

## تعیین طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم نیوتراز

بهاره داورنیا<sup>۱\*</sup> - علی معتمد زادگان<sup>۲</sup> - غلامحسین اسدی<sup>۳</sup> - عبدالمحمد عابدیان<sup>۴</sup> - محمود رضا اویسی پور<sup>۵</sup>

تاریخ دریافت: ۸۹/۷/۱۱

تاریخ پذیرش: ۹۱/۱/۲۵

### چکیده

هیدرولیز آنزیمی ماهی تون زرد باله (*Thunnus Albacares*) با بکارگیری آنزیم نیوتراز توسط روش RSM<sup>۶</sup> با استفاده از طرح فاکتوریل (CCD) مورد مطالعه قرار گرفت. طول زنجیره پپتیدی (PCL) به عنوان سطح پاسخ به شرایط هیدرولیز (فعالیت آنزیمی، دما، زمان) برآورد شد. ضریب رگرسیون  $R^2=0/84$  برای طول زنجیره پپتیدی در مدل ریاضی پیش‌بینی کرد که ۸۴ درصد تغییر در میزان مطالعه شده به‌وسیله مدل قابل توضیح است. فعالیت آنزیم ۳۷ Au/Kg، دما ۵۰<sup>0C</sup> و زمان هیدرولیز ۱۳۰ دقیقه به عنوان شرایط مطلوب به‌دست آمد. هیدرولیز پروتئین ماهی تون زرد باله میزان پروتئین بالا (۷۴/۵۶ درصد) و میزان لیپید کمی (۱/۸۶ درصد) داشته است. شاخص شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده نشان می‌دهد که آن نیازهای تغذیه‌ای بچه‌ها در سن ۱۰-۱۲ سال را به غیر از لیزین و متیونین پوشش می‌دهد و لیزین و متیونین به‌ترتیب اولین و دومین اسید آمینه محدودکننده بودند. ولیزین با توجه به نیاز بچه ۵-۲ سال اسید آمینه غالب بود. الگوی الکتروفوریک نشان می‌دهد، وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده کمتر از ۱۰ کیلو دالتون است. می‌توان نتیجه گرفت با هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی تون زردباله ویژگی‌های پروتئین هیدرولیز شده بهبود بخشیده می‌شود.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، ماهی تون زرد باله، نیوتراز، بهینه سازی، RSM

### مقدمه

منابع خوراکی دریایی میزول گردد و مطالعات بیشتری در زمینه آبریان انجام گیرد. به هر حال وجود نیازهای تغذیه‌ای به خصوص در کشورهای در حال توسعه و امکان تأمین قسمتی از آن از طریق منابع دریایی، ضرورت شناخت، توجه و بهره‌گیری از این منابع را به خوبی نشان می‌دهد (رضوی شیرازی، ۱۳۷۳).

از آنجایی که بخش اعظمی از تون ماهیان، طی فرآیند کنسروسازی تبدیل به کنسرو می‌شوند، ضایعات حاصل از این صنعت می‌تواند ۵۰ درصد مواد خام اولیه را شامل گردد، در بین ضایعات تولید شده امعاء و احشاء ماهی تون، منبع غنی از پروتئین با ارزش غذایی بالا می‌باشد که از لحاظ ترکیب و تنوع اسید آمینه در وضعیت مناسبی قرار دارد (Guerard et al., ۲۰۰۲).

صید جهانی کل تن ماهیان (هفت گونه) در سال ۲۰۰۷، ۴۲۳۰۸۰۹ تن بوده است. هر چند این میزان صید نسبت به سال ۲۰۰۶، ۰/۹۴ کاهش داشته است، اما روند کلی صید تن ماهیان از سال ۱۹۵۰ تا ۲۰۰۷ روند افزایشی داشته است (FAO, ۲۰۱۰). از

سیر رو به رشد جمعیت جهان و متعاقب آن افزایش نیازهای پروتئینی این جمعیت و کمبود مواد غذایی به خصوص پروتئین با کیفیت بالا، سبب گردیده است تا در دو دهه اخیر توجه خاصی به

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

(\*- نویسنده مسئول: Email: bahareh\_davarnia@yahoo.com)

۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده مهندسی زراعی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

۳- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران

۴- دانشیار دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی تربیت مدرس نور

۵- دانشجوی فوق دکتری، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه واشنگتن

6- Response Surface Method

7- Peptide Chain Length

انجام شده است که شامل استفاده از عضله و پوست ماهی کاپلین (*Malottus villosus*) (Gildberg and Raa., ۱۹۹۳) و (۱۹۹۵) (*Clupea* (Hoyle and Shahidi *et al.*, ۱۹۹۴) و ماهی هرینگ (Merritt, ۱۹۹۴) *harengus*) (Diniz ۱۹۹۷) and Martin, ضایعات ماهی تون با استفاده از آنزیم Umamizyme (۲۰۰۲) Guerard *et al.*, ماهیچه و امعاء و احشای آزاد ماهیان (Sathivel *et al.*, ۲۰۰۵) و (Kirstinsson and ۲۰۰۰) (Gboyouri *et al.*, ۲۰۰۴) Rasco., ماهی ساردین کامل و امعاء و احشاء ساردین (Souissi *et al.*, ۲۰۰۷) (Quaglian and ۱۹۸۷, ۱۹۹۰) orban., پوست ماهی کپور علفخوار (Wasswa *et al.*, ۲۰۰۷) و کپور هندی می باشد (Bhaskar *et al.*, ۲۰۰۸).

هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های ماهی مخلوطی از آمینو اسیدهای آزاد، دی، تری و الیگوپپتید را به وجود می‌آورد و گروه‌های قطبی و انحلال پذیری هیدرولیز شده‌ها را افزایش می‌دهد. بنابراین باعث اصلاح خصوصیات کاربردی و بهبود کیفیت کاربردی آن‌ها می‌شود. اثر آنزیم در خصوصیات کاربردی پپتید مهم است، زیرا تاثیر زیادی بر روی سایز مولکول‌ها و هیدروفوبیتی هیدرولیز شده‌ها دارد (Moreno ۱۹۹۳, and Cuadrado, بنابراین پپتیدهای به دست آمده پروفایل مولکولی متفاوت و سطح انرژی متفاوت دارند و بسته به آنزیم به کار برده شده این تنوع با خصوصیات کاربردی مخلوط ارتباط دارد (Kristinsson *et al.*, ۲۰۰۰). طول زنجیر پپتیدی به میزان هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئین هیدرولیز شده دارد. تحقیقاتی در زمینه بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده از آبزیان وجود دارد که از آن جمله می‌توان به تحقیقات Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) و Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) اشاره کرد. به طور کلی هیدرولیز محدود آنزیمی می‌تواند سبب بهبود خواص کارکردی نظیر ویژگی‌های امولسیون کنندگی شود (۲۰۰۹) Ovissipour *et al.*, هدف از این پژوهش تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله با آنزیم نیوتراز است و جهت بهینه‌سازی شرایط تولید پروتئین هیدرولیز شده اثر شرایط (نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، زمان) به عنوان فاکتور بحرانی در تولید پروتئین هیدرولیز شده مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

**مواد خام اولیه:** ماهی تون زرد باله (*Thunnus Albacares*) در سواحل جنوبی ایران در بندرعباس در بهار سال ۱۳۸۸ به روش رشته نخ طویل صید شده و فوراً به صورت یخ زده در دمای  $20^{\circ}\text{C}$  - به شمال ایران منتقل شدند و امعاء و احشاء از ماهی منجمد با اره برقی

سویی با توجه به این که سالانه در ایران، حجم بالایی از صید تون ماهیان به عنوان ماده خام اولیه صنعت کنسروسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد و به دنبال آن حجم بالایی از ضایعات سرشار از پروتئین مناسب تولید می‌شود به نظر می‌رسد که پتانسیل مناسبی برای تبدیل این مواد خام کم ارزش به فرآورده‌هایی با ارزش افزوده بالا وجود دارد.

اگر چه مقادیری از ضایعات ماهی به عنوان خوراک دام استفاده می‌شود اما مقادیر عظیمی از محصولات جانبی غنی از پروتئین در کارخانجات فرآوری ماهی، بدون اینکه هیچ تلاشی برای بازیافت آن‌ها صورت بگیرد، دور ریخته می‌شود (Arnesen and Gildberg, ۲۰۰۷; Bhaskar *et al.*, ۲۰۰۸; Gildberg, ۲۰۰۱) درحالی که بسیاری از تولیدکنندگان مجاز به دور ریختن این ضایعات در دریا نبوده و باید قبل از دور ریختن با صرف هزینه بالا اقدام به تصفیه این ضایعات کنند (Ovissipour *et al.*, ۲۰۰۹). تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده یکی از موارد استفاده بهینه از این ضایعات و ایجاد ارزش افزوده می‌باشد. یکی از راه‌های استفاده مناسب از ضایعات آبزیان، هیدرولیز آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های تجاری است. به طور کلی ویژگی پروتئین هیدرولیز شده، روی خاصی مانند درجه حالیت، رسکوزیه، پروفیل اسیدهای آمینه، محتوای پروتئین، وزن مولکولی، آب دوستی و قطبیت گروه‌های مختلف تاثیرگذار بوده و می‌تواند به طور غیرمستقیم، هضم و جذب آن‌ها را در دستگاه گوارش تحت تاثیر قرار دهد (Esp *et al.*, ۱۹۹۹). پروتئین هیدرولیز شده کاربردهای متعددی از جمله در جیره غذایی آبزیان به عنوان مکمل پروتئین (Baskar *et al.*, ۲۰۰۸) و به عنوان اجزای غذایی حیوانات، اجزای پیتونی محیط رشد میکروبی یا غنی‌سازی خاک کاربرد دارد (Aspmo *et al.*, ۲۰۰۴) و در بیماری‌هایی که اختلالات گوارشی دارند یعنی در جذب مواد غذایی از معده و روده دچار اختلال می‌باشند مورد استفاده قرار می‌گیرد (Neklyudov *et al.*).

ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) یکی از ماهیان تون است که میزان صید آن در مناطق جنوبی ۴۱۰۰۰ تن است (IFO, ۲۰۰۶). بیشترین مقدار ماهی تون به کنسرو تبدیل می‌شود که این می‌تواند میزان بالایی از ضایعات را تولید کند. بنابراین با توجه به وجود مقادیر زیادی از ضایعات عمل‌آوری آبزیان در کشور به نظر می‌رسد که پتانسیل مناسبی جهت استفاده از آنزیم‌های تجاری مانند نیوتراز برای هیدرولیز پروتئین‌ها و تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با کاربردهای متنوع وجود دارد. یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی کاهش هزینه و اقتصادی بودن این عمل است (Krisinsson and Rasco, ۲۰۰۰).

به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده از آبزیان، می‌توان از منابع مختلف مانند ضایعات امعاء و احشاء، پوست، سر، استخوان، صید ضمنی و حتی ماهی کامل استفاده نمود. تحقیقات زیادی در این زمینه

۸۰۰۰ در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شده سپس با قاشق، چربی، از روی لوله‌ها جدا گردیده و پروتئین هیدرولیز شده که حالت مایع دارد از قسمت جامد جدا شده و سپس پروتئین‌های هیدرولیز شده در داخل ظروف ریخته می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در فریزر قرار داده می‌شود و سپس با استفاده از دستگاه فریز درایر (Operon, Epu-۷۰۱۲، کره جنوبی) در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد اقدام به خشک کردن کرده تا به صورت پودر درآید (Kristinsson and Rasco, ۲۰۰۰).

#### اندازه‌گیری شیمیایی

محتوای رطوبت ضمن خشک کردن در آون در دمای  $2 \pm 105^\circ\text{C}$  تا حصول وزن ثابت اندازه‌گیری شد (AOAC, ۲۰۰۲). میزان خاکستر به‌وسیله سوزاندن نمونه در دمای  $600^\circ\text{C}$  تعیین شد (AOAC, ۲۰۰۲).

میزان کل پروتئین در مواد خام ( $N \times 6.25$ ) به روش کلدال به‌دست آمد (AOAC, ۲۰۰۲). کل لیپید در نمونه‌ها به‌وسیله روش سوکسله با حلال تعیین شد (AOAC, ۲۰۰۲). میزان پروتئین در سوپرناتانت بعد از سانتریفیوژ با روش بیورت اندازه‌گیری شد. سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد بکار برده شد و جذب با اسپکتوفوتومتر 5UV/VIS ۶۳۰ (Jenway، انگلستان) در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد (Layne, ۱۹۵۷).

#### اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز بر طبق روش (Hoyle and Merit, ۱۹۹۴)، انجام شد، حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده و محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد اضافه شده و پس از سانتریفیوژ (Hermle labortechnik, GmbH Z ۲۰۶ A، آلمان) در دمای  $20^\circ\text{C}$  با دور ۶۷۰۰g غلظت پروتئین محلول در تری کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به روش بیورت تعیین شد. درجه هیدرولیز (DH) طبق فرمول (۱) به‌دست می‌آید.

$$DH (\%) = \frac{\text{نیترژن محلول در نمونه TCA } 10\%}{\text{نیترژن کل در نمونه}} \times 100 \quad (1)$$

#### اندازه‌گیری طول زنجیره پپتیدی

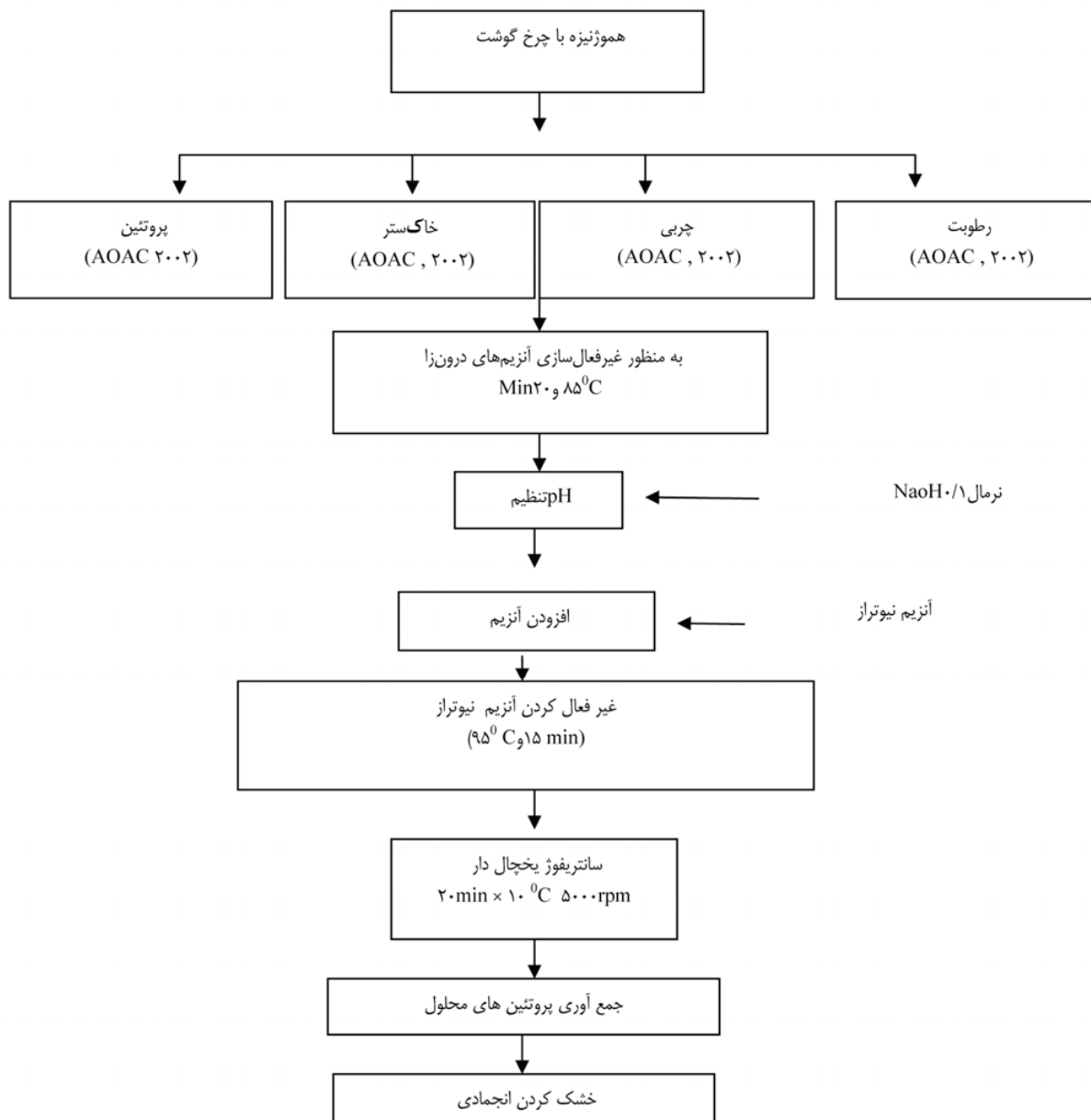
برای اندازه‌گیری طول تقریبی زنجیره پروتئینی (PCL) حاصل از هیدرولیز با آنزیم نیوتراز از روش Olsen, Alder - Nissen (۱۹۹۷) استفاده شد. PCL از روی درجه هیدرولیز به کمک معادله ۲ محاسبه شد.

$$PCL = \frac{100}{\%DH} \quad (2)$$

در کارخانجات کنسرو سازی شهرک صنعتی میروود بابلسر جداسازی شد و فوراً ظرف مدت ۱ ساعت در ظروف یونولیتی به آزمایشگاه دانشکده علوم دریایی و منابع طبیعی تربیت مدرس واقع در شهرستان نور منتقل گردید. نمونه‌ها به محض رسیدن با دستگاه چرخ گوشت با سرعت متوسط (قطر منافذ ۵ mm) کاملاً چرخ شده و در بسته‌های پلاستیکی به‌صورت ۵۰ گرمی که با ترازوی دیجیتالی توزین شده بسته‌بندی گردید و سپس در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده و تا شروع آزمایش در همین حالت نگهداری شدند. برای انجام آزمایش نمونه‌ها انجماد زدایی گردیدند.

**آنزیم:** برای انجام آزمایشات از آنزیم نیوتراز استفاده شد نیوتراز یک اندو پروتئاز باکتریایی است نام دیگر آن bacillolysin است و یک متالو اندوپپتیداز است که به‌وسیله باکتری *Bacillus amyloliqui* تولید می‌شود شرایط کاری مطلوب برای نیوتراز  $L$  ۰/۸ pH = ۵/۵-۷/۵ و در دمای  $45^\circ\text{C}$ - $55^\circ\text{C}$  است نیوتراز  $L$  ۰/۸ فعالیت  $\frac{AU}{mg}$  دارد و از شرکت نوو آنزیم خریداری شد و تا زمان مصرف در دمای  $4^\circ\text{C}$  نگهداری شد.

**تهیه پروتئین‌های هیدرولیز شده:** امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله ابتدا با چرخ گوشت با دور متوسط (سایز صفحه ۵mm) خرد و چرخ شده و در بسته‌های پلاستیکی به‌صورت ۵۰ گرمی که با ترازوی دیجیتالی (TE, ۳۱۳, Sartorius، آلمان) توزین شده بسته‌بندی شد و در فریزر در دمای  $20^\circ\text{C}$ - تا شروع انجام کار قرار گرفت، در مرحله شروع به کار بسته‌ها از فریزر خارج شده و هر بسته در درون ارلن مایر ریخته شد و به نسبت ۱ به ۲ وزنی/حجمی آب مقطر به آن‌ها اضافه شد و با میکسر (Jaltajhiz، ایران) به مدت ۱ دقیقه هموژنیزه شد و سپس در حمام آبی (W, ۶۱۴-B، فاطرریز پرداز، ایران) در دمای  $85^\circ\text{C}$  به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. هدف از این عمل، غیر فعال نمودن آنزیم‌های داخلی بود (Gaerard et al., ۲۰۰۹). (Ovissipour et al., ۲۰۰۹). pH محلول‌های مورد نظر با pH متر (Metrohm، ۸۲۷ سوئیس) اندازه‌گیری شد. pH محلول حدود ۶ بود که با اضافه کردن هیدروکسید سدیم یک نرمال pH محلول به ۷/۵ رسانیده شد که (pH اپتیمم آنزیم نیوتراز است) سپس آنزیم نیوتراز طبق جدول ۲ با میکروسپلر اضافه شد و نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور شیکردار (Comecta, Ivy men system، اسپانیا) با دور ثابت ۲۰۰۰ rpm قرار گرفتند. (همه واکنش‌ها در لوله‌های شیشه‌ای ۲۵۰ ml با میزان سوستر ۵۰ گرم انجام شد) دما و زمان مورد نظر بر روی انکوباتور شیکر تنظیم شد. پس از سپری شدن مدت مورد نظر، مخلوط در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به منظور غیر فعال نمودن نیوتراز قرار داده شد (Guerard ovissipour et al., ۲۰۰۲). (Guerard ovissipour et al., ۲۰۰۹) *al.* پروتئین‌های هیدرولیز شده سرد شده و در سانتریفیوژ با دور  $g$



شکل ۱- فرآیند آنزیمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده

و Knauer و RF-۵۳۰) آنالیز شد. Breez software برای آنالیز داده‌ها به کار برده شد (Cohn and Michaud, ۱۹۹۳).

#### شاخص شیمیایی

شاخص شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) و Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) محاسبه گردید. به‌طور خلاصه این شاخص طبق معادله ۳ بیان

#### ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی در آن با دمای  $110 \pm 1^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۶ مولار HCl قرار گرفت. مشتق‌سازی با افتال دی آلدهید قبل از آنالیز با HPLC اتفاق افتاد. کل آمینواسیدها به‌وسیله HPLC با ستون نوع ۱۸ C با سرعت جریان  $1\text{ ml min}^{-1}$  با آشکار کننده فلورسانس (Germany)

برای تحلیل داده‌ها و بیان روابط بین متغیرها از تحلیل رگرسیونی استفاده شد. روش رگرسیون سطح پاسخ (RSREG) با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS، نسخه 9/1) به منظور پردازش معادله چندجمله‌ای (۳) استفاده شد.

که در آن  $Y$ ، نشان دهنده متغیر تابع یا مستقل یا متغیر پاسخ (طول زنجیره پپتیدی) است.

$B$  (عرض از مبدأ) عدد ثابت،  $B_{11}, B_{12}, B_{21}, B_{22}$  ضرایب مدل رگرسیون و  $X_1, X_2$ ، پایه‌های متغیرهای مستقل به شکل کدبندی شده هستند. که تاثیر خطی و درجه دوم و متقابل  $X_1, X_2, X_1 X_2$  را بر پاسخ نشان می‌دهد. این مدل تاثیر هر متغیر مستقل را ارزیابی می‌کند (Cao et al., 2008).

در روش RSREG، پارامترهای یک معادله درجه دوم کامل که تشکیل سطح می‌دهند، بر داده‌ها برازش شده و مقادیر بهینه هر یک از پارامترها و سطح حاصل از معادله درجه دوم بر داده‌های برازش داده شده، تعیین می‌شود، سپس نمودارهای سطح پاسخ، کانتور، با استفاده از نرم‌افزار MATLAB، نسخه ۶/۵ رسم شده و در آن تابع بودن دو متغیر مستقل در حالی نشان داده شد که متغیر مستقل دیگر، در مقدار بهینه ثابت نگه داشته شده بود.

فعالیت آنزیم، زمان و دما به عنوان متغیرهای مستقل انتخاب شدند. محدوده و مقادیر نقطه مرکزی برای این سه متغیر براساس نتایج آزمایشات اولیه در محدوده اعداد ذکر شده در جدول ۲ قرار داشتند و طول زنجیره پپتیدی به عنوان متغیره وابسته برای ترکیبی از متغیرهای مستقل انتخاب شد.

## نتایج و بحث

**اندازه‌گیری شیمیایی:** ترکیب شیمیایی ضایعات ماهی تون زردباله به عنوان ماده خام اولیه و پروتئین هیدرولیز شده در جدول ۳ داده شده است. در ضایعات ماهی تون زردباله میزان پروتئین ۲۱/۵ درصد و میزان چربی آن ۵/۰۸ درصد بوده است. میزان پروتئین در هیدرولیز شده‌ها ۷۴/۵۶ درصد می‌باشد که با گزارشات به دست آمده Shahidi و همکاران (1995)، Shahidi و Onodenalore (2000b) و Nilsang و Kristinsson (1996)، Wasswa و همکاران (2007)، Soussi و همکاران (2007)، Bhaskar و همکاران (2008) و Ovissipour و همکاران (2009) مطابقت دارد. میزان لیپید در پروتئین هیدرولیز شده ماهی تون زردباله در مطالعه جاری به ۱/۸۶ درصد رسید.

Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۰۹ با بکار بردن آنزیم آلکالاز میزان لیپید هیدرولیز شده‌های ضایعات ماهی خاویاری قهربرون (Persian sturgeon) را بعد از ۲۰۵ دقیقه و ۲۰۵ دقیقه و ۱۰۰ پروتئین، ۰/۱۸ درصد یافتند.

می‌گردد.

(۳)

اسید آمینه ضروری در پروتئین نمونه ( $g^{-1} \cdot 100$ )

$\times 100 =$  شاخص شیمیایی

اسید آمینه ضروری در پروتئین استاندارد ( $g^{-1} \cdot 100$ )

## پیش بینی ضریب کارایی پروتئین<sup>۱</sup>

ضریب کارایی پروتئین برای ماهی تون زردباله بر طبق معادله Alsmeyer و همکاران (۱۹۷۴) که توسط Lee و همکاران (۱۹۷۸) و Shahidi و همکاران (۱۹۹۵) بهبود داده شده، محاسبه گردید این معادلات در جدول ۱ داده شده است.

جدول ۱- معادلات ضریب کارایی پروتئین

شماره معادلات	معادلات <sup>a</sup>
۱	$-0.104 [\text{Tyr}] - 0.486 [\text{Leu}] + 0.454 [\text{Met}] + 0.435 [\text{His}]$
۲	$-1/816 [\text{Tyr}]$
۳	$0.808 [\Sigma AA_7] - 0.1094$
۴	$0.6320 [\Sigma AA_{10}] - 0.1039$

<sup>a</sup> $\Sigma AA_7 = \text{Thy} + \text{Val} + \text{Met} + \text{Ile} + \text{Leu} + \text{phe} + \text{Lys}$ ;  $\Sigma AA_{10} = \Sigma AA_7 + \text{his}$

## وزن مولکولی

الکتروفورز SDS-PAGE<sup>۲</sup> (انگلستان، cleaver) در همه نمونه‌ها با ۴۰٪ ژل متراکم کننده<sup>۳</sup> و ۱۵٪ ژل جداکننده انجام شد. طبق روش (Laemmli، ۱۹۷۰) غلظت پروتئین در نمونه به روش بیورت تعیین شده است (Layne، ۱۹۷۰). مارکر پروتئین از شرکت مرک آلمان (بوین، آلبومین، ۶۶ KDa؛ اووآلبومین جوجه ۴۵ KDa؛ گلیسرالدهید ۳- فسفات دهیدروژناز خرگوش؛ ۳۶ KDa؛ بوین، کربونیک انهیدراز؛ ۲۹ KDa؛ بوین، تریسیتزن، PMSF- Treated ۲۴ KDa؛ سویا، ممانعت کننده تریپسین ۲۰/۱ KDa؛ بوین، آلفا لاکتوآلبومی، ۱۴/۲ KDa) و آپروتینین (۸KDa) خریداری شد.

## آنالیز داده‌های نتایج

در این پژوهش از طرح آزمایشی CRCD با ۴ تکرار در نقطه مرکزی و ۵ سطح از هر تیمار استفاده گردید. سطوح مورد استفاده به فاصله +۱، -۱، +a، -a از نقطه مرکزی قرار داشتند. فاکتور a معادل ۱/۶۸ می‌باشد.

- 1- Protein efficacy Ratio
- 2- Spodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamid Gel Electrophoresis
- 3- Stacking gel

$$Y = B_0 + \sum_{i=1}^3 B_i X_i + \sum_{i=1}^3 B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^3 \sum_{j=i+1}^3 B_{ij} X_i X_j \quad (3)$$

جدول ۲- میزان پایه‌های کدبندی شده بکار برده شده در آزمایش بهینه‌سازی

عامل	پایه‌ها				
	-α	-۱	۰	+۱	+α
فعالیت آنزیمی (X <sub>۱</sub> ) (AU /kg protein)	۱۳	۲۰	۳۰	۴۰	۴۷
دما (X <sub>۲</sub> ) (°C)	۳۲	۳۷	۴۵	۵۳	۵۹
زمان (X <sub>۳</sub> ) (min)	۵۰	۷۸	۱۲۰	۱۶۲	۱۹۱

$$\alpha=1/68$$

جدول ۳- ترکیبات شیمیایی ماده خام اولیه و پروتئین هیدرولیز شده (درصد)

پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
۲۱/۵ ± ۰/۵	۵/۰۸ ± ۱/۵۳	۶۹/۶۶ ± ۲/۳۲	۶/۴۶ ± ۱/۲۱
۷۴/۵۶ ± ۱/۲۳	۱/۸۶ ± ۰/۲۷	۳/۲۴ ± ۰/۸۶	۱۹/۳۸ ± ۰/۹۴

$$\pm SD(n=3) \text{ میانگین}$$

معادله چند جمله‌ای درجه دوم برای داده‌های آزمایشی استفاده شده تمام ضرایب ساده (X<sub>۱</sub>, X<sub>۲</sub>, X<sub>۳</sub>)، درجه دوم (X<sub>۱۱</sub>, X<sub>۲۲</sub>, X<sub>۳۳</sub>) و اثرات متقابل آن‌ها (X<sub>۲۱</sub>, X<sub>۳۱</sub>, X<sub>۳۲</sub>) برای بررسی معنی‌دار بودن با آزمون t محاسبه و ضرایب برآورده شده برای مدل‌های رگرسیونی هر یک از فعالیت آنزیمی، دما و زمان بر طول زنجیره پپتیدی در جدول ۵ آمده است. به منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برآزش شده، تمام ضرایب فاقد معنی (P > ۰/۰۵) حذف شدند و ضرایب معنی‌دار براساس معادله چند جمله‌ای (۴) به صورت مدل برآزش شده در زیر آورده شده است:

$$y = 2/99 - 1/02 X_1 + 0/54 X_2^2 + 0/48 X_3^2 \quad (4)$$

مقادیر مشاهده شده ترکیبات متفاوت متغیرهای مستقل برای طول زنجیره پپتیدی در جدول ۴ ارائه شده است. بر طبق جدول ۵ آنالیز واریانس اثرات ساده متغیرها نشان می‌دهد، با توجه به سطح معنی‌داری فعالیت آنزیمی (P < ۱/۰۱) اما زمان و دما بر طول زنجیره پپتیدی تاثیر معنی‌دار نداشتند (P > ۰/۰۵). بر اساس نتایج آنالیز واریانس جدول ۵ برآیند کلی اثرات ساده متغیرها در مورد طول زنجیره پپتیدی در سطح اطمینان ۹۵ درصد معنی‌دار شد، علاوه بر این اثرات خطی (P < ۰/۰۱) و اثرات درجه دوم (P < ۰/۰۵) معنی‌دار و اثرات متقابل معنی‌دار نشد (P > ۰/۰۵). مقدار P به عنوان ابزاری برای بررسی معنی‌دار بودن هر جمله بکار برده شد. کیفیت تناسب مدل به وسیله R<sup>۲</sup> تعیین شد. میزان R<sup>۲</sup> (ضریب رگرسیون) طول زنجیره پپتیدی در تحقیق ما ۰/۸۴ است که نشان می‌دهد ۸۴ درصد تغییرات پاسخ به وسیله مدل قابل توضیح است و تناسب خوبی را با داده‌های آزمایش نشان می‌دهد.

میزان لیپید در FPH به میزان زیادی در مقایسه با ماده خام کاهش یافته است و علت آن احتمالاً مربوط به جدا شدن چربی همراه با پروتئین نامحلول است که به وسیله جداسازی با سانتریفیوژ حذف می‌شود (Kristinsson and Rasco, ۲۰۰۵b; Nilsang, ۲۰۰۵; Ovissipour et al., ۲۰۰۹). بنابر این مقدار اندکی لیپید برای شرکت در اکسیداسیون چربی وجود خواهد داشت (Diniz and Martin., ۱۹۹۷). پیش فراوری حرارتی باعث شکل گیری امولسیون‌های چربی و پروتئین شده و کارایی هیدرولیزاسیون کم و میزان چربی بالا می‌رود (Kristinsson and; Rasco, ۲۰۰۰; Slyzite et al., ۲۰۰۰a,b,c).

پیش فراوری مواد خام به منظور دو هدف انجام می‌گیرد:

۱- غیرفعال سازی آنزیم‌های داخلی (Guerad et al., ۲۰۰۱)

۲- حذف آسان چربی (Bhaskar et al., ۲۰۰۷)

کاهش در میزان لیپید پروتئین‌های هیدرولیز شده در پایداری اکسیداسیون لیپیدها نقش چشمگیری دارد و این ممکن است پایداری محصول را افزایش دهد (Diniz and; ۱۹۹۵; Shahidi et al.; Kristinsson and Rasco ۲۰۰۱b; Martin ۱۹۹۷). اما از سویی دیگر میزان خاکستر (Nilsang et al., ۲۰۰۵) در مقایسه به ضایعات ماهی تون زرد باله در این مطالعه بالاتر است (Kristinsson and Rasco, 2000b; Nilsang et al., 2005).

بهینه‌سازی پارامترهای هیدرولیز برای PCL

دستورالعمل RSREG در نرم‌افزار SAS به منظور برآزش

جدول ۴ - طرح مرکب مرکزی و پاسخ های متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل

مشاهدات	فعالیت آنزیم	دما	زمان	متغیرهای پاسخ
	$X_1$	$X_2$	$X_3$	PCL
۱	۱	۱	۱	۲/۵۱
۲	۱	-۱	-۱	۳/۳۲
۳	۱	۱	۱	۳/۷۵
۴	-۱	۱	۱	۳/۹۳
۵	۱	-۱	-۱	۵/۳۸
۶	-۱	-۱	-۱	۷/۶۵
۷	-۱	-۱	-۱	۵/۴۱
۸	۰	-۱	-۱	۵/۹۲
۹	۰	۰	۰	۲/۹۳
۱۰	۰	۰	۰	۴/۹۶
۱۱	۰	۱/۶۸	۱/۶۸	۳/۵۴
۱۲	۰	-۱/۶۸	-۱/۶۸	۴/۵۱
۱۳	۱/۶۸	۰	۰	۳/۲۵
۱۴	-۱/۶۸	۰	۰	۵/۱۴
۱۵	۰	۰	۰	۳/۲۸
۱۶	۰	۰	۰	۲/۹۸
۱۷	۰	۰	۰	۳/۰۰
۱۸	۰	۰	۰	۲/۹۲

جدول ۵ - آنالیز واریانس طول زنجیره پپتیدی

F سطح	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	منبع
۹/۷۵**	۰/۵۵	۱۷/۴۸	۳	رگرسیون خطی
۳/۷۵*	۰/۲۱	۶/۷۲	۳	درجه دوم
۱/۵۰	۰/۰۸	۲/۶۸	۳	متقابل
۵**	۰/۸۴	۲۶/۹۸	۹	کل باقیمانده
—	—	۴/۶۸۷	۵	عدم برازش
—	—	۰/۰۹۴	۳	خطای خالص
—	—	۴/۷۸۲	۸	خطای کل
				$r^2=0/86$
۸/۴۴**	۵/۰۴۷	۲۰/۱۹۱	۴	فعالیت آنزیمی (AU/kg protein)
۲/۴۶	۱/۴۷۲	۵/۹۸۰	۴	دما (°C)
۲/۶۲	۱/۵۶۵	۶/۲۶۲	۴	زمان (دقیقه)

\*\* معنی دار در سطح ۱%  
\* معنی دار در سطح ۵%

طول زنجیره پپتیدی با شیب بسیار تندی کاهش می یابد و در مقدار

در شکل ۲ تاثیرات متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. با افزایش مقدار آنزیم، منحنی

وجود دارد و منحنی طول زنجیره پپتیدی نسبت به زمان منحنی سهمی با تقعر رو به بالا است.

در مقادیر مختلف دمایی با افزایش زمان تا محدوده نقطه بهینه ۱۲۰ دقیقه طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. بر اساس کانتور دو بعدی (شکل ۴ب) زمان ۵۵ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۵ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۷۰ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۸۲ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۸۶/۴ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و به دو از نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به ترتیب معادل طول زنجیره پپتید ۴/۸، ۴/۴، ۴/۲، ۴/۴، ۴/۶، ۴/۸، ۴/۸ هستند.

در مقادیر مختلف دمایی با افزایش زمان تا محدوده نقطه بهینه ۱۲۰ دقیقه، طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد.

بسته به شرایط پیش فرآوری، طول زنجیره پپتیدی در تحقیق حاضر در محدوده ۳/۵-۶/۵ تغییر می‌کند، که با گزارشات به‌دست آمده از وزن مولکولی کمتر از ۱۰۰kDa مطابقت دارد که این امر بیانگر کارایی بسیار مناسب تکنیک استفاده شده در این مطالعه در هیدرولیز پروتئین ماهی تون زرد باله می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش تا حد زیادی مشابه با نتایج *Gildberg* و همکاران در (۲۰۰۲) است. آن‌ها با هیدرولیز اسکلت ماهی کاد توسط ۵ نوع آنزیم آلکالاز باکتریایی، نیوتراز، پروتامکس، تریپسین خوک و تریپسین کاد نشان دادند که پروتئازهای باکتریایی راندمان بیشتری در محلول‌سازی پروتئین‌ها داشته و اندازه مولکولی پپتیدهای به دست آمده کوچک‌تر می‌باشد ولی تا حدی طعم تلخ غالب می‌گردد. هیدرولیزهای به دست آمده به‌دلیل کاهش وزن مولکولی معمولاً ضریب هضم و جذب بالاتری نسبت به پروتئین اولیه دارند. *Liast* و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند هیدرولیزهای به دست آمده از هیدرولیز اسکلت ماهی سالمون با پروتئاز مخلوط پروتامکس به لحاظ تغذیه‌ای قابل مقایسه با کازئین شیر و یا پروتئین سویا است. پس از صید ماهی معمولاً پروتئین‌های ماهیچه توسط آنزیم‌های طبیعی تجزیه شده و ضمن کاهش وزن مولکولی گاهی ارزش تغذیه‌ای افزایش می‌یابد (*Kurokawa, 1979*). بر اساس مدل رگرسیون میزان بهینه طول زنجیره پپتیدی برآورد شد. این میزان در شرایط اپتیمم میزان آنزیمی  $Au$  ۳۷ و دمای  $50^{\circ}C$  و زمان ۱۳۰ دقیقه تخمین زده شد. طول  $kg$

زنجیره پپتیدی با افزایش مقدار آنزیمی کاهش می‌یابد و در مقدار آنزیمی ۲۷-۵۴/۶ به حداقل مقدار خود می‌رسد و اگر زمان از رنج خاصی تجاوز کند طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد.

۴۰  $\frac{Au}{kg}$  به حداقل مقدار خود می‌رسد. همان‌طور که در شکل (۲-الف)

مشاهده می‌کنید، دما تاثیر معنی‌داری بر منحنی طول زنجیره پپتیدی ندارد. در کانتور دو بعدی خطوط کانتور محور آنزیمی را در خطوط بیشتری قطع می‌کند و این امر نشان می‌دهد نسبت آنزیمی تاثیر معنی‌داری بر طول زنجیره پپتیدی دارد و با افزایش مقدار آنزیم طول زنجیره پپتیدی کاهش یافته است.

بر اساس کانتور دو بعدی (شکل ۲-ب) بازه دمایی ۵۸-۳۳ درجه

سانتی‌گراد و مقادیر آنزیمی  $\frac{Au}{kg}$  ۱۳/۵، ۱۵/۵ و  $\frac{Au}{kg}$  ۱۷ و

$\frac{Au}{kg}$  ۲۰/۵ و  $\frac{Au}{kg}$  ۲۳ و  $\frac{Au}{kg}$  ۲۷ و  $\frac{Au}{kg}$  ۳۰/۵ دو به دو از

نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به ترتیب معادل طول زنجیره پپتیدی ۳/۵، ۴/۵، ۵/۵، ۶/۵، ۷/۵، ۸/۵ درصد هستند. در شکل ۳ تاثیرات متقابل زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. طول زنجیره پپتیدی با افزایش مقدار آنزیمی با

شیب تنیدی کاهش می‌یابد و در مقدار آنزیمی  $\frac{Au}{kg}$  ۴۰ طول زنجیره

پپتیدی به حداقل مقدار خود می‌رسد. با افزایش زمان، منحنی طول پپتیدی کاهش می‌یابد، اما اگر مدت زمان از رنج خاصی تجاوز کند طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد. بالاترین طول زنجیره پپتیدی در کمترین زمان و کمترین مقدار آنزیمی مشاهده می‌گردد و در مقادیر مختلف آنزیمی با افزایش زمان تا محدوده بهینه ۱۳۰ دقیقه طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد و در زمان‌های مختلف با افزایش میزان آنزیم، طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. بر اساس کانتور دو بعدی (شکل ۳ب) بازه زمانی ۱۸۹-۵۱ دقیقه، دامنه‌های آنزیمی

$\frac{Au}{kg}$  ۱۴/۵-۱۳/۵ و  $\frac{Au}{kg}$  ۱۷/۲-۱۳/۵ و  $\frac{Au}{kg}$  ۱۸/۶-۱۴/۴ و

$\frac{Au}{kg}$  ۲۲-۱۷/۲ و  $\frac{Au}{kg}$  ۲۵-۱۸/۶ و  $\frac{Au}{kg}$  ۲۸-۲۰ و  $\frac{Au}{kg}$  ۳۳-

۲۴ و بازه زمانی ۱۶۹-۷۰ دقیقه، دامنه آنزیمی  $\frac{Au}{kg}$  ۵۴/۶-۲۷ و

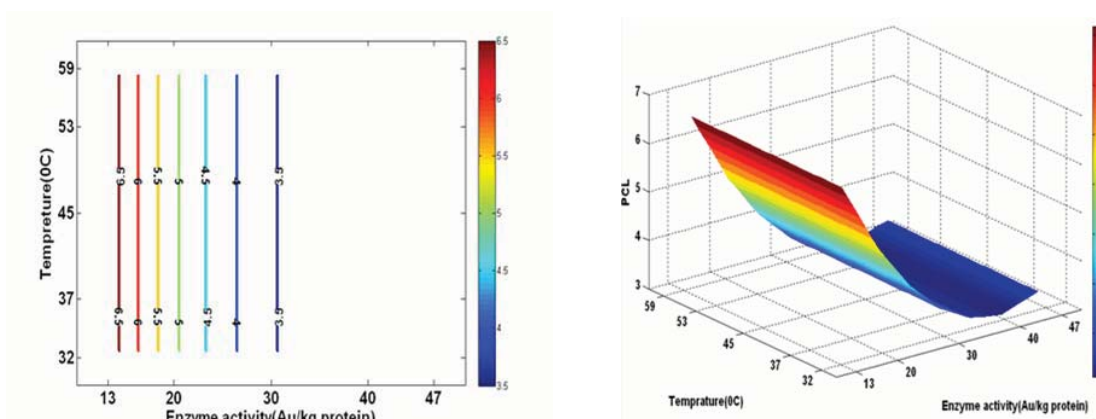
بازه زمانی ۱۴۵/۲-۹۴/۸ دقیقه، دامنه آنزیمی  $\frac{Au}{kg}$  ۴۵/۶-۳۰ دو به

دو از نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به ترتیب معادل طول زنجیره پپتیدی ۷/۵، ۶/۵، ۵/۵، ۴/۵، ۳/۵ است.

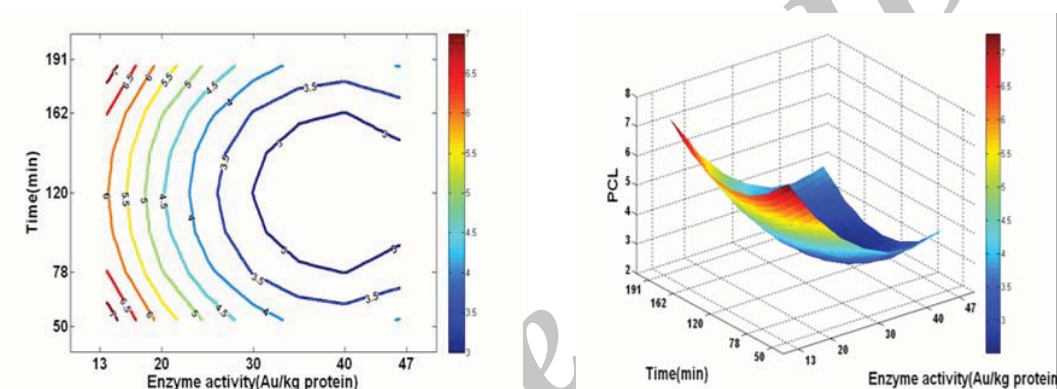
در شکل ۴ تاثیرات متقابل دما و زمان به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. با گذشت زمان مقدار و شدت هیدرولیز کم شده و طبیعتاً طول زنجیره کمتر کاهش پیدا می‌کند.

دما تاثیر معنی‌داری بر طول زنجیره پپتیدی ندارد. کانتور دو بعدی نیز نشان می‌دهد خطوط کانتور محور زمان را در نقاط بیشتری قطع کرده است. در نتیجه تاثیر زمان نسبت به دما بیشتر است؛ در کانتور دو بعدی از هر طول زنجیره پپتیدی دو خط با مقدار یکسان

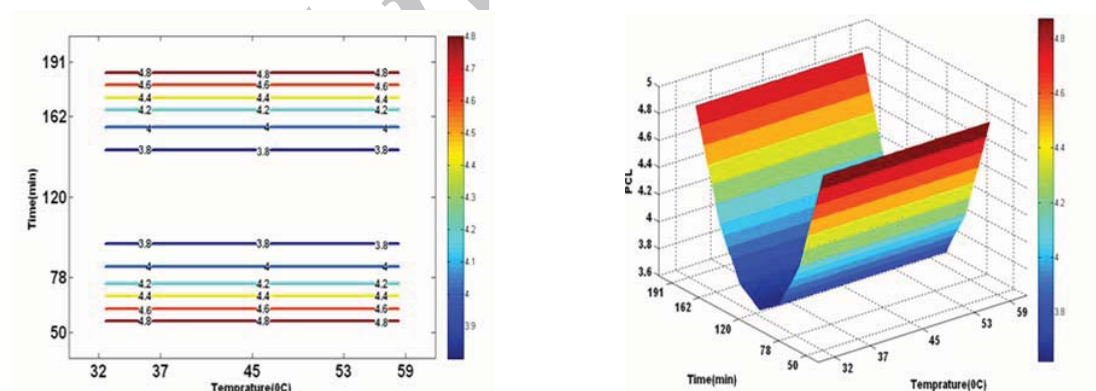




شکل ۲- سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دویبعی (ب) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و دما طول زنجیره پپتیدی



شکل ۳- سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دویبعی (ب) اثر زمان و نسبت آنزیم به سوبسترا بر طول زنجیره پپتیدی



شکل ۴- سطح پاسخ سه بعدی (الف) و کانتور دویبعی (ب) اثر دما و زمان بر طول زنجیره پپتیدی

طول زنجیره پپتیدی بیشتر می شود که علت آن مربوط به ممانعت آنزیمی است که احتمالاً آنزیم ها خودشان را هیدرولیز می کنند (Diniz and Martin, ۱۹۹۵, ۱۹۹۵).

به نظر می رسد در طول فاز اولیه هیدرولیز بخشی از پروتئین های اولیه هیدرولیز می شود و طول زنجیره پپتیدی کاهش می یابد، اما با گذشت زمان غلظت زیاد این پپتیدها در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می دهد (Shahidi *et al.*, ۱۹۹۵). در مقادیر آنزیمی پایین با کاهش درجه هیدرولیز

## پیش بینی ضریب کارایی پروتئین

افزایش وزن حیوان نسبت به پروتئین مصرفی آن محاسبه می‌شود و آن را نسبت پروتئین موثر یا ضریب کارایی پروتئین موثر می‌نامند. مقدار PER به‌دست آمده بر طبق جدول ۶ در رنج ۳/۸۲-۲/۳۳ گزارش شد که بر طبق جدول میزان PER به‌دست آمده برای ماهی کاد ۲/۸۷-۳/۲۴ و برای کاپلین ۲/۶۱-۳/۱۱ بوده که به وسیله شهیدی و همکاران در سال ۱۹۹۵-۱۹۹۱ گزارش شده است. میزان PER برای تاسماهی ایرانی که توسط اویسی پور و همکاران در سال ۲۰۰۹ محاسبه شده در دامنه ۲/۴-۶/۴۵ بوده است.

جدول ۶- ضریب کارایی پروتئین ماهی کاپلین، کاد و تن زرد باله

معادلات	PER	
	کاد	کاپلین
تن زرد باله		
۱	۲/۳۳	۲/۷۲
۲	۳/۸۲	۳/۱۱
۳	۲/۲۴	۲/۷۹
۴	۳/۱۳	۲/۶۴

## ترکیبات اسیدهای آمینه

ترکیب آمینواسیدهای پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تون زرد باله بر حسب گرم بر ۱۰۰ گرم پروتئین و شاخص شیمیایی آن در جدول ۷ ارائه شده است. شاخص شیمیایی ارزش تغذیه‌ای پروتئین را تخمین می‌زند و همان‌طور که گفته شد شاخص شیمیایی نسبت اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش بر میزان اسیدهای آمینه ضروری پروتئین استاندارد می‌باشد. این پارامتر میزان اسیدهای آمینه ضروری پروتئین‌های مورد آزمایش و پروتئین‌های استاندارد را مقایسه می‌کند و یک روش قابل قبول برای تعیین ارزش تغذیه اجزا است (Sgarbieri, ۱۹۸۷). در مطالعه جاری شاخص شیمیایی ارزیابی شده بر اساس پروتئین رفرنس ارائه شده توسط WHO/FAO (۱۹۸۵) برای بچه‌ها در سن ۵-۲ و ۱۲-۱۰ سال پایه‌ریزی شده است.

جدول ۷- آمینواسیدهای پروتئین هیدرولیز شده

امینواسید	کمیت ( $g100g^{-1}$ )			شاخص شیمیایی	
	پروتئین هیدرولیز شده	پروتئین رفرنس <sup>۱</sup>	پروتئین رفرنس <sup>۲</sup>	RP <sub>۱</sub>	RP <sub>۲</sub>
هیستیدین	۷/۳۲	۱/۹	۱/۹	۳/۸	۳/۸
ایزولوسین	۶/۱۱	۲/۸	۲/۸	۲/۱	۲/۱
لوسین	۶/۶۴	۶/۶	۴/۴	۱	۱/۵
لیزین	۱/۷۳	۵/۸	۴/۴	-۰/۲۹	-۰/۳۹
متیونین <sup>c</sup>	۱/۲۱	۲/۵	۲/۲	-۰/۴۸	-۰/۵۵
فنیل آلانین	۵/۰۴	۶/۳	۲/۲	۰/۸	۲/۲۹
ترئونین	۴/۸۷	۳/۴	۲/۸	۱/۴۳	۱/۷۳
تریپتوفان	—	۱/۱	۰/۹	—	—
آرژنین	۷/۶۸	—	—	—	—
والین	۸/۴۳	—	—	—	—
اسپارتیک اسید	۱۰/۵۶	—	—	—	—
گلیسین	۵/۱۴	—	—	—	—
آلانین	۱/۸۵	—	—	—	—
سرین	۶/۳۲	—	—	—	—
گلوتامیک اسید	۱۴/۶۸	—	—	—	—

RP<sub>۱</sub> شاخص شیمیایی محاسبه شده با پروتئین‌های استاندارد FAO/WHO

RP<sub>۲</sub> شاخص شیمیایی محاسبه شده با پروتئین‌های استاندارد FAO/WHO

۱- پروفایل پیشنهاد شده آمینو اسیدهای ضروری مورد نیاز برای بچه‌ها در سن ۵-۲ (FAO/WHO ۱۹۸۵)

۲- پروفایل پیشنهاد شده آمینو اسیدهای ضروری مورد نیاز برای بچه‌ها در سن ۱۲-۱۰ (FAO/WHO ۱۹۸۵)

مولکولی گزارش شده در دیگر مطالعات از این دست، هماهنگی داشت. Bhaskar و همکاران در سال ۲۰۰۸، وزن مولکولی را کمتر از ۸ KDa گزارش کردند؛ بنابراین پروتئین‌های هیدرولیز شده منبع غنی از پپتیدها با وزن مولکولی پایین هستند. اندازه پپتید با افزایش درجه هیدرولیز کاهش می‌یابد و توزیع وزن مولکولی و اندازه متوسط پپتیدها تحت تاثیر خصوصیات آنزیم است. (Kirstinsson and Rasco, ۲۰۰۰).

### نتیجه گیری

اگرچه مدتی است که کارهای پژوهشی بر روی پروتئین‌های ضایعات شیلاتی در سطح دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی ایران انجام می‌شود، ولی تلاش قابل توجهی در حوزه صنعت برای تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده با وجود مقادیر عظیم ضایعات ماهیگیری به چشم نمی‌خورد. در این مطالعه پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تن زرد باله در مقادیر بحرانی در شرایط متفاوت برای به‌دست آوردن بهینه مورد مطالعه قرار گرفتند. کنتور پلات‌ها برای انتخاب ترکیبات مناسب از متغیرهای مستقل برای به‌دست آوردن پایه‌های مطلوب هیدرولیز مورد استفاده قرار گرفت و بکار بردن RSM اطلاعات مفیدی برای توسعه پروسه‌های با کفایت و اقتصادی در سیستم‌های هیدرولیز پروتئین‌های غذایی فراهم کرد. مقادیر آنزیمی، دما و زمان به‌طور معنی‌داری بر روی PCL تاثیر داشتند و مقادیر اپتیمم برای طول زنجیره پپتیدی در مقادیر آنزیمی  $\frac{Au}{kg}$  ۳۷ دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و زمانی ۱۳۰ به‌دست آمد. طول زنجیره پپتیدی و درجه هیدرولیز بستگی به میزان هیدرولیز، شرایط هیدرولیز غلظت آنزیمی و نوع سوبسترا پروتئینی دارد (Kirstinsson and Rasco, ۲۰۰۰). بنابراین، شرایط اپتیمم هیدرولیز سوبستراهای متفاوت، مختلف خواهد شد و بستگی زیاد به سوبسترای بکار برده شده به‌خصوص میزان و فعالیت پروتئین‌های اندوژناژ موجود دارد. پروتئین‌های هیدرولیز شده مقادیر نسبتاً بالایی پروتئین و محتوای لیپیدی پایینی داشتند و بر اساس ترکیبات آمینو اسید، پروتئین هیدرولیز شده پتانسیل خوبی برای مصارف آبی پرووری و به‌عنوان اجزای غذای حیوانات و پیتون منبع نیتروژنی در محیط کشت میکروبی دارد.

میزان آمینواسیدها در پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی‌تون زرد باله در مقایسه با میزان آمینواسیدهای پیشنهاد شده توسط WHO/FAO که برای بچه‌ها در سنین ۵-۲ سال توصیه شده است؛ در مورد تمام آمینواسیدهای به‌جز متیونین و لیزین و فنیل آلانین بالاتر گزارش شده است. شاخص شیمیایی در پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی‌تون زرد باله نشان می‌دهد لیزین، متیونین بیشترین اسیدآمینوهای محدودکننده در مقایسه با نیاز بچه‌های ۱۲-۱۰ سال بودند. مقادیر این اسیدهای آمینه نسبت به اسیدهای آمینه ضروری دیگر پایین است، بقیه اسیدهای آمینه در مقادیر کافی یا بیشتر موجود هستند. بر اساس این نتایج با وجود کمبود جزئی در اسیدهای آمینه، پروتئین‌های هیدرولیز شده ارزش تغذیه خود را از دست نمی‌دهند (Bhaskar et al., ۲۰۰۷). پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌توانند به عنوان اجزای قابل دسترس در فرمولاسیون و به عنوان مکمل پروتئین بکار برده شوند (Pigott and Tucker, ۲۰۰۳).

### وزن مولکولی

الگوی الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی‌تون زرد باله نشان داد وزن مولکولی پپتیدهای تشکیل از هیدرولیز کمتر از ۱۰ KDa است. این امر درجه هیدرولیز بالا را اثبات می‌کند. پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی برای داشتن ارزش تغذیه بالا باید غنی از پپتیدهایی با وزن مولکولی پایین با مقدار حداکثر امکان پایین آمینواسیدهای آزاد باشند، بنابراین پروتئین‌های هیدرولیز فراهم شده از ماهی تن زرد باله به‌طور قابل ملاحظه‌ای دارای ارزش تغذیه‌ای بالایی است و می‌تواند به عنوان منبع نیتروژن در محیط رشد میکروبی به کار برده شود. Ovissipour و همکاران در سال ۲۰۰۹ وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده حاصل از تاسماهی ایرانی (*Acipenser persicus*) که با استفاده از آنزیم آلکالاز هیدرولیز شده بود، اندازه‌گیری کردند، الگوی الکتروفورز وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل را زیر ۱۰ کیلودالتون گزارش کردند. وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی‌تون زرد باله کمتر از ۱۰ کیلودالتون است و این مطالعه با نتایج تحقیقاتی که به‌وسیله Ovissipour و همکاران در سال (۲۰۰۹) با استفاده از آنزیم آلکالاز بر روی ماهی‌خواری قره برون انجام گرفت و تحقیقات مشابه که توسط Benjakul و Morrissey در سال ۱۹۹۷، Kristinsson و Rasco در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، طول زنجیره پپتیدی بین ۶/۵-۲/۵ گزارش شد که با نتایج وزن

### منابع

رضوی شیرازی، ح. ۱۳۷۳. تکنولوژی فراورده دریایی-اصول نگهداری و عمل‌آوری، ناشر مؤلف-شرکت شیلات

- Alsmeyer, R.H., Conningham, A.E., and Happich, M.I. 1974. Equation predicting PER from amino acid analysis, *J. food technology*, 28(7), 34-40
- Arnesen, J.A., and Gilderg, A. 2007. Extraction and characterization of gelatin from Atlantic salmon (*salmo salar*) skin. *Biores. Technol.* 98, 53-57
- AOAC 2002. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
- Alder-Nissen, J., and Olsen, H. 1979. The influence of peptide chain length on taste and functional properties of enzymatically modified soy protein, in food chemistry, pour-EI, A., Ed., American chemical society, Washington, D.C.
- Aspmo, S.I., Horn, S.I., Eijsink, V.G. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) Viscera. *J. process biochemistry.* 40 :1957-1966
- Benjakul, B., Morrissey, M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. *J. Agric. Food Chem.* 61(1/2), 131-138.
- Bhaskar, N., Sathisha, A.D., Sachindra, N.M., Sakhare., P.Z and Mahendrakar, N.S. 2007. Effect of acid ensiling on the stability of visceral waste protease of Indian major carp *Labeo rohita*. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* 16, 73-86
- 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. *Biores Technol.* 99 (2), 335-343.
- Bhaskar, N., Mahendrakar, N. S. 2008. Protein hydrolysate from visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*): Optimization of hydrolysis conditions for a commercial neutral protease. *Biores. Technol.* 99 (10), 4105-4111.
- Cao, W., Zhang, C., Hong, P., Ji, H. 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. *J. Food Chem.* 109, 176-183.
- Diniz, A.M., Martin, A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *Inter J Food Sci Nutr.* 48, 191-200.
- Espe, M., Sveier, H., Høgø, I., and Lied, I. 1999. Nutrient absorption and growth of Atlantic Salmon (*Salmo Salar L.*) fed fish protein concentrate, *Aquaculture*, 1974:119-137
- FAO, 2010. Statics, Fisheries and Aquaculture Statics, Tuna global catches by Stocks. From [www.fao.org](http://www.fao.org), online
- Gbogouri, G.A., Linder, M., Fanni, J., Parmentier, M. 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon byproducts hydrolysates. *J Food Sci.* 69: C615-C22
- Gildberg, A., and Raa, J. 1983. Purification and characterization of pepsins from Arctic fish capelin (*Mallotus villosus*). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 75 A:337-342
- Gildberg, A. 2001. Utilization of male Arctic capelin and Atlantic cod in testiness for fish sauce production - evaluation of fermentation conditions. *Biores. Technol.* 76, 119-123
- Gildberg, A. 2002. Enhancing return from greater utilization. In: Bremner, H. A. (Ed), *Safety and Quality Issues in Fish Processing*. Wood Head Publ. Ltd and CRC press. Cambridge, pp. 425-449
- 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.
- Groninger, H.S and Miller, R. 1979. Some Chemical and nutritional properties of acylated fish proteins, *J. Agric. Food chem.* 27(5), 949
- Hoyle NT, Merritt JH. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). *J Food Sci.* 59, 76-79 & 129.
- IFO 2006. Iranian Fisheries Organization. [www.shilat.com](http://www.shilat.com)
- Kristinsson, H.G., Rasco, B.A. 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 40, 43-81.
- 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.
- Kurokawa, T. 1979. Kamaboko-forming ability of frozen and ice stored lizard fish. *Bull of Japan. Soc. Sci. Fish.* 45: 15-51
- Liast, B., Julshamn, k., and Esp, Martin. 2003. Chemical composition and theoretical nutritional evaluation of the produced fractions from enzymatic hydrolysis of salmon frames with Protamex. *J. Proc. Biochem.*, 30:

- 1-13
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680-5
- Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Meth Enzymol*. Vol. 3 p. 450. Academic press, Ind., New York.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., and Assavanig, A. 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J Food Engg*. 70, 571-578
- Neklyudov, A.D., Ivankin, A.N., and Berdutina, A.V. 1995. Properties and Uses of Protein Hydrolysates. *Biochemistry and Microbiology*. 36. NO 5. 2000. 452-459
- Ovissipour, M., Abedian, A.M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., Shahiri, H. 2009. 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
- Pigott, G., and Tucker, B. 2002. Special Feeds, In: *Fish Nutrition*, (Third Ed.)
- Quaglia, G. B., and Orban, E. 1990. Influence of enzymatic hydrolysis on structure and emulsifying properties of sardine (*Sardina pilchardus*) protein hydrolysates, *J. Food Sci.*, 55(6), 1571-1573, 1619
- Sathivel, S., Smiley, S., Prinyawiwatkul, W., and Bechtel, P.G. 2005. Functional and nutritional properties of red salmon (*Oncorhynchus nerka*) enzymatic hydrolysates, *Journal of Food Science*, 70(6):401-406
- Shahidi F, Han XQ, and Syniowiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chem*. 53, 285-293
- Sgarbieri, V.C. 1987. *Alimentacao e Nutricao: Factor de saude e desenvolvimento*. UNICAMP, Campinas. Brazil.
- 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.
- 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. *J. Food Chemistry*. 104, 1698-170

Archive of SID