Archive of SID

مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی
جلد شانزدهم، شماره سوم، ۱۳۸۸
www.jasnr.info
www.sid.ir
www.magiran.com/jasnr

اثر آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا

*علی معتمدزادگان[۱]، فخری شهیدی[۲]، سیدعلی مرتضوی[۲]، هاشم پورآذرنگ[۲]، شبنم حمزه[۳]، سیداحمد شهیدی‌یاساقی[۳]، آزاده قربانی‌حسن‌سرایی[۳] و الهام خانی‌پور[۳]

[۱]استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، [۲]استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد، [۳]مربی گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت‌الله آملی

تاریخ دریافت: ۸۸/۲/۷ ؛ تاریخ پذیرش: ۸۸/۲/۳۰

چکیده

در این پژوهش برای بررسی اثر آنزیم پاپایین بر پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا، پروتئین‌های میوفیبریلار براساس حلالیت در محلول نمکی و حلال نبودن در آب خالص جداسازی شدند. برای هیدرولیز آنزیمی از شرایط فعالیت آنزیمی ۳۰۰-۱۰ واحد تیروزین به‌ازای هر گرم پروتئین، زمان ۹۰-۵ دقیقه و دمای ۸۰-۴۰ درجه سانتی‌گراد به کمک طرح آزمایشی CRCD با ٤ تکرار در نقطه مرکزی و ۵ سطح از هر تیمار استفاده گردید. نتایج در سطح آماری α=۰/۰۵ مقایسه میانگین شدند. براساس نتایج به‌دست آمده، با افزایش فعالیت آنزیم از ۱۰ به ۳۰۰ واحد تیروزین، درجه هیدرولیز حدود ۷ برابر افزایش می‌یابد. با افزایش درجه حرارت تا حدود ٦۰ درجه سانتی‌گراد شدت هیدرولیز زیاد می‌شود ولی پس از آن نرخ رشد هیدرولیز کاهش می‌یابد و تقریباً ثابت می‌ماند. با افزایش فعالیت آنزیم و زمان اثر آن بر شدت درجه هیدرولیز افزوده می‌گردد به‌طوری‌که پس از گذشت ۹۰ دقیقه در فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین درجه هیدرولیز به حدود ۱۵ درصد می‌رسد. دمای مناسب برای هیدرولیز پروتئین‌های میوفیبریلار تا رسیدن به میزان مشخصی از هیدرولیز آنزیمی به فعالیت آنزیم بستگی دارد. با افزایش درجه حرارت هیدرولیز از ٤۰ به ٦۰ درجه سانتی‌گراد میزان هیدرولیز زیاد شده و پس از ٦۰ درجه سانتی‌گراد با شیب کمتری افزایش می‌یابد و پس از ٦۵ درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت باقی می‌ماند. بررسی اثر آنزیم پاپائین بر میانگین تقریبی طول زنجیر پپتیدی حاصل از هیدرولیز نشان داده که این صفت تحت‌تأثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می‌باشد. با توجه به نتایج به‌دست آمده، طول تقریبی زنجیره‌ها از کمتر از ۱۰ تا حدود ۸۰ متغیر است. کمترین طول زنجیره در فعالیت‌های بالای آنزیمی و یا زمان‌های طولانی مشاهده می‌گردد. نتایج این آزمایش‌ها و آزمایش‌های تکمیلی نشان می‌دهند که می‌توان با هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا ویژگی‌های آن را بهبود بخشید.

واژه‌های کلیدی: کیلکا، پروتئین میوفیبریلار، پاپایین، هیدرولیز

*- مسئول مکاتبه: amotgan@sanru.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

در دهه ۱۹۶۰ تحقیق‌های زیادی برای دست‌یابی به منابع پروتئینی ارزان‌قیمت مغذی جهت تغذیه جمعیت انسانی در حال رشد و نیز حیوانات صورت گرفت و در این راستا به استفاده از ضایعات توجه زیادی معطوف شد. در طی دهه گذشته نیز نیاز به تأمین منابع جدید کنسانتره پروتئینی در دنیا افزایش یافته است. مقدار زیادی از پروتئین‌های با کیفیت بالا می‌توانند از طریق فرآورده‌های دریایی در اختیار انسان قرار گیرند. نقش تغذیه‌ای این پروتئین‌ها را در رژیم غذایی انسان می‌توان با استفاده بهتر از فرآورده‌های صید شده، افزایش صید و تولید ماهیان پرورشی تقویت نمود. هر ساله میلیون‌ها تن ماهی صید می‌شود که تقریباً ۲۹/۵درصد از آن تبدیل به خوراک دام می‌گردد. حدود ۵۰ درصد از مقدار ذکر شده مربوط به ضایعات کارخانجات فرآوری ماهی می‌باشد (سوزوکی، ۱۹۸۱؛ موریسی، ۱۹۸۸؛ باکا و همکاران، ۱۹۹۱). با توجه به این که حدود ۵۰ درصد ماهی خوراکی است و در حال حاضر حدود نیمی از گوشت خوراکی ماهی توسط انسان مصرف می‌شود همواره مقدار قابل‌توجهی از گوشت خوراکی ماهی بدون استفاده باقی می‌ماند (معتمدزادگان و رگنستین، ۲۰۰۳). که در حال حاضر مقدار آن حدود ۳۰ میلیون تن می‌باشد. در نیم قرن گذشته تلاش‌های زیادی برای افزایش قابلیت استفاده از منابع محدود دریایی انجام گرفته است. یکی از این موارد، استخراج پروتئین از ماهی کامل، ماهی تمیز شده و فیله ماهی به‌وسیله حلال می‌باشد که منجر به تولید کنسانتره پروتئینی ماهی با درصد پروتئین بالا می‌گردد. همچنین تلاش‌های زیادی برای اصلاح آنزیمی پروتئین‌ها انجام شده است (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). پروتئین‌های میوفیبریلار فراوان‌ترین پروتئین در ماهیچه بوده و قابلیت‌های مختلفی نظیر جذب آب، جذب روغن، امولسیون‌کنندگی، ژل‌کنندگی، کف‌کنندگی و غیره دارند. از این پروتئین‌ها استفاده زیادی در صنایع می‌شود (معتمدزادگان و همکاران، ۲۰۰٤).

هیدرولیز پروتئین‌ها: بازیافت پروتئین‌ها از ضایعات به روش هیدرولیز آنزیمی می‌تواند از میزان ضایعات بکاهد و ارزش افزوده قابل‌توجهی ایجاد نماید. هیدرولیز آنزیمی فرآیندی به نسبت ساده، مؤثر و کارا است که مانع از تخریب پروتئین‌ها در اثر واکنش‌هایی مشابه با آنچه که در واکنش‌های شیمیایی نامطلوب اتفاق می‌افتد، می‌شود. یکی از محدودیت‌های استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز آنزیمی، شکل‌گیری طعم تلخ است. گفته می‌شود، هیدرولیزهای پروتئین‌های حیوانی عاری از طعم تلخ می‌باشد (جین و شارون، ۲۰۰۱). درک چگونگی تلخ شدن هیدرولیزهای پروتئینی مشکل است. علت اصلی ایجاد طعم تلخ، شکل‌گیری پپتیدهای آب گریز کوچک می‌باشد (لاوسین و همکاران، ۱۹۹٦؛ ون در ون، ۲۰۰۲). ایجاد طعم تلخ به نوع پروتئین و فعالیت اختصاصی آنزیم نیز بستگی دارد (ون در ون، ۲۰۰۲). اصلاح پروتئولیتیک پروتئین‌های غذایی جهت بهبود خواص و افزایش زمان نگهداری یک روش قدیمی و مرسوم می‌باشد. پروتئین‌های هیدرولیز شده کاربرد زیادی در صنعت غذا دارند. از آن جمله می‌توان به جایگزین‌های شیر، مکمل‌های پروتئینی، پایدارکننده نوشیدنی‌ها و ترکیبات تشدیدکننده طعم در فرآورده‌های قنادی اشاره کرد (پیترسن، ۱۹۸۱؛ پیگات و توکر، ۱۹۹۰). شیوع جنون گاوی در سال‌های اخیر تمایل به جایگزین شدن پروتئین‌های هیدرولیز شده حیوانی را توسط پروتئین‌های هیدرولیز شده دریایی افزایش داده است (لیاست و همکاران، ۲۰۰۳). از پروتئین‌های هیدورولیز شده ماهی با کیفیت بالا می‌توان به‌عنوان جایگزین شیر پس چرخ در تولید فرآورده‌های لبنی و جایگزین کردن شیر در جیره غذایی گوساله‌ها استفاده کرد. پروتئین‌هایی که به‌عنوان جایگزین شیر مصرف می‌شوند ممکن است قابلیت هضم کمتری از کازئین داشته باشند. هیدرولیز این پروتئین‌ها می‌تواند سبب افزایش دسترسی حیوانات به آنها شود. یکی از مهم‌ترین مزایای استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی در این صنعت کاهش هزینه و اقتصادی بودن این عمل می‌باشد (باکا و همکاران، ۱۹۹۱؛ کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). هیدرولیز پروتئین‌های ماهی با پروتئازهای باکتریایی و تجزیه ترکیبات پروتئین‌های هیدرولیز شده

www.SID.ir

Archive of SID

نشان داده که این هیدرولیزها از ارزش غذایی بالایی برخوردار هستند. ارزش غذایی آنها ۱۵-۱۰ درصد کمتر از کازئین شیر برآورد شده است (باکا و همکاران، ۱۹۹۱). اولین پروتئین هیدرولیز شده تجاری در سال‌های حدود ۱۹٤۰ به بازار آمد (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). ولی بیشترین پژوهش‌ها برای تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی در دهه ۱۹٦۰ انجام گرفته‌اند (هال، ۱۹۹۲). در هیدرولیز پروتئین‌ها روش‌های بیولوژیکی و شیمیایی بیشترین کاربرد را دارند و استفاده از روش هیدرولیز شیمیایی در صنعت متداول‌تر است. در حال حاضر از روش‌های آنزیمی به‌طور پراکنده استفاده می‌شود. ولی به نظر می‌رسد استفاده از این روش در آینده رو به افزایش باشد چرا که پروتئین‌های به‌دست آمده از هیدرولیز آنزیمی ارزش غذایی و خواص عمل‌کنندگی بسیار خوبی دارند (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰).

استفاده از پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی می‌تواند سبب بهبود اتصال به آب در فرآورده‌های گوشتی و کاهش خروج خونابه در گوشت خام یا پخته شود (سیکورسکی و همکاران، ۱۹۹٤). هیدرولیز آنزیمی ممکن است به‌دلیل تجزیه بیش از اندازه ملکول پروتئین سبب تضعیف خواص عمل‌کنندگی شود ولی حلالیت ترکیبات نیتروژن‌دار آن به‌طور قابل‌توجهی افزایش می‌یابد (کواگلیا و اوربان، ۱۹۸۷؛ هال، ۱۹۹۲). افزایش حلالیت معمولاً با افزایش درجه هیدرولیز و کاهش طول زنجیره پلی‌پپتیدی رابطه مستقیم دارد. فعالیت بیشتر آنزیم و یا مدت زمان بیشتر تماس آنزیم با سوبسترا نیز سبب انجام هیدرولیز بیشتر و افزایش حلالیت می‌شود (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰).

آنزیم‌های پروتئولیتیک: به‌طورکلی هیدرولیز محدود آنزیمی می‌تواند سبب بهبود خواص عمل‌کنندگی نظیر ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی شود (اویسی‌پور و همکاران، ۲۰۰۹). یکی از برتری‌های هیدرولیز پروتئین‌ها افزایش ارزش تغذیه‌ای به‌دلیل بالا رفتن قابلیت هضم پروتئین‌ها می‌باشد. فرآیند هیدرولیز ممکن است اثر حساسیت‌زایی برخی از پروتئین‌ها را نیز از بین ببرد (میرز و مونتگومری، ۲۰۰۲؛ ون در ون، ۲۰۰۲). بنابراین برای تولید غذاهایی که ممکن است خاصیت آلرژنی داشته باشند، پروتئین‌ها را به پپتیدهای کوچک هیدرولیز می‌کنند (بوزا و همکاران، ۱۹۹۵). هدف از این پژوهش استحصال پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا، هیدرولیز آنها توسط آنزیم پروتئولیتیک پاپائین، بهینه‌سازی شرایط فعالیت آنزیم و اثر این شرایط بر درجه هیدرولیز می‌باشد.

مواد و روش‌ها

آماده‌سازی ماده اولیه برای اصلاح آنزیمی: ماهی کیلکا پس از صید (در فصل تابستان)، ضمن کنترل درجه حرارت در ظروف CSW[1] به محل فرآوری (شرکت ملی فرآوری آبزیان بندرانزلی) منتقل شد. ماهی‌ها پس از سرزنی، تخلیه حفره شکمی و شستشو با آب در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد منجمد شده، در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد به محل آزمایشگاه منتقل و دوباره در دمای ۳۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. جهت انجام آزمایش مقدار لازم از ماهی در یخچال انجمادزدایی شده مورد استفاده قرار گرفت. پس از انجمادزدایی، فیله (حاوی پوست) با دست جدا شده و در هاون چینی خرد و همگن گردید. خمیر به‌دست آمده سه مرتبه توسط محلول ۰/۱ مولار نمک طعام و ۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH معادل ۷/۵-۷ به‌منظور حذف پروتئین‌های سارکوپلاسمی محلول و سایر ترکیبات نامطلوب از جمله رنگدانه‌ها شستشو داده شد. درجه حرارت آب نمک مصرفی ۷-٤ درجه سانتی‌گراد و نسبت آب نمک به خمیر ۳:۱ (v/w) بود. اختلاط خمیر و آب نمک برای شستشو در دستگاه مخلوط‌کن با دور بالا "HI" (با سرعت تقریباً ۵۰۰۰rpm) هر بار به مدت ۵ دقیقه در دمای یخچال انجام گرفت. پس از هر بار شستشو نمونه‌ها با پارچه توری[2] چند لایه صاف شدند. در ادامه کار، خمیری که ۳ بار شستشو داده شده بود به نسبت ۱:۳ (v/w) با آب نمک ۰/٦ مولار نمک طعام و ۱۰ میلی‌مولار بافر فسفات با pH معادل ۷/۵-۷ دردستگاه مخلوط‌کن[3] با شرایط بالا

1- Chilled Sea Water
2- Cheese Cloth
3- Osterizer, Imperial, Miami, FL, USA

www.SID.ir

Archive of SID

مخلوط گردید. مخلوط به‌دست آمده پس از صاف کردن با پارچه توری چند لایه به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۵۰۰۰rpm و دمای ٤ درجه سانتی‌گراد سانتریفوژ[1] شد. مایع فوقانی سانتریفوژ به‌عنوان محلول پروتئین‌های محلول در نمک (میوفیبریلار) مورد استفاده قرار گرفت. عمل استخراج پروتئین‌های میوفیبریلار از هر نمونه خمیر ۲ بار انجام و نمونه‌ها در انتهای عمل با هم مخلوط گردیده و برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند.

اندازه‌گیری پروتئین: اندازه‌گیری مقدار پروتئین نمونه‌ها به روش رنگ‌سنجی انجام شد. نمونه‌های با غلظت پروتئین کمتر از ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش لوری با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر (لوری و همکاران، ۱۹۵۱). نمونه‌های با غلظت پروتئین بیشتر از ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به روش بیورت با اندازه‌گیری شدت جذب در طول موج ۵۵۷ نانومتر آزمایش شدند (کورنال و همکاران، ۱۹٤۹؛ جین و شارون، ۲۰۰۱). برای رسم منحنی استاندارد در هر دو روش یاد شده از پودر سرم آلبومین گاوی خالص[2] استفاده گردید. ناحیه خطی منحنی‌های مربوطه به‌عنوان منحنی استاندارد در اندازه‌گیری پروتئین نمونه‌های آزمایش استفاده شد.

هیدرولیز آنزیمی: برای هیدرولیز پروتئین‌های محلول در نمک، افزایش حلالیت آنها در آب و یا بهبود خواص عمل‌کنندگی آنها، پروتئین‌های استخراج شده به روش رقیق‌سازی با بافر فسفات ۱۰ میلی‌مولار و pH معادل ۷/۵–۷ رسوب داده شدند. برای این عمل دمای محلول بافر در یخچال به ٤ درجه سانتی‌گراد رسانیده، و سپس یک قسمت از محلول پروتئینی (۰/٦ مولار نمک طعام) با ۵ قسمت از بافر فسفات رقیق شده محلول به مدت چند ساعت (شب تا صبح) در دمای یخچال استراحت داده شد. رقیق شدن محلول تا حد ۰/۱ مولار نمک طعام و بدون حرکت ماندن آن سبب ترسیب پروتئین‌های محلول در نمک گردید. آب بخش فوقانی (که شامل املاح، پروتئین‌های محلول و مقدار جزیی پروتئین‌های میوفیبریلار است) به بیرون تخلیه شد و عمل رقیق‌سازی یک بار دیگر با اختلاط ۱ قسمت از محلول پروتئینی (محلول کلوئیدی) و ۵ قسمت بافر فسفات انجام گرفت. پس از گذشت زمان لازم و ترسیب پروتئین‌ها، آب فوقانی به بیرون تخلیه شد. مقدار نمک باقی‌مانده در محلول نهایی پس از دو بار رقیق‌سازی عبارت است از:

(مولاریته) ۰/۰۱۳ ⇒ ۰/۱÷٦=۰/۰۱۳ ۰/٦÷٦=۰/۱

در مرحله بعد محلول کلوئیدی در دمای ٤–۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه و با دور ۵۰۰۰rpm سانتریفوژ شد. پس از سانتریفوژ مایع فوقانی تخلیه شده و پروتئین رسوبی در مقدار کافی آب توسط همزن اومنی–میکسر[3] با دور ٦۰۰۰rpm به مدت ۵ دقیقه پخش و یکنواخت گردید. مقدار پروتئین به روش لوری برای مواد جامد نامحلول اندازه‌گیری شد (لوری و همکاران، ۱۹۵۱).

برای هیدرولیز از آنزیم پاپائین (LIQUIPANOL® T-100) ساخت شرکت EDC[4] آمریکا استفاده شد. به این منظور عملیات هیدرولیز محلول پروتئین حاوی ۵۰ میلی‌گرم پروتئین در هر میلی‌لیتر با فعالیت‌های مختلف آنزیمی، در درجه حرارت و زمان‌های متفاوت براساس جدول ۱ انجام گرفت.

آنزیم پاپائین مصرفی در این پژوهش از میوه درخت *Carica papaya L.* به‌دست می‌آید و به شکل مایع و به رنگ قهوه‌ای روشن است. این آنزیم در دامنه pH ۹–٤ فعال است و تا دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد نیز فعال باقی می‌ماند. درجه حرارت فعالیت پاپائین مصرفی بین ۸۰–٤۰ درجه سانتی‌گراد قرار دارد. فعالیت این آنزیم ۱۰۰ واحد تیروزین به‌ازای هر گرم پروتئین[5] بوده و پس از ۱۵–۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد سریع غیرفعال می‌شود. در ترکیب تجاری این آنزیم مواد جامد شربت ذرت، آب، آنزیم و متا بی‌سولفیت سدیم وجود دارد. آنزیم پاپائین خریداری شده تا زمان مصرف در دمای یخچال (٤ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد.

1- 20A Centrifuge/Needham Heights, Mass, USA IEC B
2- Fisher Scientific
3- Omni Mixer
4- Enzyme Development Corporation/ 21 Penn Plaza/ NY 10001/USA
5- TU/g Protein

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱- تیماربندی نمونه‌ها برای هیدرولیز پروتئین‌های نامحلول در آب توسط پاپائین.

سطوح مورد استفاده تیمارها:	+a	+۱	۰	−۱	−a
فعالیت آنزیم (واحد تیروزین به ازای هر گرم پروتئین)	۳۰۰	۲۵۷/۵	۱۵۵	۵۲/۵	۱۰
درجه حرارت (درجه سانتی‌گراد)	۸۰	۷٤/۱٤	٦۰	٤۵/۸٦	٤۰
زمان (دقیقه)	۹۰	۷۷/۵	٤۷/۵	۱۷/۵	۵

پس از تیماربندی نمونه‌ها براساس جدول ۱، نمونه‌ها برای مدت تعیین شده در داخل بن‌ماری با درجه حرارت‌های مختلف (جدول ۱) قرار داده شدند. پس از سپری شدن زمان مورد نظر، نمونه از بن‌ماری خارج و آنزیم آن طی ۱۵ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد غیرفعال گردید. اگرچه استفاده از حرارت سبب دناتوراسیون نسبی پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌گردد ولی همچنان یک روش متداول برای متوقف کردن فعالیت آنزیم‌ها ضمن بررسی ویژگی‌های پروتئین‌های هیدرولیز شده است (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). در انتهای عمل، پارامترهایی مانند حلالیت، درجه هیدرولیز، طول زنجیر پپتیدی، ظرفیت امولسیون‌کنندگی، پایداری امولسیون پس از ۷۲ ساعت و ویسکوزیته اندازه‌گیری شدند.

اندازه‌گیری طول زنجیر پپتیدی: برای اندازه‌گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل (PCL[1]) از هیدرولیز با آنزیم پاپائین از روش آلدر نیسن و اولسن استفاده شد. این روش توسط کریستینسن و راسکو (۲۰۰۰) نیز ارایه شده است. در این روش از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره به کمک معادله ۱ استفاده می‌گردد. در این معادله DH درجه هیدرولیز پروتئین‌ها بوده و برحسب درصد به‌کار می‌رود.

$$PCL = \frac{۱۰۰}{DH} \qquad (۱)$$

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز: (DH) میزان هیدرولیز براساس روش فونک و سینگ (۱۹۹٦) به کمک تری‌کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری‌کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و پس از به هم زدن به مدت ۵ دقیقه، با دور ۵۰۰۰rpm و زمان ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق معادله ۲ محاسبه گردید (کواگلیا و اوربا، ۱۹۹۰؛ کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰):

$$DH = ۱۰۰ \times \frac{\text{پروتئین حل‌شده در محلول ۱۰ درصد از TCA}}{\text{کل پروتئین‌های نمونه}} \qquad (۲)$$

در این پژوهش از طرح آزمایشی CRCD[2] با ٤ تکرار در نقطه مرکزی و ۵ سطح از هر تیمار استفاده گردید. سپس نتایج به کمک نرم‌افزار آماری SAS به روش RSM-REG[3] تجزیه و تحلیل شده و مدل‌های به‌دست آمده به‌صورت منحنی با روش RSM برازش شدند. استفاده از طرح آزمایشی CRCD و مدل‌سازی به روش RSM در سال‌های اخیر در صنایع غذایی کاربرد زیادتری پیدا کرده چرا که در این روش صرفه‌جویی قابل ملاحظه‌ای در تعداد و زمان آزمایش‌ها و بنابراین مصرف مواد ایجاد می‌گردد (چارلز، ۱۹۸۲؛ میرز و مونتگومری، ۲۰۰۲؛ رویز- کاراسکال و رگنستین، ۲۰۰۲؛ حسینی‌پرور و همکاران، ۲۰۰۸). سطوح مورد استفاده به فاصله ۱+، ۱−، a+ و a− از نقطه مرکزی قرار داشتند. فاکتور a معادل ۱/٤۱٤ می‌باشد (چارلز، ۱۹۸۲؛ میرز و مونتگومری، ۲۰۰۲). سطح اطمینان در تجزیه و تحلیل نتایج α=۰/۰۵ در نظر گرفته شد. همه آزمایش‌ها مربوط به اثر آنزیم ترانس گلوتامیناز بر خواص پروتئین‌های میوفیبریلار و نیز هیدورلیز پروتئین‌ها به این روش و رسم نمودارها توسط نرم‌افزارهای مت- لب[4]، سورفر[5] و اکسل[6] انجام گرفتند.

1- Peptide Chain Length

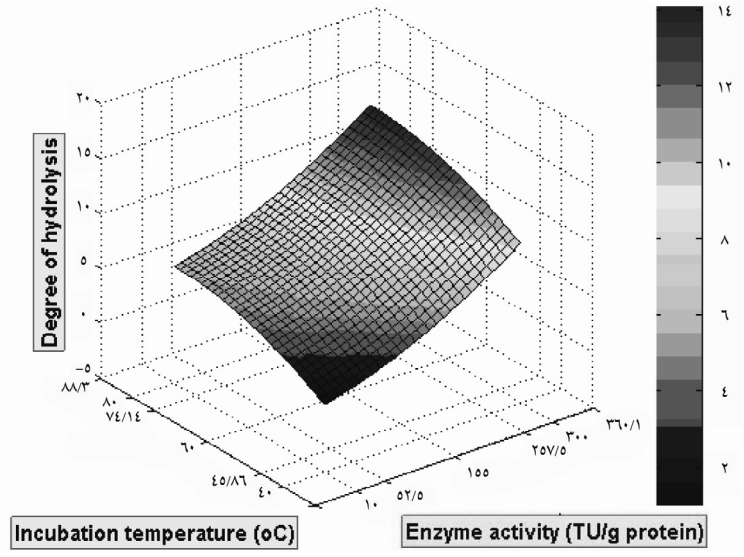
2- Centeral Rotable Composite Design
3- Response Surface Methodology-Regression
4- Mat Lab
5- Surfer
6- Excel

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج و بحث

اثر آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز: با توجه به اثر متقابل فعالیت آنزیم و دمای اثر آنزیم، این دو عامل به‌طور مؤثری سبب تغییر در درجه هیدورلیز می‌شوند. با افزایش فعالیت آنزیم درجه هیدرولیز زیاد می‌شود. در شرایط این آزمایش، با افزایش فعالیت آنزیم از ۱۰ به ۳۰۰ واحد تیروزین به‌ازای هر گرم پروتئین، درجه هیدرولیز حدود ۷ برابر افزایش می‌یابد. با افزایش درجه حرارت نیز بر شدت هیدرولیز افزوده می‌گردد ولی پس از حدود ٦٠ درجه سانتی‌گراد نرخ رشد هیدرولیز کاهش می‌یابد و تقریباً حالت ثابت دارد. دمای مناسب برای هیدرولیز پروتئین‌های میوفیبریلار تا رسیدن به میزان مشخصی از هیدرولیز آنزیمی به فعالیت آنزیم بستگی دارد. با توجه به اینکه بالاترین میزان هیدرولیز (١٤ درصد) در فعالیت آنزیمی ۳۰۰ واحد تیروزین و دمای ۸۰-۷۵ درجه سانتی‌گراد مشاهده می‌شود این دما بهترین دامنه حرارتی برای آنزیم پاپائین تلقی می‌گردد. در دمای ۸۰-۷۵ درجه سانتی‌گراد و فعالیت‌های آنزیمی ۳۵ واحد تیروزین، ۱۲۵ واحد تیروزین، ۱۹۰ واحد تیروزین، ۲۵۰ واحد تیروزین و ۳۰۰ واحد تیروزین میزان درجه هیدرولیز به‌ترتیب ١٤، ١٢، ١٠، ٨ و ٦ درصد است. روابط بین اثر متقابل فعالیت آنزیم و دمای اثر آن در شکل ۱ نشان داده شده‌اند.



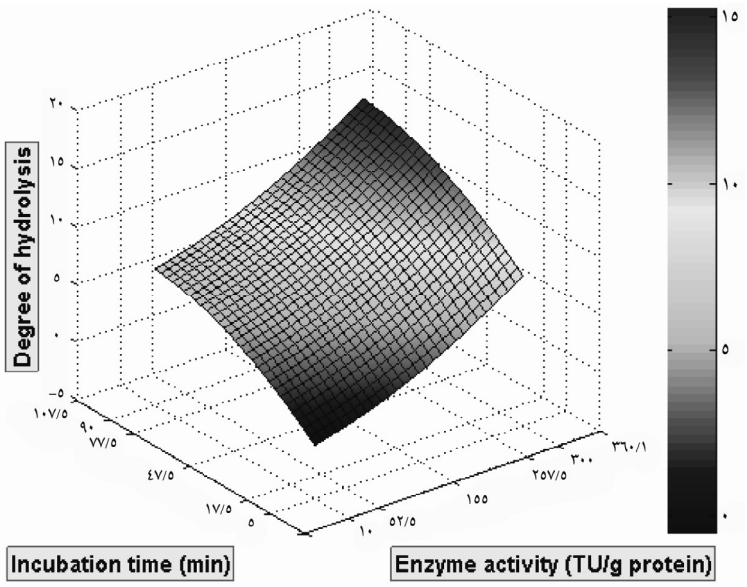
شکل ۱- اثر فعالیت آنزیم پاپائین و دمای هیدرولیز بر درجه هیدرولیز.

براساس اثرات متقابل فعالیت آنزیم پاپائین و مدت زمان اثر آن بر پروتئین‌های میوفیبریلار با افزایش فعالیت آنزیم و زمان اثر آن بر شدت درجه هیدرولیز افزوده می‌گردد به‌طوری‌که پس از گذشت ۹۰ دقیقه در فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین درجه هیدرولیز به حدود ۱۵ درصد می‌رسد (شکل ۲).

اگرچه جمله‌های مربوط به توان دوم متغیرهای زمان و دما نیز در مدل رگرسیونی مربوطه معنی‌دار می‌باشند ولی منحنی بیشتر حالت خطی دارد. نقاط مربوط به زمان ۲۵ دقیقه فعالیت ۱۰ واحد تیروزین و زمان ۵ دقیقه فعالیت ۱۳۵ واحد تیروزین، زمان ٤٥ دقیقه فعالیت ۱۰ واحد تیروزین و زمان ۵ دقیقه فعالیت ۲۰۰ واحد تیروزین، زمان ٦٥ دقیقه فعالیت ۱۰ واحد تیروزین و زمان ۵ دقیقه فعالیت ۲۵۰ واحد تیروزین، زمان ۹۰ دقیقه فعالیت ۷۵ واحد تیروزین و زمان ۵ دقیقه فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین، زمان ۹۰ دقیقه فعالیت ۱۵۵ واحد تیروزین و زمان ۲۰ دقیقه فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین، زمان ۹۰ دقیقه فعالیت ۲۱۰ واحد تیروزین و زمان ۳۵ دقیقه فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین، زمان ۹۰ دقیقه فعالیت ۲٦٥ واحد تیروزین و زمان ٦٠ دقیقه فعالیت ۳۰۰ واحد تیروزین دو به دو از نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به‌ترتیب معادل ۲، ٤، ٦، ۸، ۱۰، ۱۲ و ١٤ درصد درجه هیدرولیز هستند.

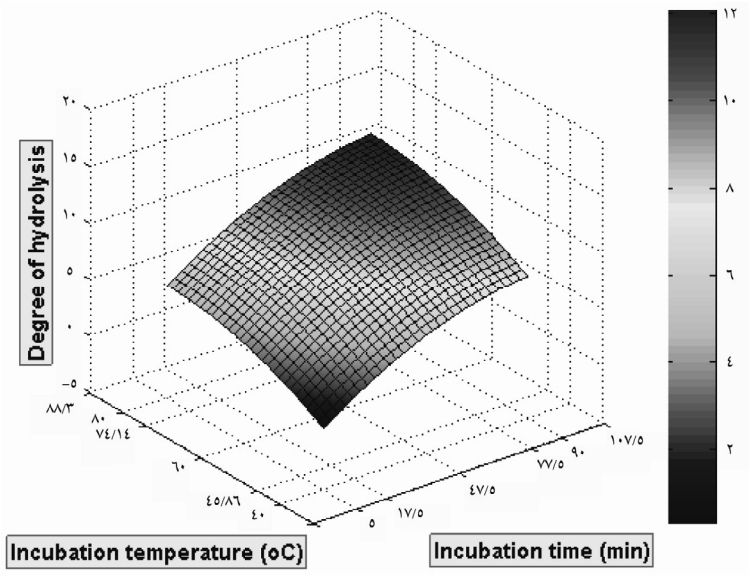
www.SID.ir

Archive of SID



شکل ۲- اثر فعالیت آنزیم پاپائین و مدت اثر آن بر درجه هیدرولیز.

براساس اثر متقابل زمان و دمای هیدرولیز پروتئین توسط آنزیم پاپائین این دو عامل در میزان هیدرولیز تأثیر قابل‌توجهی دارند. با افزایش درجه حرارت هیدرولیز از ٤٠ درجه سانتی‌گراد به ٦٠ درجه سانتی‌گراد میزان هیدرولیز زیاد شده و پس از ٦٠ درجه سانتی‌گراد با شیب کمتری افزایش می‌یابد و پس از ٦٥ درجه سانتی‌گراد تقریباً ثابت باقی می‌ماند. براساس اثرات متقابل به‌دست آمده (شکل ۳) با کنترل زمان و دمای هیدرولیز می‌توان درجه هیدرولیز را حداکثر تا ۱۲ درصد افزایش داد که در شرایط ۸۰-۷۵ درجه سانتی‌گراد و طی مدت ۹۰-۸۵ دقیقه به‌دست می‌آید. از آنجا که اثرات متقابل هر یک از این دو عامل با فعالیت آنزیم سبب افزایش درجه هیدرولیز تا حدود ١٤ درصد می‌شود، به نظر می‌رسد فعالیت آنزیم عامل مهم‌تری از زمان و دمای اثر آنزیم برای درجه هیدرولیز می‌باشد.



شکل ۳- اثر زمان و دمای فعالیت آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز.

www.SID.ir

Archive of SID

به لحاظ ریخت‌شناسی منحنی‌ها، منحنی‌های مربوط به درجه هیدرولیز دارای نقطه زینی هستند و پس از مدتی تغییرات منحنی کم شده و به اصطلاح منحنی وارد فاز سکون[1] می‌شود (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). گاهی مواقع هیدرولیز شده‌ها با پروتئین‌های اولیه رقابت کرده سبب کاهش نرخ هیدرولیز می‌شوند (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). این مسأله در نتایج به‌دست آمده قابل مشاهده نبود. روشن است در هر درجه حرارتی با افزایش فعالیت آنزیم و زمان اثر آن بر میزان هیدرولیز افزوده می‌گردد و چنان‌چه دما در شرایط بهینه قرار داشته باشد در زمان کوتاه‌تری می‌توان به نتیجه مورد نظر دست یافت. البته باید توجه داشت که هیدرولیز بیش از اندازه سبب تضعیف خواص عمل‌کنندگی پروتئین‌ها می‌شود و باید مناسب‌ترین درجه هیدرولیز برای دست‌یابی به خواص عمل‌کنندگی مطلوب محاسبه گردد.

اثر آنزیم پاپائین بر طول زنجیره پپتیدی: بررسی اثر آنزیم پاپائین بر میانگین تقریبی طول زنجیر پپتیدی به‌دست آمده از هیدرولیز نشان داده است که این صفت تحت‌تأثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می‌باشد. درجه هیدرولیز معمولاً بین صفر تا حدود ۱۵ درصد متغیر است و این میزان هیدرولیز سبب افزایش حلالیت تا حدود ۹۰ درصد می‌شود (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). بنابراین مقدار عددی طول زنجیر پپتیدی که به روش آلدر نیسن و اولسن محاسبه می‌شود می‌تواند حداقل ۵ الی ٦ باشد. از آنجا که مدل به‌دست آمده مقادیر را به‌طور متوسط ۱۸ واحد کمتر تخمین می‌زند و برای جلوگیری از حصول جواب‌های خارجی، عدد ۱۸/۰۵ (متوسط اختلاف کمترین و بیشترین تخمین زده شده از مقادیر واقعی) به عرض از مبدأ مدل به‌دست آمده اضافه شده و منحنی مربوطه رسم گردید (شکل ٤). با توجه به شکل‌های مربوطه، طول تقریبی زنجیره‌ها از کمتر از ۱۰ تا حدود ۸۰ متغیر است. کمترین طول زنجیره در فعالیت‌های بالای آنزیمی و یا زمان‌های طولانی مشاهده می‌گردد. از آنجا که آنزیم پاپائین پروتئین میوزین را تقریباً از نقطه میانی می‌شکند و نظر به این که بخش عمده پروتئین‌های میوفیبریلار را پروتئین میوزین تشکیل می‌دهد به نظر می‌رسد که مخلوط پروتئین‌های هیدرولیز شده تا حد زیادی به لحاظ وزن ملکولی همگن باشد.

چنان‌چه در این شکل‌ها نیز پیدا است، سرعت شکستن ملکول پروتئین و کاهش اندازه مولکول‌ها در مراحل ابتدایی واکنش (تا حدود۵۰ دقیقه) و تا فعالیت آنزیمی تقریباً ۲۰۰ واحد تیروزین زیاد است که نشان می‌دهد بخش اصلی عملکرد آنزیم در سیستم پروتئینی در این فاصله زمانی اتفاق می‌افتد بنابراین، چنان‌چه پروتئین به مدت طولانی در مجاورت آنزیم قرار بگیرد ممکن است دچار تجزیه شدید شده و هیدرولیزهای به‌دست آمده خواص مطلوب عمل‌کنندگی خود را از دست دهند.

به‌طورکلی با افزایش فعالیت آنزیم‌های پروتئولیتیک می‌توان راندمان تولید نیتروژن محلول (پروتئین محلول) را افزایش داد. چنان‌چه غلظت سوبسترا از حد خاصی تجاوز کند (< ۸ درصد) از سرعت هیدرولیز کاسته می‌شود (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). علاوه‌بر فعالیت آنزیم شرایط عمومی واکنش نیز بر میزان حلالیت، درجه هیدورلیز و طول زنجیره پپتیدی هیدرولیز شده‌ها مؤثر می‌باشد. معمولاً گروه وسیعی از پپتیدها با وزن مولکولی متفاوت شکل می‌گیرند ولی در محاسبه‌ها بیشتر از متوسط طول زنجیره‌ها استفاده می‌شود (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). نتایج این پژوهش نشان می‌دهد که متوسط طول زنجیره‌ها تنها تحت‌تأثیر فعالیت آنزیم و مدت زمان اثر آن قرار دارد و درجه حرارت واکنش تأثیر معنی‌داری بر طول زنجیره‌ها ندارد. با افزایش فعالیت آنزیم و زمان اثر آن از طول زنجیره‌های پپتیدی به‌دست آمده از هیدرولیز پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا کاسته می‌شود، به‌طوری‌که در حداکثر زمان و فعالیت آنزیم به‌کار رفته پپتیدهایی با طول زنجیر کمتر از ۲۰ اسید آمینه شکل می‌گیرند (شکل ٤). محاسبه طول متوسط زنجیره‌ها با

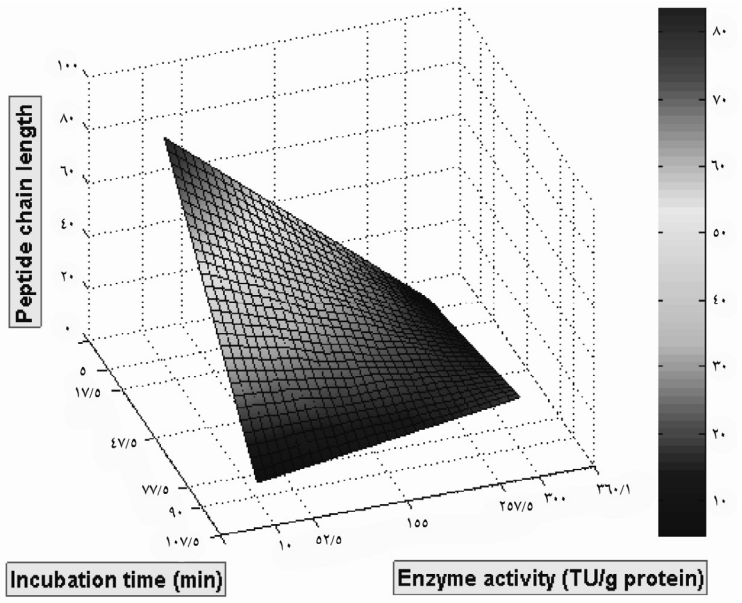
1- Stationary Phase

www.SID.ir

Archive of SID

خواص عمل‌کنندگی هیدرولیزها تا حد زیادی تطابق دارد چرا که در شرایط هیدرولیز شدید پروتئین‌ها خواص عمل‌کنندگی تضعیف می‌شود. بیان می‌گردد برای بروز خواص عمل‌کنندگی مطلوب باید پپتیدها حداقل از ۲۰ اسید آمینه تشکیل شده باشند (کریستینسن و راسکو، ۲۰۰۰). نتایج به‌دست آمده از این پژوهش تا حد زیادی مشابه نتایج فونکو و سینگ (۱۹۹٦) می‌باشد. آنها ضمن هیدرولیز آنزیمی گوشت چسبیده به استخوان بوقلمون، به این نتیجه رسیدند که با افزایش درجه هیدرولیز تا ۷۵-٦۵ درصد متوسط وزن مولکولی پروتئین‌های حاصل حدود ٦/۵ کیلودالتون می‌باشد. متأسفانه این پژوهشگران نوع پروتئاز مورد استفاده را عنوان نکردند.

گیلبرگ و همکاران (۲۰۰۲) 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 به‌دست آمده کوچک‌تر می‌باشد ولی تا حدی طعم تلخ غالب می‌گردد. هیدرولیزهای به‌دست آمده به‌دلیل کاهش وزن مولکولی معمولاً ضریب هضم و جذب بالاتری نسبت به پروتئین اولیه دارند. لیاست و همکاران (۲۰۰۳) بیان داشتند هیدرولیزهای به‌دست 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 (کروکاوا، ۱۹۷۹).



شکل ٤- اثر فعالیت آنزیم پاپائین و زمان اثر آن بر طول زنجیره پلی‌پپتیدی.

منابع

1.AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1997. In: Cunniff, P.A., Pp: 1140-1370.
2.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.
3.Boza, J.J., Martinez, A.O., and Gil, A. 1995. Nutritional and antigenic characterization of an enzymatic whey protein hydrolysate. J. Agric. Food Chem., 43: 872-875.
4.Charles, R.H. 1982. Fundamental concepts in design of experiment. 3rd edition. HRW CBS College Pub. New York, Pp: 120-320.

www.SID.ir

Archive of SID

5.Cornal, A.G., Bardawill, C.J., and Daivid, M.M. 1949. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem., 177: 2. 751-766.
6.Fonkwe, L.G., and Singh, R.K. 1996. Protein recovery from enzymatically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. J. Proc. Biochem., 31: 605.
7.Gildberg, A., Aresen, J.A., and Carlehog, M. 2002. Utilization of cod backbone by biochemical fractionation. J. Proc. Biochem., 38: 475-480.
8.Hall, G.M. 1992. Fish processing technology. Blackie Academic & Professional. New York, Pp: 57-102.
9.Hosseini-Parvar, S.H., Keramat, J., Kadivar, M., Khanipour, E., and Motamedzadegan, A. 2008. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Int. J. Food Sci. & Tech., 44: 3. 467-475.
10.Jean, W.G., and Sharron, L.O. 2001. Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids. Vet. Clin. Path., 30: 1. 16-18.
11.Kristinsson, H.G., and Rasco, B.A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. Crti. Rev. Food Sci. Nutr., 40: 43-81.
12.Kurokawa, T. 1979. Kamaboko-forming ability of frozen and ice stored lizard fish. Bull of Japn. Soc. Sci. Fish, 45: 15-51.
13.Liaset, B., Julshamn, K., and Espe, Marit. 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.
14.Lovsin, K.I., Zelenik, B.M., and Abram, V. 1996. Bitterness intensity of soybean protein hydrolysates-chemical and organoleptic characterization. Lebensm. Unters. Forsch., 203: 272-276.
15.Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol Reagent. J. Biol. Chem., 193: 65-275.
16.Morrissey, M.T. 1988. Postharvest fishery losses. Procceding of an international workshop. Univ Rhode Island, Kingston, RI.
17.Motamedzadegan, A., and Regenstein, J.M. 2003. Extraction and characterization of gelatin from Alaska Pollock. 12th Conference of IUFoST, Juli16-20.Chicago,IL. USA.
18.Motamedzadegan, A., Shahidi, A., Mortazavi, A., Pourazarang, H., Ghorbani, A., and Hamzeh, SH. 2004. Presence of Kilka (Clupeonella) fish protein in washed mince and waste water at different washing conditions. J. Agric. Sci. Natu. Resou. Khazar, 2: 3. 90-99. (In Persian).
19.Myers, R.H., and Montgomery, D.C. 2002. Response surface methodology, Process and product optimization using designed experiments. Second edition. John Wiley & Sons, Pp: 145-202.
20.Ovissipour, M., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., and Shahiri, H. 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (Acipenser persicus) viscera. Food Chem., 115: 238-242. (In Persian).
21.Petersen, R.B. 1981. The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of proteins. In enzymes and food processing. Brich, G.G., Blakebrough, N., 91-Parker K.J., Eds. Appl. Sci. Pub. Ltd. London, 149p.
22.Pigott, M., and Tucker, B.W. 1990. Seafood effects of technology on nutrition. Marcel Dekker INC. New York.
23.Quaglia, G.B., and Orban, E. 1987. Influence of the degree of hydrolysis on the solubility of the protein hydrolysates from sardine (Sardina pilchardus). J. Sci. Food Agic., 38: 271.
24.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: 15-71.
25.Ruiz-Carrascal, J., and Regenstein, J.M. 2002. Emulsion stability and water uptake ability of chicken breast muscle proteins as affected by microbial transglutaminase. J. Food Sci., 67:2.
26.Sikorski, Z.E., Pan, B.S., and Shahidi, F. 1994. Seafood Proteins. Chapman and Hall Press, NY, Pp: 190-283.
27.Suzuki, T. 1981. Fish and krill protein processing technology. Appl. Sci. Publ. London, Pp: 32-76.
28.Van derv en, C. 2002. Biochemical and functional characterization of casein and whey protein hydrolysates. A study on the correlation between biochemical and functional properties using multivariate data analysis. Ph.D. thesis. Wageningen University. The Netherlands, Pp: 21-79.

www.SID.ir