Archive of SID

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 7, No. 2, 2011, p. 137-144

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۷، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۰، ص. ۱۴۴-۱۳۷

اثر نسبت های مختلف آنزیم تریپسین و دماها و زمان های اثر آن بر راندمان استخراج پروتئینی امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*)

مریم مدانلو کردکلایی[1*]- غلامرضا رفیعی[2]- علی معتمد زادگان[3]- سهراب معینی[4]- علیرضا میرواقفی[5]-محمود رضا اویسی پور[6]

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۴
تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۵

چکیده

در مقاله حاضر شرایط بهینه استخراج پروتئین هیدرولیز شده از امعاء واحشاء ماهی تون زرد باله بررسی شده است. هیدرولیز آنزیمی با نسبت آنزیم به سوبسترای ۳/۷ – ۱/۳ میلی گرم به ازای هر گرم پروتئین ، زمان ۱۰- ۱ ساعت و دمای ۴۴ °C-۳۰ با استفاده از روش RSM و با کمک طرح آزمایشی CCD با چهار تکرار در نقطه مرکزی و ۵ سطح از هرمتغیر انجام شد. نتایج در سطح آماری $p = ۰/۰۵$ مقایسه میانگین شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، با افزایش فعالیت آنزیم از ۱/۳ تا ۲/۵ میلی گرم میزان بازیافت پروتئینی افزایش می یابد . با افزایش غلظت آنزیم تا ۳/۳۵ میلی گرم به حالت ثابتی می رسد و پس از آن تا ۳/۷ میلی گرم راندمان استخراج پروتئین کم می شود. با افزایش دما از ۳۷ °C-۳۰ شدت راندمان استخراج پروتئینی زیاد می شود و پس از آن تا ۴۲°C نرخ رشد بازیافت کاهش می یابد و پس از ۴۲ °C تقریبا ثابت می ماند. با افزایش زمان از ۱ ساعت تا ۲ ساعت و ۱۸ دقیقه راندمان استخراج کم می شود. هیدرولیز طولانی تر تا ۵ ساعت و ۳۰ دقیقه راندمان بازیافت پروتئینی ثابت ماند و با ادامه هیدرولیز تا ۱۰ ساعت افزایش می یابد. در بهترین شرایط راندمان بازیافت پروتئین از ۷۵ درصد تجاوز نمی کند. این شرایط در نسبت آنزیمی ۲/۴۱ میلی گرم، دمای ۳۸/۸ °C درجه سانتی گراد و زمان ۹ ساعت و ۳۰ دقیقه دیده می شود. نتایج نشان داد که درصد بازیافت پروتئینی بیشتر تحت تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای اثر آنزیم می باشد و زمان تابعی از نسبت آنزیمی و دما است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، بازیافت پروتئینی، بهینه سازی، ضایعات تون زرد باله، تریپسین

مقدمه

بسیاری از محصولات جانبی حاصل از فرآوری ماهی مانند زباله بی ارزش، بدون هیچ تلاشی برای بازیافت آن دور ریخته می شوند ((Kristinson & Rasco, 2000; Ovissipour *et al*, 2009a).

برآوردهای اخیر نشان می دهد که در حال حاضر ضایعات صنایع شیلاتی جهان بیش از ۲۰ میلیون تن می باشد (FAO, 2003). امعاء و احشاء ماهی یکی از مهم ترین محصولات جانبی، یک منبع غنی از پروتئین با اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که اگر منجمد نشوند یا شرایط نگه داری مناسب آنها فراهم نشود، پایداری کمی دارند (Raa & Gildberg, 1982). ضایعات امعاء و احشاء ماهی تون به تنهایی در حدود ۳۰۰ هزار تن بر آورد شده است (Machendrakar, 2000). استفاده از فناوریهایی که از این ضایعات استفاده بهینه و یا حتی برخی مواد آلی مفید را پیش از رهاسازی بازیافت کنند و نیز منجر به کاهش آلودگی شوند، ضروری به نظر می رسد (Baca *et al*, 1991). با توجه به اینکه در طی دهه گذشته نیاز به تامین منابع جدید پروتئینی در دنیا افزایش یافته، بازیافت پروتئین های موجود در این مواد جانبی و کاربرد آنها به عنوان اجزای کاربردی در فرمولاسیون غذایی، روش

۱- دانش آموخته، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
(*- نویسنده مسئول: Email: M.Modanlow@gmail.com)
۲و۵- استادیار، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.
۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه مازندران.
۴- استاد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.
۶- استادیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گرگان.

www.SID.ir

Archive of SID

مناسب برای ایجاد ارزش افزوده مـی باشـد (Aspmo *et al*, 2005 , Ovissipour *et* al,2009a). کاربرد آنزیم هـای خـارجی بـه منظـور هیدرولیز پروتئین های غذایی، فرایند مهمی است که برای بهبـود یـا اصلاح خواص بیوشیمیایی و عملکردی پروتئین هـا بـدون هـیچ اثـر سـوئی روی ارزش غـذایی و قابلیـت جـذب آنهـا اسـتفاده مـی شـود (Mullally *et al*, 1994) آنزیم هایی کـه بـرای هیـدرولیز پـروتئین مورد استفاده قرار می گیرند باید از درجه غذایی برخوردار بـوده و اگـر منشا میکروبی دارند ارگانیسم تولیـد کننـده آنهـا غیـر بیمـاریزا باشـد (Petersen *et al*, 1981). پروتئازهـای تجـاری متـداول بـرای هیدرولیز پروتئین های ماهی، منشا گیاهی مانند پاپـائین (Hoyle & Merritt, 1994; Shahidi *et al*, 1995) ، منشـا جـانوری ماننـد پپسین (Viera *et al*, 1995)، کیموتریپسین و تریپسین (Simpson *et al*, 1998) و منشـا میکروبـی ماننـد آلکـالاز (Diniz & Martin, 1997)دارند. تولید پروتئین های هیدرولیز شده باعث افزایش ارزش تغذیه ای به دلیـل بـالارفتن قابلیـت هضـم پـروتئین هـا مـی شـود. همچنین، اثر حساسیت زایـی برخـی از پـروتئین هـا از بـین مـی رود (Myers & Montgomery, 2002). پروتئین های هیدرولیز شده به عنـوان عناصـری در تغذیـه آبـزی پـروری (Viditti *et al*, 2003; Nilseng *et al*, 2005) و به عنوان منبـع نیتروژنـی تـاثیر گـذار در محیط رشد میکروبـی (Gildberg *et al*, 1989; Guerard *et al*, 2001, Safari *et al*,2009)به کار برده می شود. ماهی تون زرد باله یکی از مهم ترین تون ماهیان در خلیج فارس می باشد که ۳۵ درصد کل صید را به خود اختصاص داده است. ضایعات امعـاء واحشـاء ایـن ماهی غنی از پروتئین هستند. اگرچه تاکنون گزارشاتی مبنی بـر تـاثیر هیدرولیز آنزیمی روی پروتئین های امعاء واحشاء ماهی تون زرد بالـه ارائه شده است (Ovissipour *et al*, 2009a)، ولی در تحقیق حاضر تاثیر آنزیم تریپسین، و دماها و زمان های مختلف اثر آن بـر رانـدمان بازیافت پروتئین امعاء و احشاء ماهی مورد نظر مورد بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

آماده سازی ماده اولیه برای هیدرولیز آنزیمی

ماهی تون زردباله از سـواحل خلـیج فـارس صـید شـد و پـس از انجماد در دمای ºC (۲۸-)–(۳۰-) به روی عرشه به صورت یخ زده به محل فرآوری (شرکت فرآوری زرین واقـع درشـهر سـاری) منتقـل شد. پس از انجمادزدایی زیر دوش آب و سر و دم زنی، حفره شـکمی تخلیه شد. ضایعات امعاء واحشاء بـدون کیسـه شـنا حاصـل از تخلیـه حفره شکمی به صورت یخ زده به آزمایشگاه منتقل شد.

جدول ۱- فاکتورهای مستقل و سطوح مورد استفاده برای بهینه سازی شرایط هیدرولیز با آنزیم تریپسین

تیمارها	سطوح مورد استفاده				
کد	$+\alpha$	+۱	۰	-۱	$-\alpha$
دما (درجه سانتی گراد) (x_1)	۴۴	۴۲	۳۷	۳۲	۳۰
زمان (ساعت) (x_2)	۱۰	۸:۴۵	۵:۳۰	۲:۱۸	۱
نسبت آنزیم به سوبسترا (میلی گرم / گرم پروتئین) (x_3)	۳/۷	۳/۳۵	۲/۵	۱/۶۵	۱/۳

به منظور جلوگیری از فرآیند اتولیز آنزیمی و میکروبی، نمونـه هـا در ظروف پلاسـتیکی در دمـای ۲۰- درجـه سـانتی گـراد تـا شـروع آزمایش نگه داری شدند. قبل از فرآیند هیدرولیز آنزیمی، نمونه هـا در طول شب در یخچال در دمای ۱± ۴درجه سـانتیگراد انجمـاد زدایـی شدند. سپس در چرخ گوشت[1] کاملاً خرد و مخلوط شده در اندازه های ۵۰ گرمی تقسیم شدند.برای انجام هیدرولیز آنزیمی آزمـایش از ارلـن های ۲۵۰ میلی لیتری استفاده شد. در هنگام شروع آزمایش ۵۰ گـرم از نمونه که قبلاً توزین و جدا شده بود در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری به نسبت (W/V)۱:۲ با آب مقطر مخلوط گردید. مخلـوط تهیـه شـده توسط دستگاه هموژنایزر[2] به مدت ۲ دقیقه، در دمای معین همگن شد و سپس به منظور غیرفعال کـردن آنـزیم هـای داخلـی در دمـای ۸۵ درجه سانتی گراد بـه مـدت ۲۰ دقیقـه در حمـام آبـی[3] قـرار گرفـت. غیرفعال سازی آنزیم های داخلی به این دلیل انجام شد کـه شـرایط کامل کنترل شده باشد و نتایج به دست آمده حاکی از اثر فقط آنـزیم خارجی تحت شرایط تعریف شده باشـد. pH مخلـوط همـوژن شـده، براساس pH اپتیمم(pH: ۷) فعالیت آنـزیم تریپسـین (آنـزیم خـارجی مورداستفاده برای هیدرولیز) توسط pH متر[4] و با اضافه کردن NaoH ۰/۲N تنظیم شد. سپس هیدرولیز پروتئینی توسط آنزیم تریپسـین بـا فعالیت۲۰۰ FIP-(u/g)[5] (تهیـه شـده از شـرکت Merck) در شـرایط

1- SAYA,Model:promeatw-1800,Tehran.Iran
2 -Wiggen hauser Germany

3- Imemmer type:w NB-22,Germany
4- HANNA,Model:211 HI 1131,Romaina
5- Fédération International Pharmaceutique

www.SID.ir

Archive of SID

ذکر شده در جدول ۱ انجام گرفت.

آزمایشات بهینه سازی

بهینه سازی شرایط هیدرولیز با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)، بر پایه طرح مرکب مرکزی(CCD)[1] انجام شد. فاکتورهای متفاوت و سطوح به کارگرفته شده در جدول ۱ نشان داده شده است. سه فاکتور دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا (E/S) در ۵ سطح مساوی (α+ و ۱+ و ۰ و ۱− و α−) به کارگرفته شدند (جدول ۲). هیدرولیز در دستگاه انکوباتور شیکر[2] با دور ثابت ۲۰۰rpm انجام شد. در پایان هر فرآیند آنزیمی نمونه های هیدرولیز شده در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه (Guerard *et al*, 2002) در حمام آبی، به منظور غیرفعال شدن آنزیم تریپسین حرارت داده شدند. اگرچه استفاده از حرارت سبب دناتوراسیون نسبی پروتئین های هیدرولیز شده می گردد ولی هم چنان یک روش متداول برای متوقف کردن فعالیت آنزیم ها ضمن بررسی ویژگی های پروتئین های هیدرولیز شده می باشد. (Ovissipour *et al*, 2009, Kristinsson & Rasco, 2000). پس از غیرفعال سازی آنزیم خارجی، نمونه ها در دمای اتاق سرد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه و دردمای ۱۰ درجه سانتیگراد و با دور ۶۷۰۰g به منظور جمع آوری سوپرنتنت، سانتریفیوژ[3] شدند. غلظت پروتئین محلول در سوپرنتنت حاصل از سانتریفیوژ به روش بیورت (Layne, 1957) اندازه گیری شد. شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر[4] قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از پودر سرم آلبومین به عنوان یک پروتئین استاندارد استفاده گردید. ناحیه خطی منحنی های مربوطه به عنوان منحنی استاندراد در اندازه گیری پروتئین نمونه های آزمایش استفاده شد. معادله منحنی استاندارد با $r^2 = 0/9975$ به شرح زیر می باشد.

$$Y= 0.041x+0.035 \qquad (۱)$$

اندازه گیری بازیافت پروتئین

برای اندازه گیری راندمان بازیافت پروتئین[5] از سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ استفاده شد. نیتروژن کل در بخش محلول و در مواد هیدرولیز شده بااستفاده از روش بیورت تعیین و سپس با استفاده از معادله Benjakul & Morrissey (1997) زیر محاسبه شد:

$$PR\% = \frac{\text{۱۰۰ × مقدار پروتئین موجود در محصول هیدرولیز شده}}{\text{مقدار پروتئین اولیه موجود در نمونه خام}}$$

1- Central composite design
2 -Ivymen system, Comecta, Spain
3 - Hermle labortchnik GmbHz 206 A, Germany
4- 6305, Serial No:1532,Germany JEN WAY
5- Protein Recovery

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح آماری (CCD) با چهار تکرار در نقطه مرکزی و پنج سطح از هر متغیر استفاده گردید (جدول ۱). سپس نتایج به کمک نرم افزار آماری SAS به روش سطح پاسخ-RSM [6] REG تجزیه و تحلیل شده و مدل های به دست آمده به صورت منحنی و به روش (RSM) برازش شدند. سطوح مورد استفاده به فاصله ۱+، ۱−، α+ و α− از نقطه مرکزی قرارداشتند. رسم نمودارها توسط نرم افزار Matlab و Excell انجام گرفت.فاکتور α معادل۱/۴۱۴ در نظر گرفته شد (Charles, 1982 ; Myers & Montgomery, 2002). نقطه بهینه بر اساس پارامترهای فوق الذکر از روی منحنی های همتراز بدست آمد. مقایسه میانگین ها به روش دانکن و با سطح معنی داری P =۰/۰۵ و یا P= ۰/۰۱ انجام شد.

جدول ۲- طرح آزمایش و سطوح کدبندی شده متغیرهای مستقل و میزان بازیافت پروتئینی

Run	X_1	X_2	X_3	PR
۱	۴۲	۸:۴۵	۳/۳۵	۷۷/۱۳
۲	۴۲	۸:۴۵	۱/۶۵	۷۵/۸۶
۳	۴۲	۲:۱۸	۳/۳۵	۷۱/۴۱
۴	۴۲	۲:۱۸	۱/۶۵	۶۷/۵۲
۵	۳۲	۸:۴۵	۳/۳۵	۶۵/۵۴
۶	۳۲	۸:۴۵	۱/۶۵	۶۰/۳۱
۷	۳۲	۲:۱۸	۳/۳۵	۵۸/۸۷
۸	۳۲	۲:۱۸	۱/۶۵	۵۵/۳۶
۹	۳۷	۱۰	۲/۵	۷۹/۲۴
۱۰	۳۷	۱	۲/۵	۷۳/۷۴
۱۱	۳۷	۵:۳۰	۳/۷	۷۰/۶۸
۱۲	۳۷	۵:۳۰	۱/۳	۵۸/۱۲
۱۳	۴۴	۵:۳۰	۲/۵	۷۲/۱۴
۱۴	۳۰	۵:۳۰	۲/۵	۵۶/۷۳
۱۵	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۶۸/۴۶
۱۶	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۶۸/۵۱
۱۷	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۷۱/۳۶
۱۸	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۷۰/۵۷

X_1: درجه حرارت، X_2: زمان ، X_3: نسبت آنزیم به سوبسترا ، α: ۱/۴۱۴ ، PR: بازیافت پروتئینی

نتایج و بحث

مدل سازی اثر آنزیم تریپسین بر بازیافت پروتئینی

مقادیر بازیافت پروتئین در ترکیب های متفاوتی از متغیرهای مستقل در جدول ۲ آورده شده است. جدول آنالیز واریانس اثر ساده متغیرها (جدول ۳) نشان می دهد که هر سه فاکتور مستقل دما، زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا تاثیر مشخص نسبتا بالایی بر روی بازیافت پروتئین دارند (P < ۰/۰۱).

6 -Response surface methodology - Regression

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر ساده متغیرها بر میزان بازیافت پروتئینی

پارامتر	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	مقدار F
درجه حرارت C^o (X_1)	۴	۵۲۹/۹۸**	۱۳۲/۴۹	۲۷/۶۰
زمان h (X_2)	۴	۱۶۳/۷۴۱**	۴۰/۹۳	۸/۵۳
آنزیم / سوبسترا (mg/gr.protein) (X_3)	۴	۱۶۱/۹۱**	۴۰/۴۷	۸/۴۳

** سطح معنی داری ۰/۰۱ = P

جدول ٤- برآورد ضرایب معادله رگرسیونی بازیافت پروتئینی

پارامتر	درجه آزادی	برآورد	خطای استاندارد	مقدار t	برآورد از روی داده های کد بندی شده
Intercept	۱	۷۰/۰۱**	۱/۰۳	۶۷/۷۹	۷۰/۰۱
X_1	۱	۶/۱۳**	۰/۶۳	۹/۷۰	۸/۶۷
X_2	۱	۲/۷۸**	۰/۶۳	۴/۴۱	۳/۹۴
X_3	۱	۲/۶۳**	۰/۶۳	۴/۱۷	۳/۷۳
X_1X_1	۱	−۳/۰۷**	۰/۷۷	−۳/۹۷	−۶/۱۵
X_2X_1	۱	۰/۳۰ ns.	۰/۷۷	۰/۳۹	۰/۶۰
X_2X_2	۱	۲/۹۵**	۰/۷۷	۳/۸۱	۵/۸۹
X_3X_1	۱	−۰/۴۴ ns.	۰/۷۷	−۰/۵۸	−۰/۸۹
X_3X_2	۱	−۰/۱۱ ns.	۰/۷۷	−۰/۱۵	−۰/۲۲
X_3X_3	۱	−۳/۰۹**	۰/۷۷	−۴	−۶/۱۹

P= سطح معنی داری ۰/۰۱؛ ns. عدم وجود اثر معنی داری

معادله رگرسیونی مربوط به بازیافت پروتئین با توجه به جدول براورد ضرایب معادله رگرسیونی (جدول ۴) به صورت زیر برازش شد: (۲)

$$Y= 70.01 + 6.13X_1 + 2.78X_2 + 2.63X_3 - 3.08X_1^2 + 2.95X_2^2 - 3.1X_3^2$$

تغییرات میزان بازیافت پروتئینی با افزایش دما

همانطور که در شکلهای اثر همزمان دما و زمان (شکل ۱) و اثر همزمان دما و نسبت آنزیم به سوبسترا (شکل ۳) نشان داده شده است، با افزایش دما از ۳۰°C تا ۳۷°C سرعت هیدرولیز به علت شکسته شدن زنجیره پپتیدی، افزایش می یابد با پیشرفت واکنش تا ۴۲ °C، نرخ رشد بازیافت کاهش می یابد تا اینکه در دمای بالاتر از ۴۲°C نمودار بازیافت پروتئینی وارد فاز سکون می شود. از علت های کاهش سرعت هیدرولیز در دماهای بالاتر، می توان به کاهش باندهای پپتیدی دست نخورده و کاهش فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر اشاره کرد(Kristinsson & Rasco, 2000) . بیشترین بازیافت پروتئینی به میزان ۷۵ درصد در دمای ۴۴°C- ۳/۷۵ مشاهده شده است (شکل ۱الف، ۱ب). نتایج مشابهی در تحقیق اویسی پور و همکاران (۲۰۰۸) روی قره برون با استفاده از آنزیم آلکالاز بازیافت پروتئینی ۶۱/۹۶ درصد بدست آمد. آنها نیز افزایش میزان بازیافت پروتئینی را همراه با افزایش دما تا ۵۵°C و افزایش درجه هیدرولیزاسیون مشاهده کردند.

تغییرات میزان بازیافت پروتئینی با افزایش زمان

با افزایش زمان در نمودار های اثر همزمان دما و زمان (شکل ۱) و همچنین نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان (شکل ۲) بر روی بازیافت پروتئینی، در زمان های اولیه شروع واکنش تا حدود ۵ ساعت و۳۰ دقیقه در میزان بازیافت پروتئین تغییر محسوسی مشاهده نمی شود. تغییر در راندمان بازیافت پس از حدود ۶ ساعت شدت می یابد و پس از حدود ۹/۵ ساعت به حداکثر خود می رسد به طوریکه بیشترین میزان بازیافت در هیدرولیز های طولانی مشاده می شود (شکل ۱و ۳). از روند تغییرات می توان نتیجه گرفت که بازیافت پروتئینی کمتر تحت تاثیر زمان و بیشتر تحت تاثیر نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا و دما است. بازه زمانی انتخابی تابعی از فعالیت آنزیمی و دمای اثر آنزیم می باشد. به دلیل عدم افزایش معنی دار بازیافت پروتئین پس از ۹/۵ ساعت، دسترسی سریعتر به نتیجه مطلوب طی زمان کمتر و صرف

www.SID.ir

Archive of SID

انرژی کمتر، زمان ۹ ساعت و ۳۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه برای بازیافت پروتئینی خواهد بود. بازیافت پروتئینی ۷۰ درصدی (Quaglia & Orban, 1990)، بازیافت پروتئینی ۴۷ درصدی (Kristinsson & Rasco, 2000)، بازیافت پروتئینی ۷۱ درصدی (Bhaskar *et al*, 2007) ، بازیافت پروتئینی ۶۱/۹۶ درصدی همراه با افزایش زمان هیدرولیز گزارش شده است (Ovissipour *et al*, 2009, Ovissipour *et al*, 2008). راندمان بازیافت پروتئینی در این آزمایش حدود ۷۵ درصد بوده و در مقایسه با سایر پژوهشهای مشابه از بیشترین امتیاز برخوردار است.

تغییرات بازیافت پروتئینی همراه با افزایش نسبت آنزیم به سوبسترا

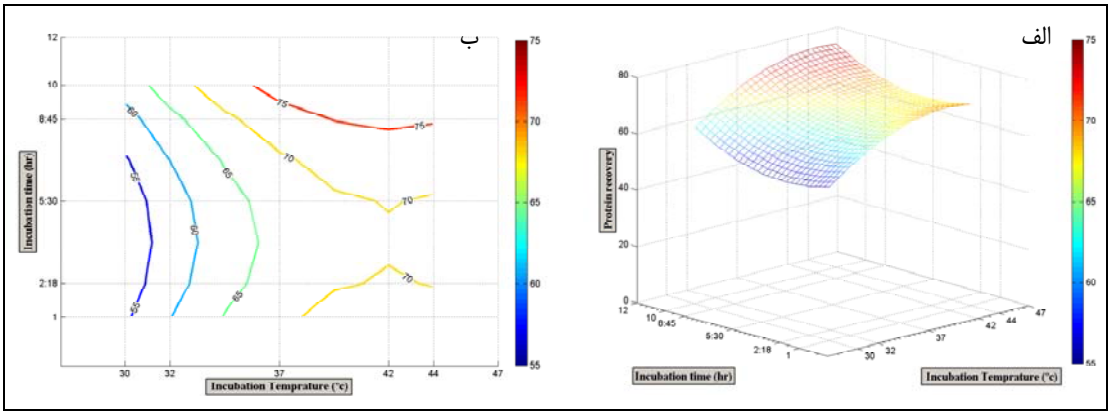
شکلهای اثر همزمان دما و نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا (شکل ۳) و همچنین اثر همزمان نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا و زمان (شکل۲ و ۳) نشان می دهند که همراه با افزایش فعالیت آنزیم از ۱/۳ تا ۲/۵ میلی گرم، میزان بازیافت پروتئینی با فاز سریع افزایش می یابد (Shahidi *et al*, 1995; Nilseng *et al*, 2005) و در ادامه واکنش با افزایش فعالیت آنزیم تا ۳/۳۵ میلی گرم شکل بازیافت پروتئینی وارد فاز سکون می شود. اما با افزایش بیش از حد فعالیت آنزیم تا ۳/۷ میلی گرم، شاهد کاهش در میزان بازیافت پروتئین خواهیم بود. بالاترین بازیافت پروتئین بدست آمده در این مطالعه در حدود ۷۵ درصد بوده که در دامنه فعالیت آنزیمی ۳/۲۶- ۲/۴۱ میلی گرم حاصل شده است (شکل ۲، ۳). افزایش غلظت پروتئازها و بنابراین افزایش حجم هیدرولیز بازیافت نیتروژن محلول را زیاد می کند (Beddows & Ardeshir, 1979; Rebeca *et al*, 1991; Surowka & Fik, 1992). کاهش میزان بازیافت پروتئین با افزایش فعالیت آنزیم احتمالا به دلیل کاهش باندهای پپتیدی دست نخورده به عنوان بستری مناسب برای فعالیت آنزیم و ممانعت آنزیمی می باشد. در واقع میزان سوبسترا محدود است و تا حدی آنزیم را می پذیرد (Guerard *et al*, 2002). عدم مصرف بیش از حد لازم آنزیم از دیدگاه اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. Guerard و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از نسبت های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ ، ۱/۵ درصدی آنزیم Umamizyme، بیشترین بازیافت پروتئینی را در نسبت آنزیمی ۱/۵ درصد گزارش کردند. Aspmo و همکاران (۲۰۰۵) افزایش میزان بازیافت پروتئینی را همراه با افزایش نسبت آنزیمی مشاهده کردند.

تعیین شرایط بهینه برای میزان بازیافت پروتئینی

در جدول ۵ دامنه تغییرات متغیرها به نحوی که میزان بازیافت نیتروژن در حداکثر خود قرار می گیرد آورده شده است. فصل مشترک این متغیرها تعیین کننده شرایط بهینه می باشد.

جدول۵- دامنه متغیرها در شرایط بهینه برای بازیافت پروتئینی

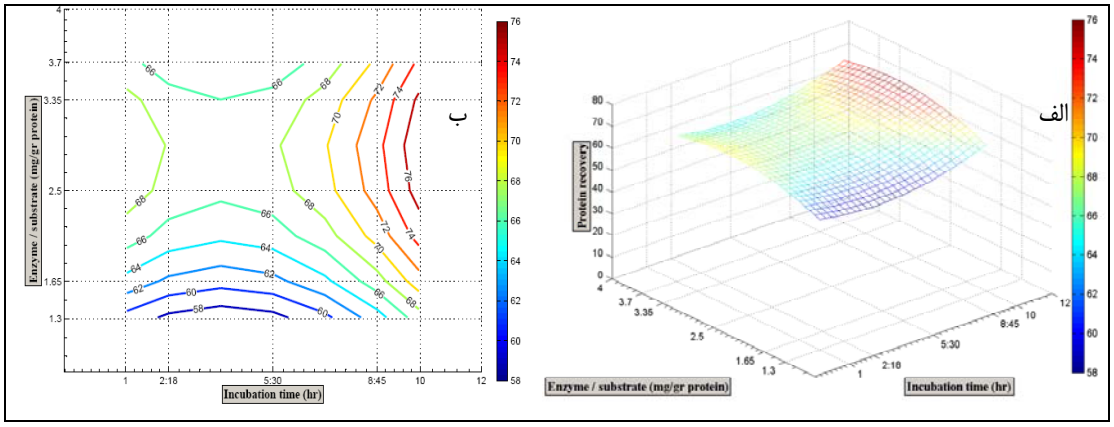
متغیرها	دما (°C)	زمان (h)	نسبت آنزیم به سوبسترا (mg/gr.protein)
دما (°C) و زمان (h)	۳۵/۸-۴۴	۸:۴۲-۱۰	-
دما (°C) و نسبت آنزیم به سوبسترا (mg/gr.protein)	۳۸/۸-۴۴	-	۲/۴۱-۳/۲۶
زمان (h) و نسبت آنزیم به سوبسترا (mg/gr.protein)	-	۹:۳۰-۱۰	۲/۳۳-۳/۴۳



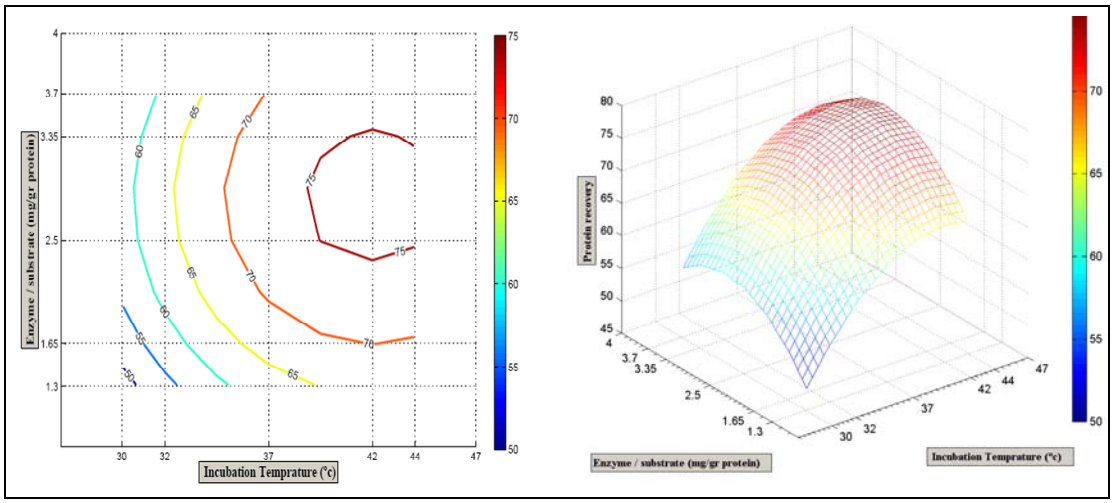
شکل۱- الف) اثر زمان و دما بر میزان بازیافت پروتئینی. ب) خطوط همتراز اثر دما و زمان بر بازیافت پروتئینی.

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۲- الف) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین. ب) خطوط همتراز اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین.



شکل۳- الف) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین. شکل ب). خطوط همتراز اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین.

جدول٦- دامنه و نقطه بهینه برای بازیافت پروتئینی

متغیرها	دما (°C)	زمان (h)	نسبت آنزیم به سوبسترا (mg/gr.protein)
محدوده شرایط بهینه	۳۸/۸-۴۴	۹:۳۰-۱۰	۲/۴۱-۳/۲۶
نقطه بهینه	۳۸/۸	۹:۳۰	۲/۴۱

با توجه به جدول۶ محدوده دمایی بهینه ۴۴-۳۸/۸ درجه سانتی گراد و محدوده زمانی بهینه ۱۰-۹/۵ و دامنه فعالیت آنزیمی بهینه ۳/۲۶-۲/۴۱ میلی گرم می باشد. با توجه به اینکه در دماهای پایین تر نیز می توان به نتیجه مطلوب تر دست یافت، به دلیل کاستن سطح انرژی مصرفی دمای ۳۸/۸ درجه سانتی گراد، زمان ۹/۵ ساعت و همچنین به دلیل اینکه فعالیت انجام شده از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد فعالیت آنزیمی ۲/۴۱ میلی گرم به عنوان نقاط بهینه برای هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی تون با استفاده از آنزیم تریپسین می باشد. با وجود حجم وسیعی از تولیدات جانبی ماهی تلاش بسیار کمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده در ایران صورت گرفته است. به دلیل وجود این مواد خام اولیه و ارزان در کشور پتانسیل مناسبی برای تحقیق و تجاری سازی پروتئین هیدرولیز شده وجود داشته، که نه تنها باعث کاهش آلودگی های زیست محیطی می گردد بلکه تولید فرآورده ای با ارزش افزوده را به دنبال خواهد داشت. در تحقیق حاضر تاثیر زیاد دما و زمان و نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا در زمان هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشا ماهی تون

www.SID.ir

Archive of SID

زردباله بر روی راندمان بازیافت پروتئینی به خوبی مشهود بوده است. پروتئین هیدرولیز شده راندمان بالایی از بازیافت پروتئین، حدود ۷۵ درصد، را نشان داده است. پروتئین های هیدرولیز شده امعاء و احشاء تون زرد باله، می تواند به عنوان یک منبع غنی از پپتیدها و اسیدهای آمینه ضروری به کار گرفته شود. نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل خوبی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ارزش غذایی بالا به منظور کاربردهای مختلف وجود دارد.

منابع

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

Baca, D.R., Pena-Vera, M.T., and Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. J. Food Sci. 56:309-314.

Beddows C. G. and Ardeshir, A. G. (1979). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture, J. Fd. Technol., 14, 603,.

Benjakul, B. and Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes, J. Agric. Food Chem., 45, 3424,.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & 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), 4105.

Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R. G. (2007). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, In Press.

Charles, R.H. (1982). Fundamental concepts in design of experiment. 3rd edition. HRW CBS College Pub. New York.Pp:120-320.

Diniz, A. M., & Martin, A. M. (1997). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (Squalus acanthias) protein: Composition of the hydrolysates. International Journal of Food Science and Nutrition, 48, 191–200.

FAO, animal feed resources information system. 2003.

Gildberg, A., Batista, I., & Strom, E. (1989). Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnology Applied Biochemistry, 11, 413–423.

Guerard, F., Duffose, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (Thunnus albacares) wastes using alcalase. Journa of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 11, 1051–1059.

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

Hoyle, N. and Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (Clupea harengus), J. Food Sci., 59, 76,.

Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40(1):43–81.

Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in enzymology (Vol. 3, pp. 450). New York: Academic press, Ind.

Mahendrakar, N.S.(2000). Aqua feeds and meat quality of cultured fish. In: John, G., Ninawe, A.S. (Eds.), Aquaculture – Feed and Health. Biotech. Consort. India Ltd., New Delhi, pp. 26–30.

Mullaly, M.M., O'Callaghan, D.M., Fitzgerald, R.J., Donnelly, W.J., Dalton, J.P. (1995). Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. J. F ood Sci. 60 (2), 227–233.

Myers,R.H., and Montgomery, D.C. (2002) . Response surface methodology, Process and product optimization using designed experiments. 2nd edition. John Wiley & Sons.Pp: 145-202.

Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. (2005).Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. J. Food Engg. 70, 571–578.

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

Ovissipour, M. R., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Esmaeili Molla, A. (2009b). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon Huso huso using Alcalase. Intel Aqu Res, 2009. In Press.

Petersen, B. R. (1981) The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of proteins, in Enzymes and Food Processing, Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, 149–175.

Quaglia, G. B. and Orban, E. (1990). Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of

www.SID.ir

Archive of SID

sardine (Sardina pilchardus) protein hydrolysates, J. Food Sci., 55(6), 1571.
Raa, J. and Gildberg, A (1982)., Fish silage: a review, CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr., 14, 383.
Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T., and Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value, J. Food. Sci., 56, 309.
Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, Regenstein JM, Gildberg A, Rasco B. 2009. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (Thunnus albacares) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food Bioprocess Technol, DOI 10.1007/s11947-009-0225-8.
Shahidi, F., Han, X-Q., and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus), Food Chem., 53, 285.
Simpson, B. K., Nayeri, G., Yaylayan, V., & Ashie, N. A. (1998). Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chemistry, 61(1/2), 131–138.
Surowka, K. and Fik, M. (1992). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate, Int. J. Food Sci. Technol., 27, 9,
Viera, G. H. F., Martin, A. M., Saker-Sampaiao, S., Omar, S., and Goncalves, R. C. F.(1995).Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (Panulirus spp.) processing wastes, J. Sci. Food Agric., 69, 61.
Vidotti, R.M. Viegas, E.M.M. Carneiro, D..J., Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. Animal Feed Science and Technology, 105, 199-204. 2003.

www.SID.ir

Archive of SID

Effect of Different Ratio of Trypsin Enzyme, Times and Temperatures on Protein Recovery of Viscera Yellow Fin Tuna (*Thunus albacores*)

M. Modanlow [1*]- G.R. Rafiee [2]- A. Motamedzadegan [3]- S. Moeeni [4] - A. Mirvaghefi [5]- M. R. Ovissipour [6]

Received: 15-08-2010
Accepted: 16-08-2011

Abstract

In present paper the optimum extraction condition of protein of Hydrolysate from the viscera of yellow fin tuna (*Thunus albacores*) were studied. Enzyme hydrolysis has been performed at enzyme to substrate ratio: 1.3-3.7 mg/gr.protein , time of reaction: 1-10 hours, temperature: 30-44 ºC and using RSM method and central composite design(CCD) with 4 repetitions at central point and five levels of each treatment. Results have been compared with average at statistical level where $\alpha = 0.05$. According to results,the protein recovery increases with an increase in enzyme activity from 1.3 to 2.5 mg When enzyme activity increases to 3.35 mg, the protein recovery reaches a constant level and then decreases with an extra increase of enzyme amount to 3.7 mg.The rate of protein recovery increases, With an increase in temperature from 30 ºC to 37 ºC,And then the enhancement of recovery rate decreases with more increase of temperature from 37ºC to 42ºC, However it will remain constant for temperatures beyond 42ºC.The protein recovery decreases With increasing the hydrolysis time between 60 to 138 min. and it reaches a stationary phase somehow during 138 to 330 min.In optimum point of hydrolysis, protein recovery was 75%. This condition were observed in enzyme ratio of 2.41 mg ,Temperature of 38.75ºC,and hydrolysis time of 570 min. Results showed that protein recovery is mainly influenced by ratio of enzyme to substrate rate and temperature ,while time of hydrolysis should be considered as a function of temperature and enzymatic ratio.

Keywords: Protein hydrolysate, Protein recovery, Optimization, Waste of yellow fine tuna, Trypsin

1- Dept. of Fisheries And Environmental Science, Tehran Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.
(*- Corresponding author Email: M.Modanlow@gmail.com)
2&5-Assistant Prof.,Dept.of Fisheries And Environmental Science,Tehran Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.
3- Assistant Prof., Dept. of Food Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.
4- Prof., Dept of Food science, Tehran Agricultural Science and Natural Resources University ,Iran.
6- Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.

www.SID.ir