪۱۲/۹۷، ٪۱۴/۹۰و ٪۱۶/۶۹ درصد بوده است. در مرحله سوم هیدرولیز، بالاترین مقدار راندمان استخراج در مرحله سوم در زمان ۳۰ دقیقه ،۷/۰۶٪ و کم‌ترین مقدار راندمان استخراج در زمان ۱۰ دقیقه ،۵/۶٪ مشاهده شده است. نتایج آنالیز واریانس ساده و دانکن بر بازیافت نیتروژنی نشان می‌دهد که میان سوپرناتانت های مرحله اول زمان ۱۰، ۳۰ و زمان ۲۰، ۳۰ اختلاف معنی دار است ($p < 0.05$). ولی نتایج آنالیز آماری حاکی از عدم وجود اختلاف معنی دار در سایر تیمار ها بوده است ($p > 0.05$).

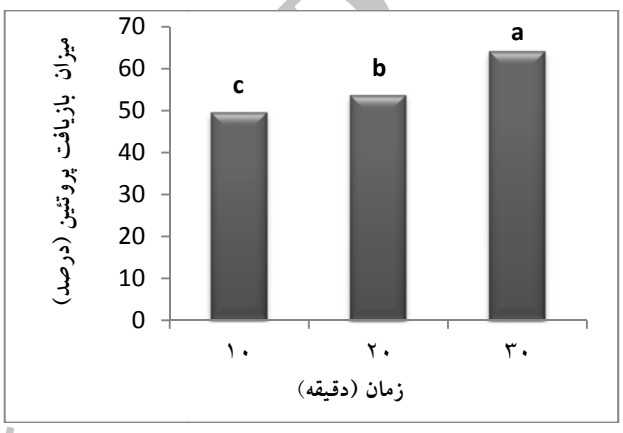
در شکل ۴ با توجه به اینکه بالاترین میزان هیدرولیز و بازیافت پروتئین در بازه زمانی ۳۰ دقیقه با مقدار ۶۴/۱۰٪، دیده می‌شود لذا این زمان بهترین بازه زمانی برای آنزیم آلکالاز تلقی می‌شود و کم‌ترین میزان بازیافت پروتئین در مجموع سه مرحله متوالی هیدرولیز مربوط به زمان ۱۰ دقیقه با میزان ۴۹/۶۶٪، می‌باشد. انجام آزمون(t- test) بر مجموع بازیافت نیتروژنی در سه مرحله هیدرولیز، نشان می‌دهد که اختلاف کاملاً معنی داری میان سه زمان ۳۰/۲۰/۱۰ وجود دارد ($p < 0.01$).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۳- راندمان استحصال پروتئین در سه مرحله متوالی هیدرولیز



شکل ٤ -مقایسه میان میزان کل بازیافت پروتئین در سه مرحله متوالی هیدرولیز

در مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۴ ، دامنه استحصال پروتئین در ماهی آزاد و ماهی کاد هیدرولیز شده با آنزیم نیوتراز در محدوده ۶۲-۵۳٪ بوده است. میزان بازیافت پروتئین در هیدرولیز انجام شده توسط آنزیم آلکالاز در ماهیان مختلف بین ۶۰ تا ۷۰ درصد گزارش شده است (۱۵،۳).

با افزایش زمان هیدرولیز، از (۱۰ به ۳۰ دقیقه)، روند هیدرولیز نیز افزایش می‌یابد. بر اساس نتایج یدست آمده ، با افزایش زمان در ابتدای واکنش، بازیافت پروتئین به سرعت افزایش می‌یابد اما در زمان‌های طولانی‌تر بازیافت پروتئین تقریباً شیب ثابتی پیدا می‌کند و با گذشت زمان، روند کاهشی به خود گرفته که احتمالاً علت آن کاهش غلظت سوبسترا می‌باشد. از دلایل دیگر نیز می‌توان به کاهش فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم و همچنین شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند اشاره کرد (۱۴).

نتایج بدست آمده مشابه با نتایج Damrongsakkul و همکاران بوده است. در واقع سینیتیک بازیافت پروتئین در طی هیدرولیز آنزیمی به دو قسمت تقسیم می‌شود یک واکنش اولیه سریع که در آن زنجیره‌های پلی پپتیدی با باندهای ضعیف از ذرات پروتئینی نا محلول جدا می‌شوند و یک واکنش آهسته‌تر که در آن پروتئین‌های مرکزی زنجیره شکسته می‌شوند بنابر این کل بازیافت پروتئین مربوط به کاهش فعالیت آنزیمی، اشباعیت سوبسترا یا بازداری محصول می‌باشد(۱۴).

در بررسی انجام شده توسط Ovissipour در سال 2009 مشخص گردید که کاهش روند هیدرولیز با افزایش زمان می‌تواند به دلیل کاهش تعداد باند های پپتیدی در دسترس برای هیدرولیز باشد(۲۰).

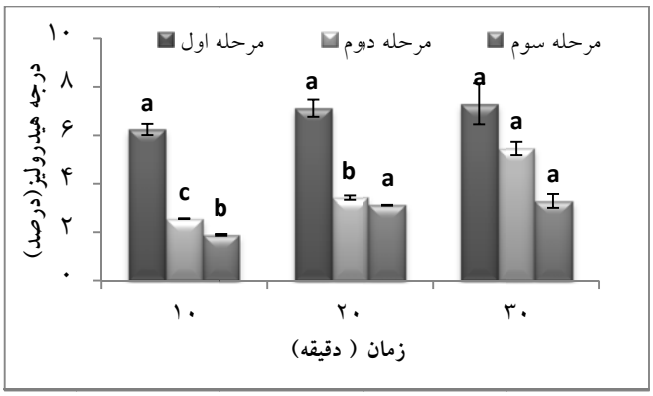
۳-۳-درجه هیدرولیز

همان‌طور که در شکل ۵ مشخص می‌باشد نتایج آنالیز واریانس ساده و دانکن بر درجه هیدرولیزاسیون سه زمان ۱۰،۲۰،۳۰ نشان دهنده آن است که اختلاف کاملاً معنی داری مابین سوپرناتانت های مرحله دوم زمان های ۳۰و ۲۰، ۱۰ وجود دارد ($p<0.01$). همچنین میان سوپرناتانت های مرحله سوم زمان (۱۰، ۳۰) و زمان (۱۰، ۲۰) نیز اختلاف کاملاً معنی دار است ($p<0.01$). بیشترین درجه هیدرولیز در مرحله اول هیدرولیز در زمان ۳۰ دقیقه با مقدار ۷/۳۰ و کم‌ترین درجه هیدرولیز با مقدار۶/۲۴ در زمان ۱۰ دقیقه دیده می‌شود. میزان درجه هیدرولیزاسیون در مرحله دوم هیدرولیز در زمان‌های ۱۰،۲۰،۳۰ دقیقه به ترتیب ۲/۵۶، ۳/۴۳، ۵/۴۶ و در مرحله سوم هیدرولیز به ترتیب ۱/۸۹، ۳/۱۱، ۳/۲۹ درصد بوده است .

به طور کلی انجام آزمون (t-test) بر روی درجه هیدرولیزاسیون میان مرحله اول، دوم و سوم زمان ۱۰ دقیقه نشان می‌دهد که میان مراحل هیدرولیز این زمان اختلاف معنی دار وجود دارد. همچنین میان مراحل اول تا سوم زمان ۲۰ دقیقه و مراحل اول تا سوم زمان ۳۰ دقیقه اختلاف معنی داری مشاهده شد($P<0.05$). با افزایش زمان هیدرولیز، از ۱۰ به ۳۰ دقیقه درجه هیدرولیز افزایش پیدا می‌کند در واقع می‌توان گفت با افزایش زمان هیدرولیز، آنزیم و سوبسترا در مدت زمان بیشتری در مجاورت هم قرار داشته و شدت هیدرولیز بیشتر می‌شود اما با گذشت بیش از حد زمان روند هیدرولیز کاهش پیدا می‌کند (۲۴).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۵ - درجه هیدرولیز پروتئین در سه مرحله متوالی هیدرولیز

در واقع بخشی از پروتئین‌های هیدرولیز شده محلول در طول فاز اولیه، هیدرولیز شده اما پس از مدتی غلظت زیاد پپتیدهای محلول در مخلوط واکنش، سرعت هیدرولیز را کاهش می‌دهد(۲۴). احتمالاً علت آن مربوط به کاهش فعالیت آنزیمی و اشباعیت سوبسترا باشد(۶). مطالعه انجام شده در سال ۲۰۰۰ نشان می‌دهد که افزایش زمان هیدرولیز از ۶۰ دقیقه به ۱۲۰ دقیقه باعث افزایش درجه هیدرولیز ماهی سالمون با استفاده از آنزیم آلکالاز می‌گردد که درجه هیدرولیز آن به ترتیب ۱۸/۸و ۲۰/۰۲ بود(۱۴) که با نتایج تحقیق ما مطابقت داشت.

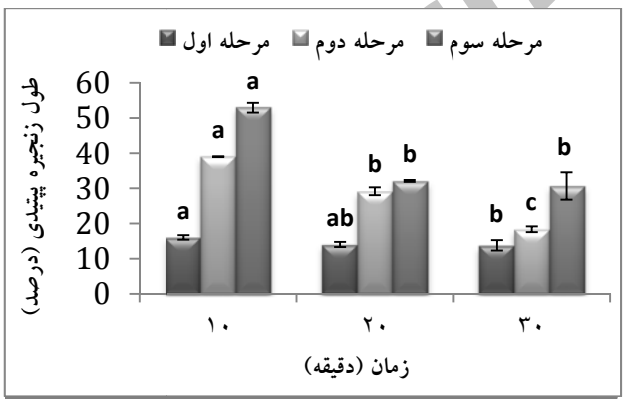
در تحقیقی در سال ۲۰۰۵ که بر روی کنسانتره محلول ماهی توسط دو آنزیم فلاورزیم و کوجیزیم انجام گرفت بیشترین ضریب رگرسیون در میان متغیرهای خطی مربوط به زمان بود و تأثیر متقابل آنزیم فلاورزیم و زمان معنی دار بود و در آنزیم کوجیزیم اثر متقابل بین هیچ‌کدام از متغیرها معنی دار نبود و نتایج بدست آمده نشان داد که درجه هیدرولیز با افزایش زمان افزایش می‌یابد. بالاترین مقدار درجه هیدرولیز ۶۲٪ و در شرایط بهینه دمایی $45\ ^oC$ و زمان ۶ ساعت و غلظت آنزیمی ۵۰ LAPu/gr برای آنزیم فلاورزیم، درجه هیدرولیز ۶۸٪ و شرایط بهینه دمایی $50\ ^oC$ و زمان ۶ ساعت و غلظت آنزیمی ۴۰ LAP/gr برای آنزیم کوجیزیم گزارش شد (۱۹).

۳-٤- طول زنجیره پپتیدی

نتایج تحقیق حاضر نشان دهنده آنست که بسته به شرایط هیدرولیز، مقدار طول زنجیره پپتیدی در محدوده (۵۲/۹٪- ۱۳/۷). تغییر می‌کند که با گزارشات بدست آمده از وزن مولکولی حدود ۱۲ کیلو دالتون مطابقت دارد. بالاترین طول زنجیره پپتیدی در کم‌ترین زمان مشاهده می‌گردد به طوری که حداکثر میزان آن در مرحله اول هیدرولیز مربوط به زمان ۱۰ دقیقه ،۱۶٪ و حداقل میزان آن در زمان ۳۰ دقیقه ،۱۳/۷٪ مشاهده شد. میزان طول زنجیره پپتیدی در مرحله دوم هیدرولیز در زمان‌های ۱۰،۲۰،۳۰ به ترتیب ۱۸/۳ ،۲۹/۱ ،۳۹ درصد بوده است. مرحله سوم هیدرولیز در مقایسه با مرحله اول و دوم دارای بالاترین طول زنجیره پپتیدی بود به طوری که به ترتیب زمان‌های ۱۰،۲۰،۳۰ دقیقه با میزان ۵۲/۹، ۳۰/۳۲،۶/۱ بوده است. در شکل۶ نتایج آنالیز واریانس ساده و دانکن بر طول زنجیره پپتیدی در هیدرولیز سه زمان ۱۰،۲۰،۳۰ نشان دهنده آن است که میان سوپرناتانت های مرحله اول زمان (۳۰و۱۰) اختلاف معناداری وجود دارد ($p<0.05$). در مرحله دوم میان سوپرناتانت های هر سه زمان اختلاف کاملاً معنی دار است ($P<0.01$). همچنین میان سوپرناتانت های مرحله سوم زمان (۱۰، ۳۰) نیز اختلاف کاملاً معنی دار است ($p<0.01$).

به طور کلی انجام آزمون (t-test) بر روی طول زنجیره پپتیدی مرحله اول، دوم و سوم هیدرولیز در هر یک از سه زمان نشان می‌دهد که میان آن‌ها اختلاف معناداری وجود دارد ($p <0.05$).

در مرحله اول و دوم هیدرولیز با افزایش زمان از(۱۰ به ۳۰) طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. در مرحله سوم هیدرولیز با افزایش زمان از (۱۰ به ۲۰) طول زنجیره پپتیدی کاهش و در زمان ۳۰ تقریباً به روند ثابتی رسیده است.



شکل ٦- طول زنجیره پپتیدی در سه مرحله متوالی هیدرولیز

در مرحله سوم هیدرولیز نسبت به مرحله دوم و اول در هر سه زمان، میزان طول زنجیره پپتیدی افزایش یافته است. سرعت شکستن مولکول پروتئین و کاهش اندازه مولکول‌ها در مراحل ابتدایی واکنش زیاد است که نشان می‌دهد بخش اصلی عملکرد آنزیم در سیستم پروتئینی در این فاصله زمانی اتفاق می‌افتد.

Archive of SID

www.SID.ir

با افزایش زمان طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد و اگر زمان از دامنه خاصی بیشتر شود طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد. به نظر می‌رسد در طول فاز اولیه هیدرولیز بخشی از پروتئین‌های اولیه هیدرولیز شده و طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد اما با گذشت زمان غلظت زیاد این پپتیدها در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می‌دهد .

معتمد زادگان و همکاران در سال ۱۳۸۸ با بررسی اثر آنزیم پاپائین بر میانگین تقریبی طول زنجیر پپتیدی حاصل از هیدرولیز ماهی کیلکا نشان دادند که این صفت تحت تأثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می‌باشد.

در یک پژوهش انجام شده در سال ۲۰۰۲ با هیدرولیز اسکلت ماهی کاد توسط ۵ نوع آنزیم آلکالاز باکتریایی، نیوتراز، پروتامکس، تریپسین خوک و تریپسین کاد مشخص گردید که پروتئازهای باکتریایی راندمان بیشتری در محلول سازی پروتئین‌ها داشته و اندازه مولکولی پپتیدهای به دست آمده کوچک‌تر می‌باشد ولی تا حدی طعم تلخ غالب می‌گردد. هیدرولیزهای بدست آمده به دلیل کاهش وزن مولکولی معمولاً ضریب هضم و جذب بالاتری نسبت به پروتئین اولیه دارند(۸).

طول زنجیره پپتیدی و درجه هیدرولیز به میزان هیدرولیز و شرایط هیدرولیز به لحاظ غلظت آنزیمی و نوع سوبسترای پروتئینی بستگی دارند بنابراین شرایط اپتیمم هیدرولیز سوبستراهای مختلف، متفاوت بوده و به سوبسترای بکار برده شده ، میزان و فعالیت پروتئازهای داخلی موجود بستگی دارد(۱۱).

۳-۵- وزن مولکولی

در این تحقیق به منظور کنترل وزن مولکولی پروتئین‌ها، در هر بازه زمانی، هیدرولیز در ۳ مرحله متوالی(با زمان‌های مشابه) انجام گردید. الگوی الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تون زرد باله نشان دادکه وزن مولکولی در اکثر نمونه‌ها در حدود ۱۲ کیلو دالتون بوده است. آن دسته از پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تون زرد باله که دارای وزن مولکولی کمتری هستند می‌توانند به عنوان منبع نیتروژن در محیط‌های کشت میکروبی مورد استفاده قرار گرفته و پروتئین‌های هیدرولیز شده با وزن مولکولی بالاتر که دارای خواص عملکردی بالاتری هستند، می‌توانند در مواد غذایی کاربرد داشته باشند.

وزن مولکولی اکثریت پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی تون زرد باله (۱۲) کیلودالتون است و این مطالعه با نتایج تحقیقاتی که توسط Benjakul و Morrissey , Kristinsson و Rasco انجام گرفت مطابقت ندارد. تحقیقی که در سال۲۰۰۰ بر پروتئین‌های ماهی آتلانتیک سالمون (*Salmo Salar*) با استفاده از پروتئازهای قلیایی انجام گرفت. وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده در درجات مختلف هیدرولیز بررسی شد. بر اساس الگوی الکتروفورز، پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای ترکیب پپتیدی مختلف درpH های مختلف بوده و حداکثر اندازه پپتیدها تقریباً ۲۰ کیلودالتون بود(۱۰). این تحقیق با نتایج این مطالعه که وزن مولکولی بدست آمده بالای ۱۰KDA می‌باشد، مطابقت دارد.

٤- نتیجه گیری

پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تون زردباله در مقادیر بحرانی در شرایط متفاوت برای بدست آوردنPCL, PR, DH % بهینه مورد مطالعه قرار گرفتند. مقادیر زمان به طور معنی داری بر روی PCL, PR, DH تأثیر داشتند و مقادیر بهینه برای درجه هیدرولیز ،بازیافت پروتئین و طول زنجیره پپتیدی به ترتیب در مقادیر آنزیمی ۳۵Au/Kg، دمای ۵۵درجه سانتی‌گراد و سه مرحله متوالی زمان (۱۰،۲۰،۳۰ دقیقه) بدست آمد.

درصد پروتئین در سوبسترای هیدرولیز شده نسبتاً بالا بوده است. با افزایش زمان از ۱۰ به ۳۰ دقیقه میزان راندمان استحصال پروتئین، درجه هیدرولیز افزایش و طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد اما با افزایش بیش از حد زمان عکس حالت ذکر شده اتفاق می‌افتد. به طوری که با افزایش مراحل هیدرولیز به طور مجزا در هر سه زمان ، میزان راندمان استحصال پروتئین، درجه هیدرولیز کاهش و طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد. همچنین از آنزیم‌های پروتئازی نیز می‌توان به منظور هیدرولیز ضایعات ، به عنوان سوبسترای آنزیمی استفاده نموده و آن‌ها را به پروتئین‌هایی با ویژگی‌های کاربردی تبدیل نمود و با توجه به این که وزن مولکولی برخی از پروتئین‌های هیدرولیز شده حدود (۱۲ کیلو دالتون) بوده و دارای خواص عملکردی نسبتاً خوبی می‌باشند، لذا می‌توانند در برخی از مواد غذایی قابل کاربرد باشند.

Archive of SID

www.SID.ir

۵- منابع

1-AOAC 2002. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

2-Alder-Nissen, J.1984. Control of the proteolytic reaction and of the level of bitterness in protein hydrolysis process. *Technology and Biotechnology*, 34B: 215–222.

3-Benjakul, B. and Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J. Agric.Food Chem*, 61(1/2): 131-138.

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

5-Damrongsakkul, S. Ratanathammapan, K. Komolpis, K. and Tauthapanichakoon,W .2008. Enzymatic hydrolysis of rawhide using papain and neutrase. *Journal of Industrial and Engineering chemistry*, 14: 202-206.

6- Diniz, F. M. and Martin, A. M. 1997. Effect of the extent enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. Lebensmittel *Wissenschaft und Technologie*, 30(3) :266-272.

7-FAO, 2010. Statics, Fisheries and Aquaculture Statics, Tuna global caches by Stocks. From www.fao.org, online.

8-Gildberg, A. 2002. Enhancing return from greater untilization. In:Bremner,H.A.(Ed), Safety and Quality Issues in Fish Prossing.Wood Head Publ. Ltd and CRC press.Cambridge:425-449

9-Guerard, F. Guimas, L. and Binet, A. 2002. Prouction of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation, *Jorunal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*:489-498

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

11-Kristinsson, H.G. Rasco, B.A. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (Salmo salar) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. *J Agric Food Chem.* 48: 657–666.

12-Laemmli, uk.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacterio phage T4. *Nature*, 227(259) : 680-5

13-Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Meth Enzymol. Academic press, Ind, New York, 3:450.

14-Liaset, B. Lied, E. and Espe, M. 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry, chemical characterization and nutritional evaluation. *J. Sci. Food Agric*, 80: 581–589.

15- Liaset, B. Nortvedt, R. Lied, E. and Espe, M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry,* 37: 1263–1269.

16- Liaset, B. Julshamn, K. and Espe, M. 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzamatic hydroylis of salmon frames with Protamex. Process Biochem, 30: 1-13.

17-Liaset, B. and Espe, M. 2008. Nutritional composition of soluble and insouloble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. Process Biochemistry, 43: 42-48.

18-Mutilangi, W.A.M. Panyam, D. and Kilara, A. 1995. Hydrolysates from proteolysis of hear-denatured why proteins. *Journal of Food Science,* 60: 1104-1109.

19-Nilsang, S. Lertsiri, S. Suphantharika, M. and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysates : production, biochemical, and functional, properties. *Journal of Food Engineering*, 70: 571-578.

20- Ovissipour, M. Abedian, A M. Motamedzadegan, A. Rasco, B. Safari, R. and Shahiri, H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *J. Food Chem.* 115: 238-242.

21-Ovissipour M. Safari R. Motamedzadegan A. and Shabanpour B. 2009b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, DOI 10.1007/ s11947-009-0284-x.

22- Petersen, R.B. 1981. The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of proteins. In enzymes and food processing. Brich GG, Blakebrough N, 91-Parker KJ, Eds. Applied Sci Pub Ltd. London:149.

23-Pigott, M. and Tucker, B.W. 1990. Seafood effects of technology on nutrition. Marcel Dekker INC. New York.

24- Shahidi, F. Han, X. Q. and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus). *Food Chemistry*, 53: 285-293.

Archive of SID

www.SID.ir