Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

تولید پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) با استفاده از آنزیم آلکالاز

ماهرخ نعمتی[۱]
سید روح ا... جوادیان[۲*]
مجتبی کشاورز[۳]

۱، ۲ و ۳. گروه شیلات، قائم‌شهر، دانشگاه آزاد اسلامی، قائم‌شهر، ایران

***مسئول مکاتبات:**
ro.javadian@gmail.com

کد مقاله: ۱۳۹۸۰۳۰۴۳۶
تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۱۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۰۷/۲۸
این مقاله برگرفته از طرح پژوهشی است.

چکیده

در تحقیق حاضر پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات (سر، پوست، امعاء و احشاء) ماهی زالون (*Alosa caspia*) گونه *Clupeonella* در دریای خزر تولید شد (۱۳۹۴). پروتئین هیدرولیز در سه زمان مختلف (۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه)، با استفاده از آنزیم تجاری آلکالاز در pH ۸/۵ (pH بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز) و با نسبت آنزیم به سوبسترای نمونه اولیه (۱ به ۱۰۰)، در درجه حرارت ۵۰ درجه سانتی گراد تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده در زمان ۶۰ دقیقه به‌صورت معنی‌داری ازلحاظ میزان بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده بود ($P<۰/۰۵$). میزان پروتئین و چربی به ترتیب ۷۸/۹۱ و ۰/۰۹ درصد بودند. شاخص شیمیایی نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده، به‌خوبی می‌توانند نیاز یک انسان بالغ به اسیدهای آمینه را مرتفع سازد. همچنین نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین‌ها نیز حاکی از بالا بودن ارزش غذایی آن‌ها بود. با توجه به ارزش غذایی بالا، می‌توان کاربرد آن را در جیره غذایی آبزیان توصیه نمود.

واژگان کلیدی: ماهی زالون، هیدرولیز آنزیمی، آنزیم آلکالاز، ارزش غذایی.

مقدمه

امروزه، مقدار زیادی از مواد جانبی صنایع فرآوری غذاهای دریایی که منبع غنی از پروتئین هستند، بدون هیچ‌گونه توجهی به توانایی بازیافت پروتئین، دور ریخته می‌شوند. در همین حال، اکثر صنایع فرآوری آبزیان، مجبور به پرداخت هزینه بالا برای پالایش آن می‌باشند، بنابراین یافتن یک روش به‌عنوان جایگزین برای دور ریختن این مواد امری ضروری است (Kristinsson and Rasco, 2000a). امعاء و احشاء ماهیان که یکی از مهم‌ترین ضایعات آن‌ها می‌باشند، سرشار از اسیدهای چرب غیراشباع و پروتئین می‌باشد و به‌شدت فسادپذیر می‌باشند (Raa and Gildberg, 1982). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو احسن مورداستفاده قرار گیرند، از یک سمت سبب کاهش آلودگی زیست‌محیطی ناشی از دور ریختن آن‌ها شده و از سوی دیگر تولید محصولاتی باارزش افزوده بالا را به دنبال خواهند داشت (اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷). شاید بتوان اذعان نمود که بهترین راه برای تولید محصولات باارزش افزوده بالا از این مواد خام کم‌ارزش، کاربرد آنزیم‌های پروتئاز به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد (Kristinsson and Rasco, 2000a). هدف اصلی هیدرولیز ضایعات ماهی، به دست آوردن حداکثر بازیافت اجزای قابل‌دسترس با حفظ کیفیت بالا در آن‌هاست (Bhaskar *et al.*, 2008).

یکی از فاکتورهای تعیین‌کننده و مهم در هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های تجاری، انتخاب آنزیم پروتئاز می‌باشد. انواع مختلفی از آنزیم‌های تجاری وجود دارد که به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای هیدرولیز پروتئین ماهی و سایر مواد غذایی مورداستفاده قرارگرفته است. آنزیم‌های که برای هیدرولیز پروتئین‌های ماهی مورداستفاده قرار می‌گیرند، حداقل باید دارای یک ویژگی مشترک بوده، یعنی از ارزش غذایی برخوردار باشند و اگر منشأ میکروبی دارند، ارگانیزم تولیدکننده آن‌ها باید غیر بیماری‌زا باشد (Bhaskar *et al.*, 2008، اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷). در هیدرولیز پروتئین شرایطی از قبیل pH، دما، زمان هیدرولیز و فعالیت آنزیمی بر عملکرد آنزیم مؤثر است (Taheri *et al*, 2012؛ خواجوی و همکاران، ۱۳۹۵).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

آنزیم آلکالاز، یک آنزیم مایع به رنگ قهوه‌ای تیره است که اندوپروتئیناز می‌باشد که از باکتری *Bacillus licheniformis* جداسازی می‌شود و توسط بسیاری از محققین بارها مورداستفاده قرارگرفته و اثر مفید آن ثابت‌شده است (Ovissipour *et al.*, 2009c). به‌طوری‌که یکی از مهم‌ترین آنزیم‌ها برای تهیه پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد (Hoyle and Merritt, 1994; Benjakul and Morrisey, 1997; Kristinsson and Rasco, 2000 a,b; Ovissipour *et al*, 2009 a, b;2010, 2012). بر اساس آمار رسمی سازمان شیلات ایران، میزان صید سالیانه در سال ۱۳۸۷ بالغبر ۵۸۰ هزار تن بوده که با احتساب ۲۵ درصد وزن بدن به‌عنوان امعاء و احشاء، می‌توان میزان ۱۴۵ هزار تن امعاء و احشاء در سال را انتظار داشت، که رقم قابل‌توجهی از مواد دورریختنی باقابلیت بازیافت بالا می‌باشند.

اخیراً، مطالعات مختلفی در مورداستفاده از باقی‌مانده ماده خام گونه‌های مختلف ماهی با هیدرولیز آنزیمی برای بازیابی ترکیبات ارزشمند انجام‌شده است.

اویسی پور و همکاران (۱۳۸۹) اثر سه آنزیم آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم روی هیدرولیز ضایعات ماهی تون زردباله موردبررسی قراردادند نتایج آن‌ها نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به‌صورت معنی‌داری ازلحاظ میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده بود. ترکیب اسیدهای آمینه نیز نشان داد که پروتئین‌ها هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف دارای ترکیب نسبتاً مشابهی بودند و همچنین نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین‌ها نیز حاکی از تشابه آن‌ها و بالا بودن ارزش غذایی بود. شاخص شیمیایی نشان داد که هر سه پروتئین هیدرولیز شده، به‌خوبی می‌توانند نیاز یک انسان بالغ به اسیدهای آمینه را مرتفع سازند. با توجه به نتایج ، آن‌ها آنزیم آلکالاز را نسبت به دو آنزیم دیگر، ارجح دانستند.

مهرگان نیکو و همکاران (۱۳۹۲) بررسی اثر شرایط هیدرولیز شامل اثر متغیرهای دما (۴۰، ۴۵، ۵۰ و ۵۵ درجه سانتی گراد) زمان (۶۰، ۹۰، ۱۲۰، ۱۵۰، ۱۸۰ و ۲۱۰ دقیقه) نسبت آنزیم (آلکالاز) به سوبسترا (۳۰، ۶۰ و ۹۰ واحد آنسون بر کیلوگرم پروتئین) بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس پرداختند. آن‌ها اعلام نمودند بیشترین فعالیت مهار رادیکال آزاد DPPH در زمان هیدرولیز ۱۵۰ دقیقه و نسبت آنزیم ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم برابر با ۵۷/۵ درصد به دست آمد. بالاترین فعالیت مهارکنندگی یون آهن که در دما و فعالیت آنزیمی به ترتیب ۴۵ درجه سانتی‌گراد و ۶۰ واحد آنسون بر کیلوگرم و در زمان هیدرولیز ۱۸۰ دقیقه به میزان ۴۴/۵۶ درصد حاصل شد. بالاترین قدرت احیاکنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده در زمان هیدرولیز ۱۲۰ دقیقه، به دست آمد که در مقایسه با اسید آسکوربیک ۱۰۰ قسمت در میلیون (۱۰۰ درصد)، ۶۷/۳۲ درصد قدرت احیاکنندگی از خود نشان داد.

ماهی زالون (*Alosa caspia*) گونه‌ای چرب باارزش تغذیه‌ای بالا، کم‌مصرف و دارای قیمت پایین می‌باشد که می‌تواند یکی از منابع تهیه ماده خام اولیه محصولات شیلاتی باشد (گوگ، ۱۳۹۱).

با توجه به مطالب بیان‌شده تحقیق حاضر باهدف بررسی اثر آنزیم آلکالاز بر درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی، طول زنجیره پپتیدی، ترکیب اسیدآمینه، نرخ کارایی پروتئین و شاخص‌های شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون انجام شد.

مواد و روش‌ها

ماده خام اولیه و آنزیم: ماهی زالون (*Alosa caspia*) با میانگین وزنی ۳۵±۳۰۰، از سواحل جنوبی دریایی خزر (زمستان ۱۳۹۴) صید شد و با ظروف یونولیتی و رعایت شرایط صحیح به آزمایشگاه شرکت کاسپین زیست فن‌آوران، مستقر در مرکز رشد واحدهای فن‌آوری طبرستان واقع در شهرستان ساری منتقل گردید و بلافاصله پس از تخلیه شکمی، پوست و سر ماهی جدا شد و با دستگاه چرخ‌گوشت صنعتی کاملاً چرخ شد. سپس مقداری از نمونه‌ها چرخ شده و به‌منظور تعیین ترکیب شیمیایی برداشته شد و مابقی در بسته‌های پلاستیکی به‌صورت ۵۰ گرمی بسته‌بندی گردید

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

و در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و تا شروع آزمایش در همین حالت نگه‌داری شدند. برای انجام آزمایش نمونه‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت یک شبانه‌روز انجماد زدایی گردیدند. آنزیم آلکالاز از شرکت کاسپین زیست فناوران، نمایندگی شرکت نووازیم (دانمارک) در ایران تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

تولید پروتئین هیدرولیز شده: ۵۰ گرم نمونه پس از خروج از یخچال و انجماد زدایی، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی‌لیتری ریخته شد و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با درجه حرارت ۸۵ درجه سانتی‌گراد به‌منظور غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی قرار داده شد (Guerard *et al.*, 2002). سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH ۸/۵ که pH بهینه فعالیت آنزیم آلکالاز است، رسانیده شد (اویسی پور و همکاران، ۱۳۸۹). نمونه‌ها در حمام آبی متحرک در دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و پس از هر بار نمونه‌گیری (زمان ۱۵ و ۳۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان ۶۰ دقیقه) به‌منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند (Bhaskar *et al.*, 2008). پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفوژ با دور ثابت ۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ شد، مایع شناور جمع‌آوری شد و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد و سپس با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی (FDU-7012, South Korea Operon) به‌صورت پودر درآمد (Guerard *et al.*, 2002).

برای تعیین چربی از روش (AOAC, 2002) استفاده شد. میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت (Layne, 1957) تعیین شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی استفاده شد. قرائت در طول‌موج ۵۴۰ نانومتر به‌وسیله اسپکتروفتومتر مدل T80 ساخت کشور انگلستان انجام شد.

درجه هیدرولیزاسیون بر اساس میزان α آمینواسید در میزان پروتئین نمونه محاسبه شد (Taylor, 1957).

برای اندازه‌گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم موردنظر از روش Alder- Nissen و Olsen (۱۹۷۹) رابطه ۱ استفاده شد.

رابطه ۱: طول زنجیره پپتیدی = ۱۰۰/ درجه هیدرولیزاسیون

در تحقیق حاضر میزان بازیافت پروتئینی از رابطه ۲ محاسبه گردید (Ovissipour *et al.*, 2009a, b; 2010; 2012).

رابطه ۲: بازیافت پروتئینی = (میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیزشده / میزان پروتئین موجود در نمونه) ×۱۰۰

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شدند (اویسی پور و همکاران ۱۳۸۹). سپس با استفاده از فنیل ایزو تیو سیانات (PITC) عمل مشتق سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line (آلمان) با استفاده از ستون C_{18} با آشکار ساز فلورسنت (RF-530) انجام شد.

شاخص شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Bhaskar و همکاران (2008) و Ovissipour و همکاران (2009a, b; 2010) به‌طور خلاصه بر طبق معادله زیر محاسبه گردید. بر اساس این روش، اسیدهای آمینه‌ای موردبررسی قرار می‌گیرند که احتمال کمبود آن‌ها در اکثر رژیم‌های غذایی انسان بیشتر است (رابطه ۳).

رابطه ۳: شاخص شیمیایی = اسید امینه ضروری در پروتئین نمونه /اسیدآمینه ضروری در پروتئین استاندارد × ۱۰۰

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

ضریب کارایی پروتئین بر طبق معادله Alsmeyer و همکاران (۱۹۷۴) که توسط Lee و همکاران (۱۹۷۸) و Shahidi و همکاران (1995) محاسبه گردید این معادلات در جدول ۴ ارائه‌شده است.

تجزیه‌وتحلیل آماری : به‌منظور مقایسه خصوصیات پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های مورد آزمایش، از آنالیز واریانس یک‌طرفه و آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد. نرم‌افزار آماری SPSS (Release 16.0) برای آنالیز آماری و Excel برای رسم شکل استفاده شد.

نتایج

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز در جدول ۱ ارائه‌شده است.

جدول ۱: ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) (سال ۱۳۹٤). [۱و۲]

ماده	پروتئین (٪)	چربی(٪)
ماده خام	۱۳/۰±۵۳/۴۵[b]	۸/۱±۲۶/۴۳[a]
پروتئین هیدرولیز شده	۷۸/۱±۹۱/۲۵[a]	۰/۹۷±۰/۰۹[b]

۱) همه اعداد بر مبنای وزن خشک نمونه بیان‌شده است (انحراف از معیار ± میانگین).

۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند.

نتایج مربوط به درجه هیدرولیزاسیون نشان داد (جدول ۲) که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیزاسیون به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<۰/۰۵$) به‌طوری‌که بالاترین میزان آن در تیمار ۶۰ دقیقه (۲۱/۰۷) مشاهده گردید.

نتایج مربوط به طول زنجیره پپتیدی (جدول ۲) نشان می‌دهد به‌طورکلی با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، طول زنجیره به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ($P<۰/۰۵$). نتایج مربوط به بازیافت پروتئینی نشان داد (جدول ۲) که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی به‌طور معنی‌داری افزایش می‌یابد ($P<۰/۰۵$) به‌طوری‌که بالاترین میزان آن در تیمار ۶۰ دقیقه (۸۰/۴۲) مشاهده گردید.

۳ تیمار در این پژوهش موردمطالعه قرارگرفته است به شرح ذیل:

۱–هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی زالون توسط آنزیم آلکالاز به مدت ۱۵ دقیقه

۲–هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی زالون توسط آنزیم آلکالاز به مدت ۳۰ دقیقه

۳–هیدرولیز آنزیمی ضایعات ماهی زالون توسط آنزیم آلکالاز به مدت ۶۰ دقیقه

نتایج مربوط به ترکیب اسیدآمینه در جدول ۳ ارائه‌شده است. نسبت اسیدآمینه ضروری به غیرضروری ۱/۲۲ است و میزان اسیدآمینه ضروری به‌کل اسیدآمینه موجود ۵۴/۹۹ است. نتایج مربوط به شاخص‌های شیمیایی نیز در جدول ۳ ارائه‌شده است. نتایج نشان می‌دهد پروتئین هیدرولیز شده نیازهای یک انسان بالغ را برطرف می‌کند.

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

جدول ۲: درجه هیدرولیز، طول زنجیره پپتیدی و بازیافت پروتئینی، پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) (سال ۱۳۹٤). [۱و۲].

زمان هیدرولیز(دقیقه)	درجه هیدرولیز	طول زنجیره پپتیدی	بازیافت پروتئینی
۱۵	۱۷/۰±۴۳/۵۸^{c}	۵/۰±۷۴/۲۰^{a}	۶۶/۰±۱۲/۹۲^{c}
۳۰	۱۹/۰±۹۹/۲۶^{b}	۵/۰±۰۰/۰۹^{b}	۷۲/۱±۴۲/۴۸^{b}
۶۰	۲۱/۰±۰۷/۱۹^{a}	۴/۰±۷۴/۰۷^{c}	۸۰/۲±۴۲/۱۱^{a}

۱) همه اعداد برحسب درصد بیان‌شده است (انحراف از معیار ± میانگین).

۲) اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی‌دار دارند.

جدول۳: ترکیب اسیدآمینه موجود و شاخص‌های شیمیایی در پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) (سال ۱۳۹٤).

اسیدآمینه	میزان(گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	شاخص شیمیایی			
	پروتئین هیدرولیز شده	پروتئین مرجع[۳]	پروتئین مرجع[۴]	پروتئین [۵]	پروتئین[۶]
هیستدین[۱و۲]	۱۳/۴۸	۱/۶	۲/۱	۸/۴۳	۶/۴۲
ایزو لوسین[۱]	۴/۱۴	۱/۳	۲/۵	۳/۱۹	۱/۶۶
لوسین[۱]	۵/۶۹	۱/۹	۳/۳	۳/۰۰	۱/۷۳
لایزین[۱]	۴/۷۰	۱/۶	۵/۷	۲/۹۴	۰/۸۲
متیونین[۱]	۲/۵۳	۱/۷	۳/۱	۱/۴۹	۰/۸۲
فنیل آلانین[۱]	۲/۵۷	–	۶/۵	–	۰/۴۰
ترئونین[۱]	۳/۸۵	۰/۹	۳/۹	۴/۲۸	۰/۹۹
آرژنین[۱]	۸/۸۷	–	۱/۳۱	–	۶/۷۷
والین[۱]	۶/۵۹	۱/۳	۳/۶	۵/۱۴	۱/۸۶
تیروزین	۱/۶۱				
آسپارتیک اسید	۸/۳۶				
گلایزین	۵/۰۴				
پرولین	۵/۶۵				
سرین	۴/۸۴				
هیدروکسی پرولین	۳/۳۸				
سیستئین	۲/۱۰				
گلوتامیک اسید	۱۱/۷۳				
نسبت اسید آمینه ضروری به‌کل اسید آمینه	۵۴/۹۹				
نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیرضروری	۱/۲۲				
میزان اسید آمینه کل	۹۵/۵۱				

[۱]اسیدآمینه ضروری،

[۲]هیستدین+آلانین.

[۳] پروتئین مرجع، بر اساس نیاز انسان به اسیدهای آمینه (FAO/WHO,1990).

[۴]پروتئین مرجع، بر اساس نیاز ماهی کپور به اسیدهای آمینه (NRC, 1993).

[۵]شاخص شیمیایی موردمحاسبه توسط پروتئین مرجع [۳].

[۶]شاخص شیمیایی موردمحاسبه توسط پروتئین مرجع [۴].

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین در جدول ۴ ارائه‌شده است. پروتئین هیدرولیز شده دارای نرخ کارایی ۵/۰۱ – ۱/۹۵ می‌باشد.

جدول ٤: نرخ کارایی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی زالون (*Alosa caspia*) (سال ١٣٩٤).

معادلات	پروتئین هیدرولیز شده
(تیروزین) ۰/۱۰۴– (لایزین) ۰/۴۵۴ + ۰/۴۶۸ –	۱/۹۵
(تیروزین)۰/۹۴۴– (هیستیدین) ۰/۲۱۱+ (لوسین) ۰/۷۸۰ + (میتیونین) ۰/۴۳۵ + ۱/۸۱۶–	۵/۰۱
۰/۰۸۰۸۴ (A) – ۰/۱۰۹۴	۲/۹۵
۰/۰۶۳۲۰ (B) – ۰/۱۵۳۹	۳/۰۶

A: مجموع اسیدهای آمینه ترئونین، والین، متیونین، ایزولوسین، فنیل آلانین و لایزین.

B: مجموع اسیدهای آمینه A و هیستیدین، آرژنین و تیروزین.

بحث و نتیجه‌گیری

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی نشان می‌دهد میزان پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه بسیار بالابود (۷۸/۹۱ درصد) و در نتایج سایر محققین میزان پروتئین ۶۳/۴ تا ۹۲/۰ درصد بود (Bhaskar *et al.*, 2008; Kristinsson and Rasco, 2000a, b; Nilsang *et al.*, 2005; Soussi *et al.*, 2007; Ovissipour *et al.*, 2009a, b; 2010; Shahidi *et al.*, 1995; Wasswa *et al.*, 2007).

میزان چربی در ماده خام اولیه در حدود ۸ درصد بود بعد از انجام عمل هیدرولیز، میزان چربی در پروتئین هیدرولیز شده به‌شدت کاهش پیدا نمود. دلیل این کاهش، می‌توانند به دلیل شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتریفوز نمونه‌ها باشد که باعث می‌شود در طی سانتریفوژ با دور بالا، چربی به پروتئین نامحلول متصل شده و همراه آن‌ها رسوب می‌کند. کاهش در میزان لیپید پروتئین هیدرولیز شده در پایداری اکسیداسیون لیپیدها نقش چشمگیری دارد و سبب پایداری محصول می‌شود (Diniz and Martin, 1997; Kristinsson and Rasco. 2000b; Nilsang *et al.*, 2005; Shahidi *et al.*, 1995; Ovissipour *et al.*, 2009a, b; 2010; 2012).

Ovissipour و همکاران (a ۲۰۰۹) با بکار بردن آنزیم آلکالاز، میزان چربی پروتئین هیدرولیز شده ضایعات تاس ماهی را، ۰/۱۸ درصد گزارش نمودند.

درجه هیدرولیز بر ظرفیت نگهداری آب و چربی تاثیر می گذارد (Shavandi *et al.*, 2019). نتایج مربوط به درجه هیدرولیزاسیون نشان می‌دهد با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد. دلیل این امر می‌تواند این باشد که در مدت‌زمان بیشتر فعالیت آنزیمی بیشتر صورت گرفته و باندهای پپتیدی مدت‌زمان بیشتری در دسترس قرار می‌گیرند و دچار شکست بیشتر می‌شوند که حاصل شکست بیشتر باندهای پپتیدی نتیجه درجه هیدرولیز بیشتر را در پی دارد و نتایج مشابهی توسط سایر محققین مشاهده‌شده است (Asmpo *et al.*, 2005; Guerard *et al.*, 2002; Kristinsson and Rasco., 2000 b; Ovissipour *et al.*, 2009a, b; 2010; 2012; Tang *et al.*, 2008).

با توجه به نتایج با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، طول زنجیره کاهش می‌یابد. نتایج تحقیق حاکی از ارتباط بین طول زنجیره پپتیدی و درجه هیدرولیزاسیون بود. این یافته حاکی از آن بود که با افزایش درجه هیدرولیزاسیون، طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. محاسبه طول متوسط زنجیره با خواص عمل‌کنندگی هیدرولیز تا حد زیادی تطابق دارد چراکه در شرایط هیدرولیز شدید پروتئین، خواص عمل‌کنندگی ضعیف می‌شود و برای بروز خواص عمل‌کنندگی مطلوب باید پپتیدها حداقل از ۲۰ اسیدآمینه تشکیل شوند (Kristinsson and Rasco, 2000a ، اویسی پور و قمی، ۱۳۸۷).

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

بازیافت پروتئینی یک پارامتر مهم در هیدرولیزاسیون می باشد که نشان دهنده توانایی جداسازی پروتئین ها از سوبسترا و محلول سازی آنها در فاز مایع می باشد

بازیافت پروتئینی یک پارامتر مهم در هیدرولیزاسیون می‌باشد که نشان‌دهنده توانایی جداسازی پروتئین‌ها از سوبسترا و محلول سازی آن‌ها در فاز مایع می‌باشد که به خصوصیات مائه مورد نظر، شرایط هیدرولیز و فعالیت آنزیمی بستگی دارد (Benjakul and Morrissey, 1997؛ رفعتی نیا و رومیانی، ۱۳۹۷؛ Shabanpour *et al*., 2017). با توجه به نتایج افزایش زمان هیدرولیزاسیون، بازیافت پروتئینی افزایش می‌یابد، نتایج مشابهی توسط سایر محققین ارائه شد (Aspmo *et al*, 2005; Ovissipour *et al*, 2009a, b; 2010; 2012). نتایج تحقیق حاکی از ارتباط بین بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیزاسیون بود. این یافته حاکی از آن بود که افزایش درجه هیدرولیزاسیون، میزان بازیافت پروتئینی افزایش پیدا می‌کند و مشخص‌شده است که ارتباط زیادی بین درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت پروتئینی وجود دارد (Benjakul and Morrissey, 1997). رفعتی نیا و رومیانی (۱۳۹۷) به بررسی تأثیر زمان هیدرولیز بر ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده امعاواحشا کپور علف خوار پرداختند آن‌ها نیز اعلام نمودند با افزایش زمان هیدرولیز بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز، افزایش می‌یابد. یاسمی و همکاران (۱۳۹۲) در بررسی مقایسهٔ راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاواحشا ماهی کپور سرگنده، اعلام نمودند که با افزایش زمان و دمای هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی و درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد.

نتایج محققین زیادی نشان می‌دهد که پروتیین هیدرولیز شده ماهی ارزش تغذیه ای بالایی دارد (Korczek et al., 2018; Rastogi and Bhatia, 2019; Zhao *et al*., 2017; Yathisha *et al*., 2019). نتایج تحقیق حاضر نشان‌دهنده ارزش بالا غذایی پروتئین هیدرولیز شده می‌باشد. بر اساس منابع نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه کل و همچنین میزان اسید آمینه ضروری به غیرضروری نباید به ترتیب کمتر از۴۰ درصد و ۰/۶ باشد (FAO/WHO, 1990). با توجه به نتایج تحقیق حاضر پروتئین هیدرولیز شده از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار است. اویسی پور و همکاران (۱۳۸۹) میزان اسید آمینه ضروری به غیرضروری را برای پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم آلکالاز را ۱/۴۷ اعلام نمودند و میزان اسید آمینه ضروری به‌کل اسید آمینه موجود را ۵۵/۴ درصد اعلام نمودند.

نتایج نشان می‌دهد پروتئین هیدرولیز شده نیازهای یک انسان بالغ را برطرف می‌کند. این در حالی است که نتایج مربوط به پروتئین هیدرولیز شده در مقایسه با نیازهای ماهی کپور نشان می‌دهد که اسیدآمینه‌های متیونین، لایزین، فنیل آلانین و ترئونین، اسیدآمینه‌های محدودکننده محسوب می‌شوند و مهم‌ترین اسید آمینه محدودکننده در تحقیق حاضر اسید آمینه فنیل آلانین بود که با نتایج Ovissipour و همکاران (2009a) تطابق داشت. Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) پروتئین‌های ضایعات کپور ماهی هندی (*Catla catla*) را با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد که در مقایسه با ترکیب موردنیاز یک انسان بالغ، اسیدهای آمینه ایزولوسین، میتیونین و والین و در مقایسه با اسیدهای آمینه موردنیاز کپور معمولی، اسیدهای آمینه هیستیدین، میتیونین و فنیل الانین، محدودکننده هستند. پروتئین هیدرولیز شده در تحقیق حاضر دارای نرخ کارایی پروتئین مناسبی هستند.

نرخ کارایی پروتئین برای ماهی کاپلین ۳/۱۱-۲/۶۱ گزارش شد (Shahidi *et al*., 1995). اویسی پور و همکاران (۱۳۸۹) میزان نرخ کارایی پروتئین را برای پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تن زرد باله با استفاده از آنزیم آلکالاز ۵/۳۸ – ۲/۸۹ اعلام نمودند.

درمجموع در تحقیق حاضر تأثیر آنزیم آلکالاز بر روی خواص پروتئین هیدرولیز شده ضایعات زالون موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد آنزیم آلکالاز در زمان ۶۰ دقیقه از میزان پروتئین، درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی بیشتری برخوردار است. با توجه به ترکیب اسید آمینه می‌توان از پپتون تولیدی در آبزی‌پروری، غذای دام، کود و به‌عنوان محیط مناسب کشت باکتری استفاده نمود.

www.SID.ir

سپاسگزاری

این تحقیق بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد دانشگاه آزاد اسلامی واحد قائم‌شهر می‌باشد. مؤلفین از شرکت کاسپین زیست فناوران و دکتر علی معتمدزادگان ریاست محترم مرکز رشد واحدهای فناور طبرستان به خاطر حمایت‌های مالی و فنی نهایت تشکر و قدردانی را ابراز می‌دارند.

منابع

اویسی پور، م. و قمی، م. ر.، ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. صفحات ۲۴-۱۸.

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

خواجوی، س.، زکی پور رحیم آبادی، ا.، غفاری مقدم، م.، شهرکی، ه.، میر، ل. و زند کریمی، م.، ۱۳۹۵. اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی هیدرولایزات پروتئین ضایعات ماهی شیزوتراکس (*Schizothorax zarudnyi*). فصلنامه شیلات، ۶۹ (۳): صفحات ۳۵۱-۳۵۸.

سازمان شیلات ایران. ۱۳۸۷. آمار صید آبزیان. سازمان شیلات ایران. معاونت برنامه‌ریزی و مدیریت منابع. نوبت اول.

رفعتی نیا، آ. و رومیانی، ل.، ۱۳۹۷. اثر آنزیم، زمان و دما بر برخی ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده امعاواحشا کپور علف خوار. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی. ۷ (۳): صفحات ۲۸۰-۲۶۹.

مهرگان نیکو، ع.، صادقی،ع.، قربانی، م.، طاهری. ع.، اعلمی، م. و کمالی، ف.، ۱۳۹۲. بررسی اثر شرایط هیدرولیز بر فعالیت ضد اکسایشی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی کاراس. نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، ۲ (۴): صفحات ۳۶۴- ۳۵۱.

گوگ.گ.، ۱۳۹۱. ارزیابی تغییرات گوشت چرخ شده و چرخ شده شسته ماهی زالون (*Alosa branschnikowi*) طی ۵ ماه نگهداری در دمای ۲۰- و مقایسه کیفیت حسی فیش برگر تولیدی از آن‌ها. پایان‌نامه کارشناسی ارشد. دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان.

یاسمی، م.، قمی مرزدشتی، م.ر.، دارنهال، ط.، محمدزاده، ب . و امینی، ه.، ۱۳۹۲. مقایسهٔ راندمان بازیافت و درجهٔ هیدرولیز پروتئین‌های موجود در امعاواحشای ماهی کپور سرگنده با استفاده از آنزیم، مجله علمی شیلات ایران. ۱(۲۲): صفحات ۱۵۶- ۱۴۹.

Alder-Nissen, J. and Sejr Olsen, H., 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein. Food Chemistry, 7: 125-146.

AOAC, 2005. Official methods of analysis (16th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Alsmeyer, R. H., Cunningham, A. E. and Happich, M. L., 1974. Equations predicting PER from amino acid analysis. Food Technology, 28(7), 34–40.

Aspmo, S. I., Horn, S. J. and Eijsink, V. G. H., 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.*) viscera. Process Biochemistry, 40, 1957–1966.

Benjakul, B. and Morrissey, M. T., 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45, 3424.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C. and Lalitha, R. G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, 99(10), 410

FAO/WHO, 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/WHO/ UNU expert consultation technical report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series no. 724, pp. 116–129.

Guerard, F., Guimas, L. and Binet, A., 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 19–20, 489–498.

Korczek, K., Tkaczewska, J. and Milgdal, W., 2018. Antioxidant and Antihypertensive Protein Hydrolysates in Fish Products – a Review. Czech Journal of Food Sciences. 36(3), 195-207

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A., 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40, 43–81.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000b). Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48, 657–666.

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

www.SID.ir

Downloaded from jmb.iauahvaz.ac.ir at 10:35 +0430 on Tuesday April 14th 2020

Layne, E., 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology. 3. New York: Academic press, Ind.

Lee, Y. B., Elliot, J. G., Rickansrud, D. A. and Mugberg, E. C., 1978. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determinations of connective tissue content in meat. Journal of Food Science, 43, 1359–1362.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M. and Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. Journal of Food Engineering. 70.

NRC., 1993. National research council – nutrient requirements of fish p. 124. Washington: National Academy of Sciences.

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. Food Chemistry. 115.

Ovissipour, M., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B. and Esmaeili, Mulla, A., 2009b. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons (*Huso huso*) using Alcalase. International Aquatic Research, 1:31–38.

Ovissipour, M., Abedian, A. M., Motamedzadegan, A. and Nazari, R. M., 2010. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*). Food and Bioproccess Technology. DOI 10.1007/s11947- 010-0357-x.

Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A. and Shabanpour, B., 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food and Bioprocess Technology. 5(2), 460-465.

Raa, J. and Gildberg, A., 1982. Fish silage: a review, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 14, 383.

Shahidi, F., Han, X. Q. and Syniwiecki, J., 1995. Production and characteristics ofprotein hydrolysates from capelin *(Mallotus villosus).* Food Chemistry, 53: 285–293.

Rastogi, H. and Bhatia, S., 2019. Future Prospectives for Enzyme Technologies in the Food Industry. Enzymes in Food Biotechnology Production, Applications, and Future Prospects, 845-860.

Shabanpour, B., Krdjzy, M., Nazari, K. and Esmaeili Khariki, M., 2017. The effect of enzymatic hydrolysis time, temperature and enzyme to substrate ratio on the antioxidant properties of bioactive peptides derived from shrimp. Journal of Food Science and Technology Innovation, 14(62): 31-44. (in Persian).

Shavandi, A., Hou, Y., Carne, A., Mcconell, M., El-din, A. and Bekhit, A., 2019. Marine Waste Utilization as a Source of Functional and Health Compounds. Advances in Food and Nutrition Research. 87, 187-254.

Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. Food Technology and Biotechnology. 45. 187–194.

Taheri, A., Abedian Kenari, A., Motamedzadegan, A. and Habibi Rezaie., M., 2012. Process optimization of Poultry By-products hydrolysate production by RSM. Journal of Food Science & Technology9(34).

Tang, H. G., Wu, T. X., Zhao, Z. U. 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 Sceicne B. 9. 9.

Taylor., 1957. WH. Formol titration: an evaluation of its various modifications. The Analyst 1957; 82: 488–98.

Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. H. and Yuan, X. Q., 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) skin. Food Chemistry. 104. 1698–170.

Yathisha, U. G., Bhat, I., Karunasagar, I. and Mamasa, B. S., 2019. Antihypertensive activity of fish protein hydrolysates and its peptides**.** Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 59(15): 2363-2374.

Zhao, T., Xu, J., Zhao, H., Jiang, W., Guo, X., Zhao, M., Sun-Waterhouse, D., Zhao, Q. and Su, G. 2017. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of anchovy (*Coilia mystus*) protein hydrolysates and their memory-improving effects on scopolamine-induced amnesia mice. International Journal of Food Science and Technology, 52: 504–510.

www.SID.ir