خواص کاربردی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*)

مرجانه علی‌نژاد[۱]، علی معتمدزادگان[۲*]، مسعود رضائی[۳]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور، مازندران، ایران
۲- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، مازندران، ایران
۳- استاد گروه فرآوری محصولات شیلاتی دانشکده علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس، نور ، مازندران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۲/۱۰/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۳/٤/۸)

چکیده

گوشت کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) توسط محلول ۰/۱ مولار NaCl شستشو داده شد. سپس در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۱۲۰ دقیقه توسط آنزیم آلکالاز هیدرولیز و به روش پاششی خشک گردید. خواص کاربردی پروتئین هیدرولیز شده، شامل حلالیت، دانسیته توده‌ای، جذب روغن، جذب ایزوترم، ویسکوزیته سینماتیک و نیز فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن شامل قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH و میزان تأثیر پروتئین هیدرولیز شده بر پایداری اکسایشی روغن سویا بررسی شد. ویسکوزیته سینماتیک و قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH به صورت تابعی از غلظت پروتئین هیدرولیز شده اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که میزان حلالیت پروتئین هیدرولیز شده‌ی گوشت کوسه چانه سفید در pH های مختلف بیش از ۸۳/٦٪، میزان دانسیته توده‌ای ۱۱۳/٤٦ گرم بر لیتر و میزان جذب روغن، ۱۳۱/۱۵ میلی‌گرم به ازای ۵۰ میلی‌گرم پودر پروتئین هیدرولیز شده بود. با افزایش غلظت محلول پروتئینی، ویسکوزیته سینماتیک افزایش یافت. ($P<۰/۰۵$). قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده با غلظت ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، ۹٦/٤۷٪ و دوره القایی۲/۳۸ساعت بود که بطور معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) بیشتر از نمونه روغن بدون آنتی-اکسیدان بود. در نتیجه پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید دارای خواص کاربردی و آنتی‌اکسیدانی مطلوب می‌باشد و می‌توان از آن به‌عنوان آنتی اکسیدان طبیعی در صنایع غذایی یا دارویی استفاده نمود.

کلید واژگان: پروتئین هیدرولیزشده، کوسه چانه سفید، خواص کاربردی، فعالیت آنتی اکسیدانی

* مسئول مکاتبات: amotgan@yahoo.com

Archive of SID
www.SID.ir

۱- مقدمه

کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) فراوانترین کوسه ماهی خلیج فارس و دریای عمان است. وجود مقدار زیاد اوره و بوی آمونیاکی در گوشت کوسه، فاکتور محدودکننده در مصرف گوشت آن به‌صورت تازه یا فرآوری شده می‌باشد[۱]. محصولاتی که طی تولید آنها گوشت شستشو داده می‌شود به دلیل حذف بخش عمده پروتئین‌های سارکوپلاسمیک و بخصوص میزان اوره، کیفیت و ارزش غذایی بالاتری دارند. با کاربرد روش‌های مناسب می‌توان از این منابع پروتئینی در جهت تولید محصولات با کیفیت و ارزش غذایی بیشتر استفاده نمود. یکی از این روش‌ها، هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها به‌منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده ماهی می‌باشد. خواص کاربردی پروتئین‌ها، رفتار و عملکرد آنها را در سیستم‌های غذایی در حین آماده سازی، فرآورش، نگهداری و مصرف کنترل می‌کند. تلاش‌های زیادی در جهت تبدیل پروتئین‌های غذایی به فرآورده‌ها با خواص کاربردی بهتر در طی اصلاح شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی صورت گرفته است. هیدرولیز آنزیمی از تکنیک‌های جالب در جهت اصلاح پروتئین‌ها بدلیل آسانتر بودن شرایط فرآورش، کنترل واکنش و تشکیل حداقل فرآورده‌های جنبی می‌باشد [۲]. هیدرولیز آنزیمی بر اندازه مولکولی، گروه‌های آبگریز و قطبی تأثیر می‌گذارد که بطور مستقیم بر خواص کاربردی آنها در ترکیب مواد غذایی موثر است [۳]. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های ماهی روشی مناسب در جهت بازیافت پپتیدهای زیست فعال برای کاربردهای غذایی و دارویی نیز می‌باشد [٤و٥]. اکسیداسیون لیپیدها یکی از مهمترین مشکلات در صنایع غذایی می‌باشد زیرا به گسترش بدطعمی و ترکیبات سمی منتج می‌گردد[٦]. علاوه بر آن تشکیل انواع اکسیژن فعال مانند رادیکال های آنیون سوپراکسید ($O_2^{\bullet}$) و هیدروکسیل ($OH^{\bullet}$)، عاملی برای آغاز بیماری‌های مزمن مانند بیماری های قلبی، آرترواسکلروزیس، دیابت و سرطان می باشد[۷].

آنتی‌اکسیدان‌ها با هدف افزایش عمر ماندگاری و پایداری روغن ها یا فرآورده های غذایی حاوی روغن از طریق به تعویق انداختن بی‌رنگی و فساد ناشی از اکسیداسیون، بکار می‌روند. بسیاری از آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی همانند بوتیل هیدروکسی آنیزول و بوتیل هیدروکسی تولوئن با هدف ممانعت از فساد مورد استفاده قرار می‌گیرند. اگرچه این ترکیب‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی‌تری در مقایسه با آنتی-اکسیدان‌های طبیعی از خود نشان می‌دهند، اما در مورد ایمنی این ترکیبات نگرانی‌هایی وجود دارد[۸]. بنابراین گسترش آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی بعنوان جایگزینی برای انواع سنتتیک از نظر محققین دارای اهمیت می باشد.

تاکنون تحقیقات گسترده‌ای در خصوص فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده گونه‌های مختلف ماهی شامل پروتئین کاپلین [٤]، آلاسکا پولاک [۹]، ماکرل [۱۰]، تون زردباله[۱۱] ، تیلاپیا [۱۲] انجام گرفته است.

هدف از مطالعه حاضر، استفاده بهینه از گوشت کوسه چانه سفید (*Carcharhinus dussumieri*) در جهت تولید فرآورده با ارزش افزوده و بررسی خواص کاربردی و فعالیت آنتی اکسیدانی پروتئین هیدرولیز شده گوشت آن بعنوان یکی از گونه‌های کم مصرف می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- تولید پروتئین هیدرولیز شده

فیله‌های منجمد کوسه چانه سفید با وزن تقریبی ۷۰۰ گرم از کارخانه آداک سبز نمونه (میرود، بابلسر، ایران) خریداری و توسط جعبه یونولیتی طی کمتر از ۲ ساعت به آزمایشگاه مرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان واقع درشهرستان ساری منتقل گردید. پس از انتقال به آزمایشگاه، توسط چرخ گوشت صنعتی با قطر سوراخ ۰/۵ میلی‌متر به‌طور کامل چرخ شد. به منظور کاهش اوره و نیتروژن فرار درگوشت کوسه، قبل از انجام هیدرولیز دو مرحله شستشو با آب نمک ۰/۱ مولار در دمای ٤°C صورت گرفت. برای انجام هیدرولیز از آنزیم آلکالاز با فعالیت آنزیمی۳٤ آنسون به ازای یک کیلوگرم پروتئین در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد و به‌مدت ۱۲۰ دقیقه انجام گرفت[۱۳]. غیرفعال‌سازی آنزیم، در دمای ۹۵°C به‌مدت ۱۵ دقیقه صورت گرفت. نمونه‌ها پس از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، به‌مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۳۲۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (Hermle Labrotechnik) GmbH z206a, Germany) گردید. سوپرناتانت حاصل جمع‌آوری شده و بوسیله خشک کن پاششی(Lab Plant, SD-Bacic, England) به پودر پروتئین تبدیل شد.

Archive of SID

www.SID.ir

۲-۲- ترکیب شیمیایی و درجه هیدرولیز

برای تعیین میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر گوشت خام و شسته شده کوسه از روش‌های استاندارد AOAC [۱٤] استفاده گردید. در محاسبه میزان پروتئین از ضریب ٦/۲۵ برای تبدیل نیتروژن به پروتئین استفاده شد.

درجه هیدرولیز به روش Fonkwe و Singah [۵] اندازه گیری شد. برای این منظور ۵ میلی لیتر از نمونه با ۵ میلی لیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و با ورتکس(Labtron, LS100,Thailand) با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه همزده شد. پس از سانتریفیوژ با سرعت ۳۲۰۰ دور بر دقیقه طی ۱۰ دقیقه، مقدار پروتئین در فاز محلول به روش Lowry و همکاران [۱٦] در طول موج ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری شد. میزان درجه هیدرولیز با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

۱۰۰×(میزان نیتروژن در نمونه/میزان نیتروژن درمحلول ۱۰ درصدتری کلرواستیک اسید)=درجه هیدرولیز

۲-۳- حلالیت

برای اندازه‌گیری حلالیت از روش Synowiecki و Al-Khateeb [۱۷] استفاده شد، pH محلول پروتئینی (با غلظت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) با کمک HCl و NaOH ۰/۱ نرمال در ۱، ۲، ۳، ٤، ۵، ٦، ۷، ۸، ۹، ۱۰ تنظیم شد. سپس نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه استراحت، به‌مدت ۱۵ دقیقه با شدت g× ۱۲۰۰۰ سانتریفوژ گردیدند و غلظت پروتئین در سوپرناتانت به روش Lowry و همکاران [۱٦] محاسبه شد. درصد حلالیت مطابق رابطه۲ محاسبه شد.

100×(مقدار پروتئین نمونه/مقدار پروتئین سوپرناتانت)=درصد حلالیت

۲-٤- دانسیته توده‌ای

ابتدا استوانه مدرج ۱۰ میلی‌لیتری توزین گردید. حجم مشخصی از استوانه با پودر پروتئین پر و توزین شد[۱۸].

دانسیته توده‌ای مطابق رابطه۳ محاسبه گردید.

حجم نمونه / وزن نمونه = دانسیته توده‌ای

۲-۵- ظرفیت جذب روغن

اندازه‌گیری ظرفیت جذب روغن مطابق روش Shahidi و Onodernalore [۱] انجام شد. در این روش ۵۰ میلی‌گرم از پروتئین هیدرولیزشده با ۱ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان (نینا، ایران) مخلوط گردید و به‌مدت ۳۰ ثانیه با سرعت ۳۰۰۰ دور بر دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفوژ با سرعت g×1000 بمدت ۳۰ دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، روغن اضافی دور ریخته شد و نمونه همراه با روغن جذب‌شده وزن گردید. ظرفیت جذب روغن به صورت وزن روغن جذب شده (برحسب میلی‌گرم) توسط ۵۰ میلی‌گرم نمونه گزارش شد.

۲-٦- منحنی جذب ایزوترم

منحنی جذب ایزوترم مطابق با روش Singh و Fonkwe [۱۵] تعیین شد. نمونه طی یک ساعت در دمای ٦۰ درجه سانتی‌گراد توسط آون تحت خلأ خشک گردید. نمونه های توزین شده در دسیکاتور تحت خلأ همراه با یک نمک اشباع با رطوبت نسبی مشخص قرار داده شد. با کمک پمپ خلأ به مدت ۳۰ ثانیه در دسیکاتور خلأ ایجاد شد. نمونه ها پس از ۱٤ روز از دسیکاتور خارج شدند و توزین گردیدند. میزان جذب ایزوترم مطابق رابطه ٤ محاسبه گردید.

۱۰۰ ×(جرم نمونه خشک شده /جرم آب جذب شده)=جذب ایزوترم

در این آزمون از نمک های لیتیوم کلراید، منیزیم کلراید، نیترات منیزیم، کلراید سدیم و نیترات پتاسیم به‌ترتیب با رطوبت‌های نسبی ۱۲، ۳۳، ۵۵، ۷٦ و ۹۳ درصد استفاده گردید.

۲-۷ - ویسکوزیته سینماتیک

ویسکوزیته سینماتیک محلول‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ۵ درصد پروتئین هیدرولیزشده به‌صورت تابعی از غلظت توسط ویسکومتر لوله مویین (Cannon-Fenske Viscometer, Schott Gerate, Germany) شماره ۱۰۰ محاسبه شد. دمای ویسکومتر بوسیله حمام آبی در ۱۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. مدت زمان عبور نمونه از ویسکومتر اندازه‌گیری و ویسکوزیته سینماتیک (برحسب سانتی استوک) مطابق رابطه۵ تعیین گردید [۱۹].

ویسکوزیته = زمان جریان × C_0[۱- B (دمای آزمایش-دمای پر کردن)] [

C_0=0.01536

B=86.2×10^{-6}/°C

۲-۸- ساختار فیزیکی

بررسی ساختار فیزیکی پودر پروتئین هیدرولیز شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی(YKY-EM3200, China) انجام‌پذیرفت. از دستگاه لایه نشان طلا (KYKY-SBC12-China) بمنظور ایجاد لایه‌ی طلا با ضخامت حدود ۱۰۰ آنگستروم استفاده گردید. تصویربرداری از نمونه‌ها با

Archive of SID
www.SID.ir

بزرگنمایی ۵۰۰ و ولتاژ ۲۵ کیلووات برای ایجاد میدان مغناطیسی در اطراف ستون دستگاه انجام گرفت.

۲-۹- قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH

قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH به‌صورت تابعی از غلظت پروتئین هیدرولیزشده محاسبه گردید. به این منظور ۲ میلی لیتر از محلول‌های پروتئین هیدرولیزشده (با غلظت‌های ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در آب) به ۲ میلی‌لیتر محلول ۰/۱ میلی‌مولار DPPH در اتانول ۹۹/۷٪ مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه میزان جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر(T80$^+$ UV/VIS Spectrum, British) قرائت گردید[۲۰]. درصد حذف رادیکال آزاد با رابطه ۸ سنجیده شد:

$$\% \text{ RSA} = [1 - ((A_t - A_b) / A_0)] \times 100$$

A_t: ۲ میلی لیتر نمونه + ۲ میلی لیتر DPPH ۰/۱ میلی مولار

A_b: ۲ میلی لیتر نمونه+ ۲میلی لیتر اتانول ۹۹/۷٪

A_0: ۲میلی لیتر آب مقطر+ ۲ میلی لیتر DPPH ۰/۱ میلی مولار

۲-۱۰- تعیین میزان پایداری اکسیداسیونی توسط دستگاه رنسیمت

به منظور تعیین طول دوره‌ی القایی در نمونه‌های روغن سویا حاوی پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید از روش Kim و همکاران [۲۱] استفاده شد. به ۲/۵ گرم روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان (شرکت سینا سون)، ۰/۵ گرم از پروتئین هیدرولیزشده و ۰/۲ گرم توبین ۸۰ اضافه شد. در این روش از دستگاه رنسیمت (Metrohm Rancimat Model 743 Herisau, Switzerland) استفاده گردید. جریان هوا با سرعت ۲۰ لیتر بر ساعت به درون ظرف حاوی نمونه دمیده و هوای حامل اسیدهای آلی فرار ناشی از اکسایش نمونه به ظرف اندازه‌گیری هدایت الکتریکی (حاوی ٦٠ میلی لیتر آب مقطر) هدایت شدند. شاخص پایداری اکسایشی به طور خودکار در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد. تیمار شاهد بدون نمونه پروتئین هیدرولیز شده با همان شرایط قبلی آماده شد. برای مقایسه نتایج حاصل، از روغن حاوی ویتامین E با نسبت ۰/۰۷۵٪ (وزنی/ وزنی) (طبق پیشنهاد شرکت تولیدکننده) استفاده گردید.

۳- تجزیه وتحلیل آماری

تجزیه وتحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS.16 و روش تجزیه واریانس یکطرفه (one way ANOVA) برای مقایسه میانگین‌ها و درصورت معنی دار بودن اختلاف میان نمونه ها در سطح اطمینان ۹۵ از آزمون دانکن (Duncan) استفاده گردید. برای ترسیم نمودارها نرم‌افزارExcel.2010 بکار گرفته شد.

٤- نتایج و بحث

٤-۱- ترکیب شیمیایی و درجه هیدرولیز

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی گوشت خام و شسته شده کوسه چانه سفید در جدول ۱ ارایه شده است. مقدار درجه هیدرولیزاسیون گوشت کوسه چانه سفید ٤٦ درصد بود. درجه هیدرولیزاسیون یکی از پارامترهای تعیین میزان باندهای شکسته شده می‌باشد که در تعیین خصوصیات پروتئین هیدرولیزشده به منظور دستیابی به یک سیستم ایده‌آل آنزیمی- پروتئینی بسیار دقیق می‌باشد[۱۳]. هیدرولیز باندهای پپتیدی باعث تغییراتی مثل افزایش گروه‌های کربوکسیلی و آمینی می‌شود و در نتیجه حلالیت پروتئین‌ها افزایش و وزن مولکولی کاهش می‌یابد[۲۲].

جدول ۱ ترکیب شیمیایی گوشت خام و شسته شده کوسه چانه سفید[۱]

ماده	پروتئین	چربی	رطوبت	خاکستر
گوشت خام	۲۳/۸۱ ±۱/۷۲	۳/۸۸ ±۰/۵۲	۷۳/۳۱ ±۰/۹۳	۱/۳۱ ±۰/٤۲
گوشت شسته شده	۲۲/۱۸±۱/۷	۱/٤٤ ±۰/۲۱	۷٦/۷۵ ±۰/۸۷	۰/۹۲ ±۰/۰۸

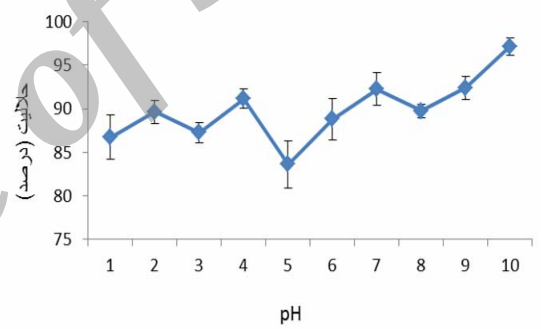
۱. همه اعداد به‌صورت درصد بیان شده است (انحراف از معیار± میانگین)

Archive of SID

www.SID.ir

٤-۲- حلالیت

میزان حلالیت پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید در محدوده pH، ۱تا ۱۰ در شکل ۱ نشان داده شده است. بالاترین و پایین‌ترین میزان حلالیت به ترتیب مربوط به pHهای ۱۰و۵ بود. بنابراین pH، ۵ بعنوان نقطه ایزوالکتریک پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید در نظر گرفته می‌شود. در اثر هیدرولیز آنزیمی، پروتئین‌ها به پپتیدهای کوچکتر تبدیل می‌شود و در نتیجه حلالیت نیز نسبت به پروتئین‌های اولیه افزایش می‌یابد[۲۳]. پروتئین‌های میوفیبریلی ماهی دارای مشکل عدم حلالیت در آب، در یک دامنه وسیع pH هستند، در حالیکه پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای حلالیت خوب در محدوده وسیع یونی،pH و مقاوم در برابر حرارت بوده و ته-نشین نمی‌شوند [٢٤]. بعلاوه پروتئین‌های نامحلول توسط سانتریفوژ نمودن قبل از مرحله خشک‌سازی جدا می‌گردند.



شکل ۱ حلالیت پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید در pH های مختلف

٤-۳- دانسیته توده‌ای

مقدار دانسیته توده‌ای پروتئین هیدرولیز شده ۱۱۳/٤٦ گرم بر لیتر بود. دانسیته توده‌ای نشان‌دهنده رفتار محصول در مخلوط-های خشک می‌باشد و در بسته‌بندی پودر پروتئین هیدرولیز شده اهمیت دارد. درجه حرارت در طی فرآیند خشک‌کردن بر دانسیته توده‌ای مؤثر است. سرعت بالای خشک‌نمودن با استفاده از هوا با دمای بالا که در روش خشک‌کردن به روش پاششی رخ می‌دهد، منجر به تبخیر و جامد سازی سریع و تولید کپسول‌هایی با نسبت سطح به حجم بیشتر می‌شود در نتیجه باعث کاهش دانسیته توده‌ای می‌گردد [۲۵]. همانطور که در شکل ٤ مشاهده می‌گردد، تولید ذرات کروی شکل در این روش بر مقدار دانسیته توده‌ای موثر است. Sathivel و همکاران در سال ۲۰۰۳ [٢٦] دانسیته توده‌ای ۳٤۰ گرم بر لیتر را برای پروتئین هیدرولیز شده گربه ماهی که با اسپری درایر خشک شده بود، گزارش نمودند.

Desobry و همکاران در سال ۱۹۹۷ [۲۷] با بررسی انکپسوله‌های بتاکاروتن تحت روش‌های مختلف خشک‌کردن به این نتیجه رسیدندکه انکپسوله‌های تولید شده به روش پاششی، دارای بیشترین میزان دانسیته توده‌ای در مقایسه با انواع تولید شده با خشک‌کن‌های انجمادی و درام می‌باشد.

آگاهی از دانسیته فرآورده‌های غذایی از نظر تنظیم شرایط فرآورش، بسته‌بندی، نگهداری و حمل و نقل، دارای اهمیت می‌باشد [۲۸]. بالا بودن دانسیته توده‌ای به معنای بسته‌بندی نسبتاً کوچک است. به هر حال دانسیته توده‌ای کم، غالباً مشکل مهمی محسوب نمی‌گردد تا زمانیکه ثابت بماند [۲۵]. بالا بودن مقدار دانسیته توده‌ای به‌منظور بکارگیری در فرمولاسیون موادغذایی کودکان نامطلوب می‌باشد [۲۹].

٤-٤- ظرفیت جذب روغن

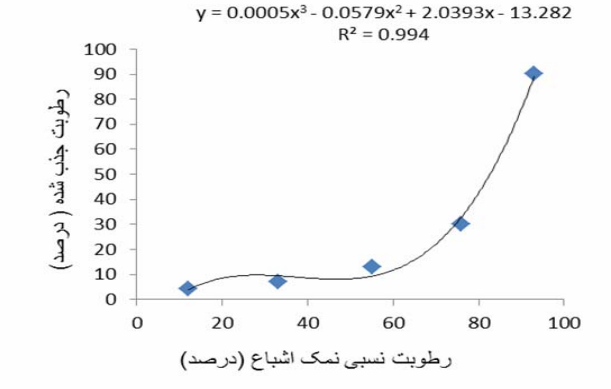
میزان جذب روغن ۱۳۱/۱۵میلی‌گرم به ازای ۵۰ میلی‌گرم پودر پروتئین هیدرولیز شده بود. ظرفیت اتصال به روغن در ارتباط با خواص آبگریزی سطح پروتئین‌های هیدرولیزشده می باشد. فاکتورهای مختلفی مانند دانسیته توده‌ای، درجه هیدرولیز[۳۰] و نوع آنزیم [۳۱] می‌تواند بر ظرفیت جذب روغن پروتئین هیدرولیز شده موثر باشد. تحقیقات نشان داده است که با افزایش درجه هیدرولیز، میزان جذب روغن کاهش می یابد که به دلیل شکستن تعداد زیادی پیوند پپتیدی می باشد [۱۸]. ظرفیت جذب روغن پروتئین‌های هیدرولیز شده، ویژگی مهمی است که نه تنها روی طعم فرآورده تأثیر می‌گذارد، بلکه روی خواص مهم کاربردی مورد نیاز صنایع فرآوری گوشت و شیرینی سازی موثر می باشد.

Sathivel و همکاران در سال ۲۰۰۳ [٢٦]، خواص کاربردی پروتئین هیدرولیزشده ماهی هرینگ را مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده ماهی هرینگ دارای قدرت جذب روغن قابل مقایسه با آلبومین تخم مرغ است. Wang و Kinsella در سال ۱۹۹۷ [۳۲] ارتباط بین میزان جذب روغن و دانسیته توده‌ای را بیشتر از ۰/۹۵ بیان نمودند.

Archive of SID
www.SID.ir

٤-٥- جذب ایزوترم

منحنی جذب ایزوترم پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید توسط نمک‌های اشباع (لیتیوم کلراید، منیزیم کلراید، نیترات منیزیم، کلراید سدیم و نیترات پتاسیم) با رطوبت‌های نسبی ۱۲، ۳۳، ۵۵، ۷٦ و ۹۳ درصد تعیین گردید. همانطور که در شکل ۲ مشاهده می‌گردد، با افزایش میزان رطوبت نسبی نمک‌های اشباع، میزان رطوبت جذب شده به‌صورت غیر خطی افزایش یافت. در حقیقت تغییرات تا رطوبت نسبی ۷٦٪ عمدتاً خطی بود و با افزایش رطوبت نسبی به ۹۳٪ روند تغییرات بطور محسوسی از حالت خطی خارج شد. در نتیجه پروتئین های هیدرولیز شده، بسیار سریع رطوبت جذب می‌کنند. پروتئین هیدرولیزشده ماهی به شدت دارای خاصیت هیگروسکوپی می‌باشند. این خاصیت در طی تولید آنها ایجاد می‌گردد. بسته بندی مناسب و رطوبت نسبی پایین هوا در طی فرآورش از فاکتورهای دارای اهمیت می‌باشد. حضور گروههای قطبی مانند COOH و NH_2 که در حین هیدرولیز آنزیمی افزایش می‌یابند، دارای اثر مهمی بر مقدار آب جذب شده و ایزوترم جذب دارد [۲۷]. یکی از فاکتورهای مهم در جذب ایزوترم اندازه ذرات پودر مورد آزمایش می‌باشد. طی بررسی انجام شده توسط Mathlouthi و Rog [۳۳] ، مقدار آب جذب شده توسط ذره های شکر با اندازه کوچکتر بیشتر از ذره‌های شکر با اندازه‌های بزرگتر است.

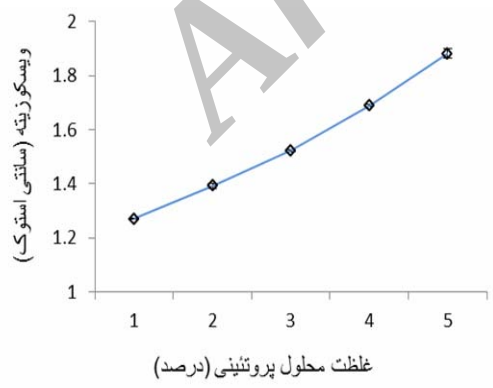


شکل۲ منحنی جذب ایزوترم پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه چانه سفید

٤-٦- ویسکوزیته سینماتیک

ویسکوزیته سینماتیک محلول‌های ۱، ۲، ۳، ٤ و ٥ درصد پروتئین هیدرولیز شده محاسبه گردید (شکل ۳). همانطور که مشاهده می‌گردد، با افزایش غلظت پروتئین، میزان ویسکوزیته با اختلاف معنی‌داری بصورت تقریباً خطی افزایش یافت. پروتئین‌های هیدرولیزشده گوشت کوسه چانه سفید رفتاری بسیار شبیه یک سیال نیوتنی داشته‌اند. بطور کلی پایین بودن ویسکوزیته محلول‌های پروتئین هیدرولیزشده را به پایین بودن وزن مولکولی آن نسبت می‌دهند.

ویسکوزیته از خواص مهم فرآورده‌های غذایی است که بر بافت مایعاتی مانند نوشیدنی‌ها و در فرآیندهایی مانند پمپ کردن، اکستروژن و خشک کردن موثر است. پایین بودن میزان ویسکوزیته محلول‌های پروتئینی در طی مراحلی مثل پمپاژ کردن و جریان یافتن و بالا بودن میزان ویسکوزیته و قدرت تشکیل ژل پس از حرارت‌دهی برای قوام سوپ‌ها، تولید سوسیس و آنالوگ‌های گوشتی مطلوب می‌باشد[٣٤]. بنابراین، می‌توان از پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید در فرمولاسیون ماست، سوپ و غذای کودکان که نیازمند فرآورده ها با ویسکوزیته پایین و خواص ضعیف تشکیل ژل می‌باشد، استفاده نمود. Dinize و Martin [۳۵]، ویسکوزیته ظاهری پروتئین هیدرولیز شده کوسه (*Squalus acanthia*) را در غلظت‌های مختلف مورد بررسی قرار دادند. نتایج تحقیق آنها نشان داد که با افزایش غلظت محلول پروتئینی، میزان ویسکوزیته نیز افزایش می‌یابد.



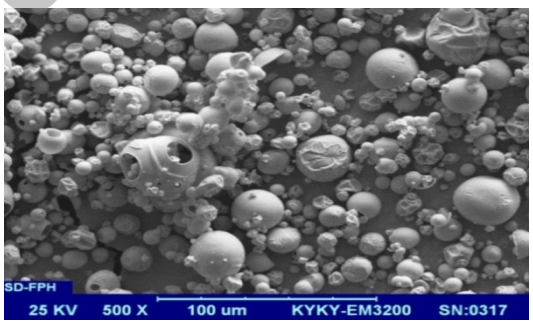
شکل ۳ ویسکوزیته سینماتیک پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه چانه سفید

Archive of SID

www.SID.ir

٤-٧- ساختار فیزیکی

ساختار فیزیکی پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید خشک شده به روش پاششی در شکل شماره ٤ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌گردد، از نظر مورفولوژیکی، ذرات پروتئین هیدرولیز شده به صورت کروی و دارای فرورفتگی می‌باشند. برخی از ذرات دارای سطح صاف می‌باشند. درجه حرارت هوای ورودی در خشک‌کن پاششی بر روی مورفولوژی ذرات موثر است. ساختار مشابهی توسط Kamrul و همکاران، در مورد لاکتوز و مخلوط لاکتوز / پروتئین مشاهده شد[٣٦]. Cepeda و همکاران [٣٧]گزارش نمودند که پودر پروتئین باقلا (*Vicia faba*) که به روش پاششی خشک شده بود، دارای ذرات یکنواخت‌تر و ٣٢٪ اندازه کوچکتر در مقایسه با پروتئین خشک شده به روش انجمادی بودند. اساساً این پدیده، به دلیل پاشش قطره‌های محصول در طی فرآیند خشک کردن به روش پاششی می‌باشد که نتیجه آن تولید ذرات کوچک و کروی با نسبت سطح به حجم بیشتر می‌باشد.



شکل ٤ تصویر میکروسکوپ الکترونی از پودر پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه چانه سفید(×٥٠٠)

٤-٨- قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH

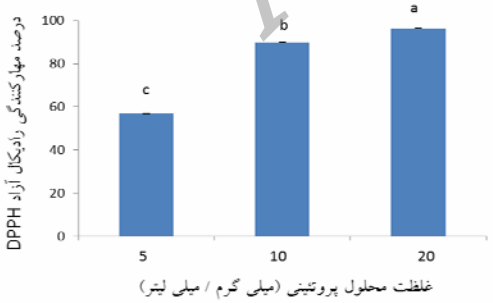
نتایج نشان داد که بیشترین میزان قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید مربوط به محلول پروتئینی با غلظت ٢٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بود. بین غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده در میزان حذف رادیکال آزاد DPPH اختلاف معنی‌دار ($P<0.05$) مشاهده شد.

مطالعات متعددی روی خواص آنتی اکسیدانی پروتئین های هیدرولیز شده ماهی انجام شده است [٣٨]. حذف رادیکال آزاد، مکانیسم اولیه‌ای است که توسط آن مواد آنتی‌اکسیدان می‌توانند از واکنش‌های اکسیداسیون جلوگیری کنند. DPPH یک رادیکال آزاد پایدار با اتم مرکزی نیتروژن بوده که از طریق فرآیند احیا، رنگ آن از ارغوانی به زرد تبدیل می شود. ترکیب‌هایی که قابلیت انجام این عمل را دارند به عنوان آنتی-اکسیدان مطرح می‌شوند [٣٩]. Batista و همکاران در سال ٢٠١٠ از نسبت‌های مختلف (٠/٥، ١، ٢ و ٤٪) آنزیم پروتامکس به‌منظور هیدرولیز مواد جنبی (*Aphanopus carbo*) استفاده نمودند. با افزایش درجه هیدرولیز، قدرت کاهندگی و حذف رادیکال DPPH پروتئین هیدرولیز شده افزایش یافت [٤٠].

Foh و همکاران در سال ٢٠١٠ [٢٩] به بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین هیدرولیزشده ماهی تیلاپیا (*Oreochromis niloticus*) پرداختند. نتایج تحقیقات آنها نشان داد که بیشترین مقدار مهارکنندگی رادیکال DPPH (٨٦/٦٧ درصد) در غلظت ٤٠ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر مربوط به نمونه هیدرولیزشده توسط آلکالاز بود.

Ovissipour و همکاران در سال ٢٠١٢ [٤١] اثر خودهضمی و هیدرولیز توسط پروتئازهای تجاری را بر فعالیت آنتی-اکسیدانی پروتئین ماهی کیلکا (*Clupeonella engrauliformis*) مورد بررسی قرار دادند. با توجه به نتایج بدست آمده توسط این محققین، پروتئین هیدرولیزشده ماهی کیلکا دارای فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی بود.

بنابراین پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید با شرایط هیدرولیز مذکور به‌عنوان یک دهنده‌ی الکترون خوب عمل کرده که می‌تواند با رادیکال آزاد وارد واکنش شده و به واکنش‌های زنجیره‌ای رادیکالهای آزاد پایان دهد.



شکل ٥ قدرت حذف رادیکال آزاد DPPH غلظت‌های مختلف پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید

Archive of SID
www.SID.ir

٤-٩- تعیین پایداری اکسایشی

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمون رنسیمت، نمونه حاوی ویتامین E و شاهد (روغن سویا بدون آنتی‌اکسیدان) به ترتیب با مقادیر ٨/٤٢ و ٠/٧٦ ساعت دارای بیشترین و کمترین طول دوره القایی بوده‌اند. مقدار این شاخص در روغن سویا حاوی پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید، ٢/٣٨ ساعت مشاهده شد که در مقایسه با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری داشته است. در نتیجه پروتئین هیدرولیز شده کوسه چانه سفید قادر به افزایش پایداری اکسایشی روغن سویا می‌باشد. نتایج مشابهی توسط Kim و همکاران [٢١] که به بررسی و شناسایی توالی‌های آنتی اکسیدانی ژلاتین هیدرولیز شده پوست ماهی *Sebastes schlegelii* پرداختند، مشاهده شد. دلیل بالا بودن طول دوره القایی در نمونه‌های دارای ویتامین E را احتمالا می‌توان به خاصیت محلول در روغن بودن ویتامین E، نسبت داد. بنابراین بطور موثرتری خاصیت آنتی‌اکسیدانی خود را در روغن اعمال می‌کند.

٥- نتیجه‌گیری

گوشت کوسه ماهی چانه سفید بدلیل وجود مقادیر زیاد اوره از بازارپسندی کمی برخوردار است. برای استفاده مناسب از این منبع با ارزش پروتئینی، کاربرد تکنیک‌های مناسب در جهت کاهش اوره و بهبود خواص کاربردی آن حائز اهمیت می‌باشد.با توجه به مجموع نتایج حاصل از این پروژه، تولید پروتئین هیدرولیزشده کوسه چانه سفید علاوه براین که موجب استفاده بهینه از این منبع دریایی می‌گردد، می‌تواند بعنوان یک جزء غذایی دارای خواص عملکردی مناسب و حاوی پپتیدهای زیست‌فعال با خواص ویژه از جمله فعالیت آنتی‌اکسیدانی، در صنایع غذایی و دارویی مورد استفاده قرار بگیرد.

٦- منابع

[1] Shahidi, F. & Onodenalore, A. (1995). Water dispersions of Myofibrillar Proteins from Capelin (*Mallotus villosus*). Food Chemistry, 53: 51-54.

[2] Liu, Q., Kong, B., Xiong, Y. L., & Xia, X. (2010). Antioxidant activity and functional properties of porcine plasma protein hydrolysate as influenced by the degree of hydrolysis. Food Chemistry, 118: 403–410.

[3] Klompong, V., Benjakul, S., Kantachote, D., & Shahidi, F. (2007). Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally (*Selaroides leptolepis)* as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry, 102: 1317–1327.

[4] Amarowicz, R., & Shahidi, F. (1997). Antioxidant activity of peptide fractions of capelin protein hydrolysates. Food Chemistry, 58: 355–359.

[5] Wergedahl, H., Liaset, B., Gudbrandsen, O. A., Lied, E., Espe, M., Muna, Z. (2004). Fish protein hydrolyzate reduces plasma total cholesterol, increases the proportion of HDL cholesterol and lowers acyl-CoA: cholesterol acyltransferase activity in liver of Zucker rats. Journal of Nutrition, 134: 1320–1327.

[6] Lin, CC. Liang, JH. (2002). Effect of antioxidants on the oxidative stability of chicken breast meat in a dispersion system Journal of Food Science, 67:530–3.

[7] Da´ valos, A., Miguel, M., Bartolome´, B., & Lopez-Fandin˜ o, R. (2004). Antioxidant activity of peptides derived from egg white proteins by enzymatic hydrolysis. Journal of Food Protection, 67: 1939–1944.

[8] Ito, N., Hirose, M., Fukushima, S., Tsuda, H., Shirai, T., Tatematsu, M. (1986). Studies on antioxidants: their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. Food Chemical Toxicolm, 24: 1071–82.

[9] Je, J.Y., Park, P. J., Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (*Theragra chalcogramma*) frame protein hydrolysate. Food Research International. 38: 45–50.

[10] Wu, C. H., Chen, H. M., Shiau, C. Y. (2003). Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). Food Research International, 36: 949–957.

[11] Jun, S. Y., Park, P. J., Jung, W. K., Kim, S.K. (2004). Purification and characterization of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellowfin sole (*Limanda aspera*) frame protein. European Food Research and Technology, 219:20–6.

[12] Raghavan, S., Kristinsson, HG., Leeuwenburgh, C. (2008). Radical scavenging and reducing ability of tilapia (*Oreochromis*

Archive of SID

www.SID.ir

niloticus)protein hydrolysates. Journal of Agricultural and Food Chemistry,56:10359–10367.

[13] Ovissipour, MR., 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. Food Chemistry. 115: 238–242.

[14] AOAC (2002). In: Hortwitz W (ed) Official Methods of Analysis of AOAC International, 17th ed. Gaithersburg: AOAC International.

[15] Fonkwe, L., Singh, R. (1996). Protein Recovery from Mechanically Deboned Turkey Residue by Enzymic Hydrolysis. Process Biochemistry, 31: 605-616.

[16] Lowry, O.H., Rosebroug, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. Journal of Biological Chemistry, 193: 265-275.

[17] Synowiecki, J., Al-Khateeb, N.A.A.Q. (2000). The Recovery of Protein Hydrolysate During Enzymatic Isolation of Chitin from Shrimp (*Crangon crangon*) Processing Discards. Food Chemistry, 68: 147-152.

[18] Kinsella, J.E. (1976). Functional properties of proteins in foods: a survey. Critical Reviews in Food Science and Nutrition,8: 219–80.

[19] Regenstein, J.M., Regenstein, C., Kochen B. (1984). Food protein chemistry: An Introduction for Food Scientists. Academic Press, 353 p.

[20] Shahidi, F., Liyana-Pathirana, C.M., Wall, D.S. (2006). Antioxidant Activity of White and Black Sesame Seeds and Their Hull Fractions. Food Chemistry, 99: 478-483.

[21] Kim, H.J., Park, K., Shin, J., Lee, J., Heu, M., Lee, D. (2011). Fractionation and Characterization of Fractions with High Antioxidative Activity from the Gelatin Hydrolysates of Korean Rockfish Sebastes schlegelii Skin. Fisheries and Aquatic Sciences, 14: 168-173.

[22] Slizyte, R., Daukšas, E., Falch, E., Storrø, I., Rustad, T. (2005). Characteristics of Protein Fractions Generated from Hydrolysed Cod (*Gadus morhua*) By-products. Process Biochemistry, 40: 2021-2033.

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

[24] Venugopal, V., Shahidi, F. (1994). Thermostable water dispersions of myofibrillar proteins from Atlantic mackerel (*Scomber scombrus*). Journal of Food Science, 59: 265-268.

[25] Vant Land, C.M. (2011). Drying in the process industry, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 9-19.

[26] Sathivel, S. P.J. Bechtel, J., Babbitt, S., Smiley, C., Crapo, K.D., Reppond, W. (2003). Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) by-product hydrolysates . Journal of Food Science,68: 2196–2200.

[27] Desobry, S.A., Netto, F.M. & Labuza, T.P. (1997). Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for carotene encapsulation and preservation. Journal of Food Science, 62: 1158-1162.

[28] Barbosa-Cánovas, G.V. & Juliano, P. (2005). Physical and chemical properties of food powders. In: C. Onwulata,ed. *Encapsulated and Powdered Foods*. Taylor and Francis, Boca Raton, USA, pp. 39–71.

[29] Foh, M.B.K., Amadou, I., Foh, B.M., Kamara, M.T. & Xia, W. (2010). Functionality and antioxidant properties of tilapia (Oreochromis niloticus) as influenced by the degree of hydrolysis. International Journal of Molecular Sciences, 11: 1851-1869.

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

[31] Haque, Z.U. (1993). Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: A review, Journal of Dairy Science,76: 311–326.

[32] Wang, JC., Kinsella, J. E. (1976). Functional properties of novel proteins: alfalfa leaf protein. Journal of Food Science, 41:286–92.

[33] Mathlouthi, M. and Roge, B. (2003). Water vapour sorption isotherms and the caking of food powders. Food Chemistry, 82(1): 61-71.

[34] Yu, J., Ahmedna, M., Goktepe, I. (2007). Peanut protein concentrate: Production and functional properties as affected by processing. Food Chemistry, 103: 121-129.

Archive of SID

www.SID.ir

[35] Diniz F., Martin A. (1997). Effects of the Extent of Enzymatic Hydrolysis on Functional Properties of Shark Protein Hydrolysate. Lebensmittel-Wissenschaft and Technology, 30: 266-272.

[36] Kamrul, H. Md,. Roos, Y. H. (2006). Differences in the physical state and thermal behavior of spray-dried and freeze-dried lactose and lactose/protein mixtures. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 7:62–73.

[37] Cepeda, E., Villaran, M. C., Aranguiz, N. (1998). Functional properties of Faba Bean (*Vicia faba*) protein flour dried by spray drying and freeze drying. Journal of Food Engineering, 36: 303– 310.

[38] Je, J.Y., Qian, Z.J., Byun, H.G., Kim, S.K. (2007). Purification and characterization of an antioxidant peptide obtained from tuna backbone protein by enzymatic hydrolysis. Process Biochemistry, 42: 840-846.

[39] Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. LWT-Food Science and Technology, 28: 25-30.

[40] Batista, I., Ramos, C., Coutinho, J., Bandarra, N., Nunes, M. (2010). Characterization of protein hydrolysates and lipids obtained from black scabbardfish by-products and antioxidative activity of the hydrolysates produced. Process Biochemistry, 45: 18-24.

[41] Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S.G., Gholami, S., Nemati, M. (2012). Antioxidative activity of protein hydrolysates from the whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis*) prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. Journal of the Science of Food and Agriculture, DOI 10.1002/jsfa.5957.

Archive of SID

www.SID.ir

Functional properties and antioxidant activities of protein hydrolysates from whitecheeck shark (*Carcharhinus dussumieri*) meat

Alinejad, M. [1], Motamedzadegan, A. [2*], Rezaei, M. [1]

1. Department of Seafood Science and Technology, Faculty of Marine Sciences, Tarbiat Modares University, Nour, Mazandaran, Iran
2. Department of Food Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Mazandaran, Iran

(Received: 92/10/23 Accepted: 93/4/8)

Whitecheek shark (*Carcharhinus dussumieri*) meat was washed two times by 0.1 M NaCl and then hydrolysed using Alcalase in 50˚C for 120 minutes. The hydrolysate was dried by spray dryer. Functional properties includes, solubility, bulk density, oil-holding capacity, sorption isotherm, kinematic viscosity and antioxidant activities such as DPPH radical-scavenging activity and the oxidative stability of soybean oil with protein hydrolysate were investigated. Kinematic viscosity and DPPH radical-scavenging activity were measure in different concentration of protein hydrolysates. The results showed that protein hydrolysate of whitecheeck shark has high solubility (>83.6%) at different pH. Bulk density, oil-holding capacity were 113.46 (mg/l), 131.15 (mg/50mg of sample), respectively. The more the protein concentration, the more the kinematic viscosity (P<0.05).The values of DPPH and Induction period were 96.47% and 2.38 hours, respectively. Results showed that whitecheeck shark protein hydrolysate has desirable functional properties and antioxidant activity that could be use as natural antioxidant in food and pharmaceutical industries.

Keywords: Protein hydrolysate, Whitecheeck shark, Functional properties, Antioxidant activity

Archive of SID

* Corresponding Author E-Mail Address: amotgan@yahoo.com

www.SID.ir