نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۶، شماره ۱، بهار ۱۳۸۹، ص. ۷۶ ۶۸

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 6, No. 1, 2010, p. 68-76

بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم‌های تجاری

محمودرضا اویسی پور[۱]- عبدالمحمد عابدیان کناری[۲*]- علی معتمدزادگان[۳]- رجب محمد نظری[۴]

تاریخ دریافت:۸۸/۱۲/۱
تاریخ پذیرش:۸۹/۶/۱

چکیده

در تحقیق حاضر پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی تون زردباله، با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز میکروبی آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلکالاز به صورت معنی داری از لحاظ میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده بود ($P< ۰/۰۵$). اما هیچ اختلاف معنی داری از لحاظ میزان چربی، رطوبت و خاکستر بین نمونه‌ها وجود نداشت ($P> ۰/۰۵$). ترکیب اسیدهای آمینه نیز نشان داد که پروتئین‌ها هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف دارای ترکیب نسبتا مشابهی هستند. همچنین نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین‌ها نیز حاکی از تشابه آنها و بالا بودن ارزش غذایی بود. شاخص شیمیایی نشان داد که هر سه پروتئین هیدرولیز شده، به خوبی می توانند نیاز یک انسان بالغ به اسیدهای آمینه را مرتفع سازند، در حالی که در مقایسه با نیازهای ماهی کپور، از لحاظ اسیدهای آمینه متیونین، لایزین و فنیل آلانین، دارای محدودیت هستند. با توجه به نتایج می توان آنزیم آلکالاز را نسبت به دو آنزیم دیگر، ارجح دانست. همچنین با توجه به ارزش غذایی بالای پروتئین هیدرولیز شده، می توان کاربرد آن را در جیره غذایی توصیه نمود.

واژه‌های کلیدی: ماهی تون، هیدرولیز آنزیمی، آنزیم‌های تجاری، ارزش غذایی

مقدمه

بر اساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان بالغ بر ۱۳۲ میلیون تن می باشد (۱۱). این میزان نسبتا بالای صید جهانی و به دنبال آن صنایع عمل آوری، منجر به تولید حجم بالایی از مواد جانبی و غیر قابل استفاده گردیده که بدون هیچ توجه زیست محیطی، دور ریخته می شود. عمده ترین مواد جانبی صنایع عمل آوری آبزیان شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوان‌های تنه می باشد (۷). این ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و چربی بوده که باعث تسریع فساد در آنها می گردد (۸). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو احسن مورد استفاده قرار بگیرند، از یک سمت باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن آنها شده و از سوی دیگر تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا را به دنبال خواهند داشت (۱).

شاید بتوان اذعان نمود که بهترین راه برای تولید محصولاتی با ارزش افزوده بالا از این مواد خام کم ارزش، کاربرد آنزیم‌های پروتئاز به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده می باشد (۱۶).

پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهیان، دارای کاربردهای وسیعی هستند. این مواد به دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال، کندروتین سولفات و خواص ضد اکسایشی، از جمله مواد مناسب برای درمان سرطان محسوب می شوند. از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی هستند و می توانند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان، دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند (۱). همچنین نقش موثر پروتئین‌های هیدرولیز شده به عنوان منبع نیتروژن در محیط‌های کشت باکتری، به اثبات رسیده است (۱۳،۲۷و۲۸).

تحقیقات زیادی روی هیدرولیز آنزیمی قسمت‌های مختلف ماهی با استفاده از آنزیم‌های تجاری انجام شده است. بسیاری از این

۱و۲ دانشجوی دکتری و دانشیارگروه شیلات، دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی، دانشگاه تربیت مدرس نور
(*- نویسنده مسئول: Email:aabedian@modares.ac.ir)
۳ استادیار دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری
۴ استادیار مرکز تکثیر و پرورش تاسماهیان شهید رجایی ساری

تحقیقات، اثر آنزیم‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده اند کـه از آن جمله می توان بـه آنـزیم پاپـاین بـا منشـاء گیـاهی (۱۵و۲۹)، آنـزیم تریپسین و کموتریپسین با منشاء جانوری (۲۵و۳۱)، آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایـم و نئـوتراز بـا منشـاء میکروبـی (۶، ۷، ۸، ۲۷ ۲۴و۲۸) اشاره نمود. به طور کلی، آنزیم‌های با منشاء میکروبی نسـبت به سایر آنزیم ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آنجمله می توان به پایداری بیشتر در حرارت‌ها و pHهای بـالا و خصوصـیات مناسـب پروتئولتیکی اشاره نمود (۱۰).

یکـی از مهمتـرین فاکتورهـای بررسـی خـواص پـروتئین‌هـای هیدرولیز شده، درجه هیدرولیزاسیون می باشد که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می کند و بایـد کنتـرل گـردد. ایـن فـاکتور و کنترل آن بسیار مهـم اسـت، زیـرا کـه بسـیاری از خـواص پـروتئین هیدرولیز شده، از جمله میـزان اسـیدهای آمینـه آزاد، میـزان انحـلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته بـه شـدت و درجـه هیدرولیزاسیون می باشد (۳۲). از طرف دیگر، هیدرولیز شدید آنزیمـی که باعث از بین رفتن خواص حساسیت زای پروتیئن‌ها شده و کـاربرد آنها را در تغذیه کودکان دچار حساسیت، ممکن می سـازد، بـا بررسـی درجه هیدرولیزاسیون، تخمین زده می شود (۲۱).

بازیافـت نیتروژنـی یکـی دیگـر از فاکتورهـای مهـم در بررسـی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسـوب مـی شـود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلـول از انـواع غیـر محلـول، و در نتیجـه میـزان بـازدهی فراینـد در طـی هیدرولیزاسیون آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهـم مـی باشـد (۱۴و۲۰).

مشخص شده است که ارزش غذایی یک پروتئین بستگی زیـادی به میزان، تنوع و ترکیب اسیدهای آمینه آن پـروتئین دارد. روش‌هـای مختلفی برای تعیین ارزش غذایی پروتئین‌ها وجـود دارد. کـه یکـی از روش‌های متداول، روش‌هـای زیسـتی و آزمایشـگاهی اسـت، ولـی از جمله معایب این روش می توان به وقـت گیـر و پـر هزینـه بـودن آن اشاره نمود (۳۲). آلزمیر و همکاران (۳) روشی را ابداع نمودنـد کـه بـا استفاده از ترکیب اسیدهای آمینه یک پروتئین، می تـوان میـزان نـرخ کارایی پروتئین را پیش بینی نمود. اساس این روش، مبتنی بر کـاربرد معادلاتی می باشد که توسـط لـی و همکـاران (۱۹) تکمیـل گردیـده است. مطالعات محققین حاکی از آن است کـه، ایـن روش یـک روش دقیق و قابل استناد می باشد (۱۰، ۲۵، ۲۹، ۳۰و۳۲).

یکی دیگر از پارامترهای بررسی خواص پروتئین هیـدرولیز شـده، بررسی شاخص شیمیایی می باشد که مبتنی بر ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین است. شاخص شیمیایی با استفاده از مقایسـه بـین اسـیدهای آمینه ضروری پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز انسان (۱۲) و یا یک آبزی (۲۳) محاسبه می گردد (۸، ۲۵و۲۶).

تحقیقات نشان می دهد که خصوصیات پروتئین هیـدرولیز شـده، بستگی زیادی به نوع سوبسترا (ماده خام اولیه)، شرایط هیدرولیز (دمـا، زمان و pH) و نوع آنزیم دارد (۱۶). به طوری که با تغییر نـوع آنـزیم، می توان پروتئین هیدرولیز شده ای بـا خصوصـیات مختلـف از لحـاظ درجه هیدرولیزاسیون، بازیافـت نیتروژنـی و ترکیـب اسـیدهای آمینـه انتظار داشت (۶، ۲۵و۳۲).

تون ماهیان یکی از مهمترین ماهیان صنعتی دنیـا محسـوب مـی شوند که رقم قابـل تـوجهی از کـل صـید سـالانه را کـه در حـدود ۳ میلیون تن می باشد به خود اختصاص داده اند (۱۴). یکی از مهمتـری گونه‌های تون ماهیان، ماهی تـون زرد بالـه (*Thunnus albacares*) می باشد که بر اساس آمار رسمی سازمان شیلات ایران، از ۲۰۰ هـزار تن صید تون ماهیان در سال، رقمی معـادل ۴۱ هـزار تـن را بـه خـود اختصاص داده است (۲). این میزان نسبتا بـالای صـید و در کنـار آن، صنایع عمل آوری، می توانـد میـزان زیـادی از ضـایعات را بـه دنبـال داشته باشد.

با توجه به مطالب بیان شده، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر سه آنزیم با منشاء میکروبی (آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم) روی خواص (درجه هیدرولیزاسـیون، بازیافـت نیتروژنـی، نـرخ کـارایی پـروتئین و شاخص شیمیایی) پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تـون زردباله، انجام شده است.

مواد و روش ها

ماده خام اولیه

به منظور هیدورلیز آنزیمی، از امعاء و احشـاء مـاهی تـون زردبالـه استفاده شد. به همین منظور، امعـاء و احشـاء مـاهی تـون زرد بالـه از کارخانه تولید کنسرو ماهی تون (شرکت دریـاخوراک، بابلسـر، ایـران) تهیه گردید و به صورت منجمد به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعـی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور، ایران) انتقال داده شدند. مواد خام اولیه با استفاده از چرخ گوشت صنعتی، کاملا چرخ شـدند. سـپس مقداری از نمونه چرخ شده، به منظور تعیین ترکیب شیمیایی برداشـته شد. بقیه مواد خام چرخ شده، در ظروف یک لیتـری پلاسـتیکی قـرار داده و منجمد شدند.

آنزیم

به منظور هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی تون، از سـه آنـزیم پروتئاز با منشاء میکروبی اسـتفاده شـد. آنـزیم‌هـای مـورد اسـتفاده و خصوصیات آنها در جدول ۱ ارایه شده است.

همه آنزیم‌ها از شرکت نووزایم (دانمارک) تهیه و تا زمان آزمـایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه داری شدند.

جدول ۱ آنزیم‌های مورد استفاده در تحقیق و اطلاعات کاربردی آنها

نوع آنزیم	دمای بهینه فعالیت	pH فعالیت	میزان فعالیت (واحد آنسون به ازای یک میلی لیتر آنزیم)[1]	منشاء
آلکالاز	۷۵ ۵۵	۸/۵ ۶/۵	۲/۴	*Bacillus licheniformis*
پروتامکس	۶۰ ۳۵	۷/۵ ۵/۵	۱/۵	*Bacillus subtilis*
فلاورزایم	۷۰ ۵۰	۷ ۵	۱/۵	*Aspergillus oryzae*

۱ یک واحد آنسون عبارت است از میزان آنزیم مورد نیاز برای آزاد شدن یک میلی اکی والان اسید آمینه تیروزین از سوبسترای هموگلوبین در دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و pH ۷/۵ (۲، ۶)

تولید پروتئین هیدرولیز شده

به منظور تولید پروتئین هیدرولیز شده، ابتدا ۵۰ گرم از نمونه‌های امعاء و احشاء در ارلن مایرهای ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد. سپس میزان ۱۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (۲:۱) که pH آن برای هر آنزیم با استفاده از سود ۰/۲ مولار تنظیم شده بود (آلکالاز: ۸/۵، پروتامکس و فلاورزایم: ۷)، اضافه گردید. به منظور غیر فعال سازی آنزیم‌های داخلی، نمونه ها، برای مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی (W-614-B، فاتر ریزپرداز، تهران، ایران) در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۴، ۲۸ ۲۴). بعد از خنک شدن نمونه ها، ظروف حاوی نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور متحرک (Ivymen system، اسپانیا) در دمای ۵۵ درجه سانتی گراد با دور ثابت ۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شدند. همه آنزیم‌ها بر اساس فعالیت آنزیمی به میزان پروتئین موجود در نمونه‌ها اضافه شدند (۳۰ واحد آنسون به ازای یک کیلوگرم). بعد از هر نمونه گیری و نیز در پایان واکنش (۹۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها برای مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۴، ۲۸ ۲۴). نمونه‌ها بعد از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق، با استفاده از سانتریفوژ Hermle labrotechnik GmbH z-206A (آلمان) در دمای ۱۰ درجه سانتی گراد، برای مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۸۰۰۰، سانتریفوژ شدند و سوپرناتنت جمع آوری و با استفاده از دستگاه اسپری درایر، خشک گردید. تولید پروتئین هیدرولیز شده برای هر آنزیم، در سه تکرار انجام شد.

تعیین ترکیب شیمیایی

برای تعیین میزان رطوبت، چربی، پروتئین و خاکستر، از روش استاندارد (۵) استفاده گردید. میزان پروتئین محلول در سوپرناتنت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بیورت (۱۸) انجام گرفت. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی وقرائت در طول موج ۵۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر مدل Jenway 6305 (انگلستان) استفاده شد.

درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیزاسیون یکی از پارامترهای تعیین میزان باندهای شکسته شده می باشد. برای تعیین درجه هیدرولیزاسیون، از روش هویل و مریت (۱۵) استفاده شد:

درجه هیدرولیزاسیون =(میزان نیتروژن در محلول ۱۰درصد اسید تری کلریدریک /میزان نیتروژن در نمونه) ×۱۰۰

بازیافت نیتروژنی

درتحقیق حاضر میزان بازیافت نیتروژنی بر اساس معادله زیر بدست آمد (۲۰):

بازیافت نیتروژن=(A ×B/C × D) × ۱۰۰

A: میزان نیتروژن در پروتئین هیدرولیز شده

B: مقدار پروتئین هیدرولیز شده (گرم)

C: میزان نیتروژن در امعاء و احشاء ماهی تون

D: میزان امعاء و احشاء هیدرولیز شده (۵۰ گرم)

ترکیب اسیدهای آمینه

به منظور تعیین ترکیب اسیدهای آمینه، ابتدا نمونه‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد با استفاده از اسید هیدروکلریدریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شدند. سپس با استفاده از ماده او فتال دی آلدهید[1] عمل مشتق سازی اسیدهای آمینه انجام شد (۴). میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا[2] مدل کنوئر[3] (آلمان) با استفاده از ستون اسفریکال[4] با آشکار ساز فلورسنت (RF-530) انجام شد.

میزان کارایی پروتئین

محاسبه نرخ کارایی پروتئین با استفاده از قرار دادن میزان اسیدهای آمینه ضروری در معادلات، انجام شد (۳و۱۹). معادلات در جدول ۵ ارایه شده است.

1-O-Phthaldialdehyde
2-PLC
3-Knauer
4-Spherical

محاسبه شاخص شیمیایی

شاخص شیمیایی یکی از پارامترهای مهم در تعیین ارزش غذایی پروتئین‌ها می باشد که بر اساس میزان اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز انسان (۱۲) و آبزیان (۲۳) به اسیدهای آمینه بر اساس معادله زیر محاسبه می شود.

میزان اسیدآمینه در پروتئین استاندارد /میزان اسیدهای آمینه در پروتئین مورد آزمایش = شاخص شیمیایی

تجزیه و تحلیل آماری

به منظور مقایسه خصوصیات پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های مورد آزمایش، از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد. نرم افزار آماری SPSS (Release 12.0) برای آنالیز آماری و Excel برای رسم شکل استفاده شدند.

نتایج و بحث

ترکیب شیمیایی

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم در جدول ۲ ارایه شده است.

نتایج مربوط به ترکیب شیمیایی نشان می دهد که میزان پروتئین در هر سه پروتئین هیدرولیز شده، مقدار بالایی است که به ترتیب برای آنزیم آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم، ۷۲/۳۴، ۶۷/۳۶ و ۶۳/۶۸ درصد می باشد. نتایج سایر محققین نیز حاکی از میزان بالای پروتئین در پروتئین‌های هیدرولیز شده می باشد که نتایج تحقیق حاضر را تایید می کند (۸، ۱۰، ۱۶، ۱۷، ۲۶ ۲۴). اویسی پور و همکاران (۲۴) طی تحقیقی نشان دادند که میزان پروتئین در پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی با استفاده از آنزیم آلکالاز، در حدود ۶۶ درصد می باشد.

میزان چربی در ماده خام اولیه در حدود ۵ درصد بود. بعد از انجام عمل هیدرولیز، میزان چربی در سه پروتئین هیدرولیز شده به شدت کاهش پیدا نمود. دلیل این کاهش، می تواند به دلیل شکسته شدن باندهای پپتیدی و سانتریفوژ نمونه‌ها باشد که باعث می شود در طی سانتریفوژ با دور بالا، چربی به پروتئین‌های نامحلول متصل شده و همراه آنها رسوب کند. همچنین بخش اعظمی از چربی به صورت یک لایه مجزا، بعد از سانتریفوژ روی سوپرناتنت دیده می شود که به راحتی قابل برداشت بوده و از ارزش غذایی بالایی نیز برخوردار می باشد (۱۶و۳۲).

نتایج نشان داد که میزان چربی در تحقیق حاضر کاهش پیدا نمود، به طوری که میزان آن در سه پروتئین هیدرولیز شده تقریبا ۱/۵ درصد بود. این درحالی است که پروتئین‌های هیدرولیز شده به عنوان فرآورده‌های کم چرب شناخته شده اند. بعلاوه نتایج محققین دیگر حاکی از آن است که میزان چربی در پروتئین هیدرولیز شده معمولا کمتر از ۱ درصد می باشد (۱۷). علت این تفاوت را می توان در نحوه تولید پروتئین هیدرولیز شده دانست. اشلیژت و همکاران (۳۲) گزارش نمودند که زمانیکه در فرایند تولید پروتئین هیدرولیز شده از حرارت برای غیر فعال سازی آنزیم‌های داخلی استفاده شود، امولسیون‌های پایداری از چربی و پروتئین شکل می گیرد که منجر به افزایش میزان چربی در فرآورده نهایی می شود.

میزان خاکستر در نمونه‌های هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه افزایش یافت. علت این امر، افزایش میزان ماده خشک و نیز کاربرد بافر فسفات برای ثابت نگه داشتن pH در طی واکنش می باشد.

مقایسه میزان پروتئین بین پروتئین‌های هیدرولیز شده حاکی از آن است که بین آنها اختلاف معنی دار کاملا مشهود می باشد ($P<0/05$). به طوری که بیشترین میزان پروتئین مربوط به آنزیم آلکالاز (۷۲/۳۴ درصد) و کمترین آن مربوط به آنزیم فلاورزایم (۶۳/۶۸ درصد) می باشد. این درحالی است که هیچ اختلاف معنی داری از لحاظ میزان چربی، رطوبت و خاکستر بین پروتئین‌های هیدرولیز شده دیده نمی شود ($P>0/05$). نتایج این تحقیق نشان می دهد که آنزیم آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر از فعالیت بیشتری برخوردار بوده و فرآورده تولید شده با این آنزیم دارای محتوای پروتئینی بیشتری است. نتایج سایر محققین نیز، نتایج حاضر را تایید می کند(۶و۲۵). اویسی پور وهمکاران (۲۵) اثر پنج آنزیم پروتئاز را روی خواص پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی مورد بررسی قرار دادند. آنها گزارش نمودند که بیشترین میزان پروتئین مربوط به فرآورده تولید شده توسط آلکالاز می باشد و به ترتیب آنزیم‌های پروتامکس و فلاورزایم در مرتبه بعدی بودند.

نتایج بازیافت نیتروژنی نشان می دهد که میزان بازیافت نیتروژن توسط آنزیم آلکالاز به صورت معنی داری بیشتر از دو آنزیم دیگر است ($P<0/05$). کمترین میزان بازیافت نیتروژنی مربوط به آنزیم فلاورزایم می باشد. نتایج سایر محققین نیز مشابه نتایج تحقیق حاضرمی باشد (۶و۲۵). اویسی پور و همکاران (۲۵) طی تحقیقی روی هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی اعلام نمودند که بیشترین میزان بازیافت نیتروژنی مربوط به آنزیم آلکالاز می باشد. علت این نتیجه را نیز می توان در قدرت و میزان فعالیت پروتئولتیکی بالاتر آنزیم آلکالاز نسبت به سایر آنزیم‌ها دانست.

درجه هیدرولیزاسیون

نتایج مربوط به درجه هیدرولیزاسیون در شکل ۱ ارایه شده است. نتایج نشان می دهد که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، درجه هیدرولیزاسیون افزایش پیدا می کند. این درحالی است که از شدت و نرخ هیدرولیز کاسته می شود. به طوری که بیشترین میزان هیدرولیزاسیون در ۶۰ دقیقه اول رخ داده است.

این حالت در سه آنزیم مشابه می باشد. این نتایج مشابه نتایج سایر محققین بوده و توسط آنها تایید می شود (۱۰، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۴و۲۵). علت این حالت را می توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می کند، همچنین، از میزان فعالیت پروتئولتیکی آنزیم کاسته می شود. از طرف دیگر، شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می تواند در این امر دخیل باشد (۱۴، ۲۴و۲۵).

مقایسه بین درجه هیدرولیزاسیون آنزیم‌های مختلف در پایان واکنش (شکل ۱) نشان می دهد که درجه هیدرولیزاسیون توسط آنزیم آلکالاز به صورت معنی داری از دو آنزیم دیگر بالاتر می باشد ($P<0/05$). نتایج سایر محققین، نتایج تحقیق حاضر را تایید می کند (۶، ۱۷و۲۵). دلیل این حالت را می توان در میزان فعالیت بیشتر آنزیم آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر دانست.

ترکیب اسیدهای آمینه

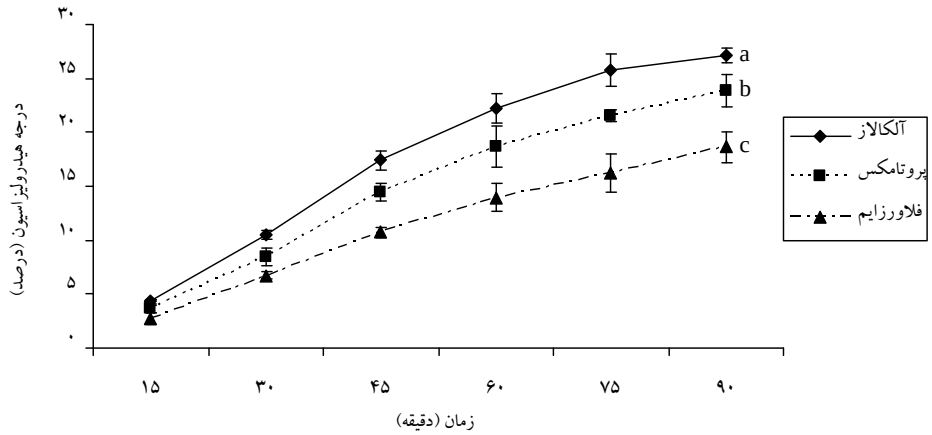
نتایج مربوط به ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف در جدول ۳ ارایه شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله دارای ارزش غذایی بالایی است. به طوری که نسبت میزان اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه در پروتئین‌های هیدرولیز شده به ترتیب برای آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم عبارت است از ۵۵/۴، ۵۵/۳ و ۵۴/۳ درصد. همچنین نسبت اسیدهای آمینه ضروری به اسیدهای آمینه غیر ضروری برای آنزیم‌های مذکور به ترتیب ۱/۴۷، ۱/۴۸ و ۱/۳۷ می باشد. بر اساس اطلاعات سازمانهای خواروبارجهانی و بهداشت جهانی (۱۲) برای انسان، نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه نباید کمتر از ۴۰ درصد، و نسبت اسیدهای آمینه ضروری به غیر ضروری کمتر از ۰/۶ باشد. همانطوری که مشخص است، هر دو شاخص مذکور در تحقیق حاضر برای همه آنزیم‌ها در وضعیت مناسبی قرار دارد.

جدول ۲ ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف [۱،۲]

ماده	پروتئین (٪)	چربی (٪)	رطوبت (٪)	خاکستر (٪)	بازیافت نیتروژنی (٪)
ماده خام	۲۱/۵ ± ۰/۵	۵/۰۸ ± ۱/۵۳	۶۹/۶۶ ± ۲/۳۲	۴/۴۶ ± ۱/۲۱	–
آلکالاز	۷۲/۳۴ ± ۳/۲^{a}	۱/۴۳ ± ۰/۵۷^{a}	۲/۸۲ ± ۲/۷۴^{a}	۲۲/۳۴ ± ۱/۳۸^{a}	۸۰/۶۷ ± ۲/۸۴^{a}
پروتامکس	۶۷/۳۶ ± ۲/۲^{b}	۱/۷۶ ± ۰/۶۳^{a}	۳/۳۲ ± ۳/۴۷^{a}	۲۴/۸۷ ± ۱/۱۲^{a}	۷۴/۹۱ ± ۱/۷۱^{b}
فلاورزایم	۶۳/۶۸ ± ۱/۵۶^{c}	۱/۶۱ ± ۰/۳۷^{a}	۳/۷۶ ± ۲/۳۵^{a}	۲۴/۵۶ ± ۲/۴۲^{a}	۶۲/۴۳ ± ۳/۱۶^{c}

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

۲. اعداد در یک ستون با حروف متفاوت دارای اختلاف معنی دار هستند.



شکل ۱ روند درجه هیدرولیزاسیون پروتئین‌های امعاء و احشاء ماهی تون زردباله با استفاده از آنزیم‌های پروتئاز تجاری

جدول ۳ ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده توسط آنزیم‌های مختلف

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	پروتامکس	فلاورزایم
هیستیدین [۱]	۸/۴۵	۸/۲	۸/۳۳
ایزولوسین [۱]	۶/۹۳	۶/۴۸	۵/۵۷
لوسین [۱]	۷/۷۰	۷/۱۲	۶/۶۲
لایزین [۱]	۱/۸۷	۱/۷۳	۱/۲۸
متیونین [۱]	۱/۴۸	۱/۵۳	۱/۴۴
فنیل آلانین [۱]	۳/۸۵	۳/۵۶	۳/۳۶
تیروزین	۱/۳۱	۱/۲۳	۱/۴۲
ترئونین [۱]	۵/۹۰	۴/۸۱	۵/۱۴
آرژنین [۱]	۸/۸۱	۸/۶۷	۷/۱
والین [۱]	۸/۹۳	۷/۵۳	۷/۳۶
آسپارتیک اسید [۲]	۱۱/۸۳	۱۰/۳۱	۱۱/۱۷
گلایسین [۲]	۵/۸۷	۵/۴۷	۵/۵۲
آلانین [۲]	۲/۲۳	۱/۶۶	۰/۸۴
سرین	۶/۸۱	۶/۵۷	۵/۵۳
گلوتامیک اسید [۲]	۱۵/۳۱	۱۴/۷۶	۱۴/۳۸
میزان اسیدهای آمینه کل	۹۷/۲۸	۸۹/۶۳	۸۵/۰۶
میزان کل اسیدهای آمینه ضروری	۵۳/۹۲	۴۹/۶۳	۴۶/۲
میزان کل اسیدهای آمینه طعم زا	۳۵/۲۴	۳۲/۲	۳۱/۹۱
نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه	۰/۵۵۴	۰/۵۵۳	۰/۵۴۳
نسبت اسیدهای آمینه طعم زا به کل اسیدهای آمینه	۰/۳۶	۰/۳۵	۰/۳۷
نسبت اسیدهای آمینه ضروری به انواع غیر ضروری	۱/۴۷	۱/۴۸	۱/۳۷

۱- اسیدهای آمینه ضروری

۲- اسیدهای آمینه ایجاد کننده طعم

از طرف دیگر میزان اسیدهای آمینه طعم زا (آسپارتیک اسید، گلایسن، آلانین، گلوتامیک اسید) در پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف بالا بود. به طوری که نسبت آنها به کل اسیدهای آمینه در پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف به ترتیب برای آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم عبارت بود از ۳۶، ۳۵ و ۳۷ درصد.

از طرف دیگر، میزان اسیدآمینه آرژنین، در پروتئین‌های هیدرولیز شده، قابل توجه است. اسیدآمینه آرژنین، یک اسیدآمینه مهم در ترکیب پروتئین می باشد، به طوری که نقش مهمی را در سنتز پروتئین ها، کاهش سمیت مواد، تبادلات انرژی (۹) و کاهش بیماری‌های قلبی عروقی دارد (۲۲). نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است (۹). کائو و همکاران (۹) گزارش نمود که اسیدهای آمینه پروتئین هیدرولیز شده میگو از لحاظ طعم و میزان اسیدهای آمینه ضروری، در وضعیت مناسبی برخوردار است.

شاخص شیمیایی

شاخص شیمیایی یکی دیگر از پارامترهای بررسی ارزش غذایی یک پروتئین می باشد که بر اساس ترکیب اسیدهای آمینه تعیین می شود. نتایج مربوط به شاخص شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده در جدول ۴ ارایه شده است. همانطوری که مشخص است، همه پروتئین‌های هیدرولیز شده تحقیق حاضر می توانند نیازهای یک انسان بالغ را برآورده کنند. نتایج مشابهی در مورد پروتئین هیدرولیز شده سایر ماهیان گزارش شده است (۸، ۲۴و۲۶). اویسی پور و همکاران (۲۴و۲۶) گزارش نمودند که پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی و فیل ماهی، نیازهای یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه برآورده می کنند. این درحالی است که مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های تحقیق حاضر با نیازهای ماهی کپور معمولی نشان می دهد که اسیدهای آمینه لایزین، متیونین و فنیل آلانین اسیدهای آمینه محدود کننده محسوب می شوند. اویسی پور و همکاران (۲۴و۲۶) اعلام نمودند که مهمترین اسیدآمینه محدودکننده

در پروتئین هیدرولیز شده امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی و فیل ماهی، اسیدآمینه فنیل آلانین می باشد.

علی رغم کاهش برخی از اسیدهای آمینه در پروتئین هیدرولیز شده نسبت به ماده خام اولیه، باید اذعان نمود که پروتئین هیدرولیز شده دارای ارزش غذایی بالایی بوده و به دلیل سرعت جذب بالا در دستگاه گوارش، بسیار مورد توجه می باشد (۳۲).

نرخ کارایی پروتئین

نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین در جدول ۵ ارایه شده است. این نتایج نشان می دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف دارای نرخ کارایی پروتئین مناسبی هستند. میزان نرخ کارایی پروتئین به ترتیب برای آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم، ۵/۳۸ ،۲/۸۵، ۴/۹۷ ،۲/۵۳ و ۴/۳۹ ،۲/۳۷ می باشد. میزان نرخ کارایی پروتئین برای پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد، ۳/۲۴ ،۲/۸۶ و برای ماهی کاپلین ۳/۱۱ ،۲/۶۱ گزارش شده است (۲۹و۳۰). دینیز و مارتین (۱۰)نیز نرخ کارایی پروتئین را برای پروتئین‌های هیدرولیز شده کوسه ۳/۱۴ ،۲/۹ ارایه نمودند. همچنین اویسی پور و همکاران (۲۴) نرخ کارایی پروتئین را برای پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء تاسماهی ایرانی ۶/۴۵ ،۲/۴ گزارش نمودند.

نتیجه گیری

در تحقیق حاضر اثر سه آنزیم تجاری پروتئاز روی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که از میان آنزیم‌های مورد بررسی، آنزیم آلکالاز می تواند پروتئین هیدرولیزی با درجه هیدرولیزاسیون، محتوای پروتئینی و بازیافت نیتروژنی بالاتری تولید کند. همچنین مشخص شد که ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای شباهت زیادی هستند و می توانند نیازهای یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه رفع کنند، درحالی که نسبت به نیاز ماهی کپور معمولی به اسیدهای آمینه، دارای محدودیت هایی هستند.

جدول ٤ شاخص شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله

اسید آمینه	پروتئین مرجع ۱	آلکالاز	پروتامکس	فلاورزایم	پروتئین مرجع ۲	آلکالاز	پروتامکس	فلاورزایم
هیستیدین	۱/۶	۵/۲۸	۵/۱۲	۵/۲۰	۲/۱	۴/۰۲	۳/۹۰	۳/۹۶
ایزولوسین	۱/۳	۵/۳۳	۵/۹۸	۵/۲۸	۲/۵	۲/۷۷	۲/۵۹	۲/۲۲
لوسین	۱/۹	۴/۰۵	۳/۷۴	۳/۴۸	۳/۳	۲/۳۳	۲/۱۵	۲/۰۱
لایزین	۱/۶	۱/۱۶	۱/۰۸	۰/۸	۵/۷	۰/۳۲	۰/۳۰	۰/۲۲
متیونین	۱/۷	۰/۸۷	۰/۹	۰/۸۴	۳/۱	۰/۴۷	۰/۴۹	۰/۴۶
فنیل آلانین	_	_	_	_	۶/۵	۰/۵۹	۰/۵۴	۰/۵۱
ترئونین	۰/۹	۶/۵	۵/۳۴	۵/۷۱	۳/۹	۱/۵۱	۱/۲۳	۱/۳۱
آرژنین	_	_	_	_	۱/۳۱	۶/۷	۶/۶۱	۵/۴۱
والین	۱/۳	۶/۸۶	۵/۷۹	۵/۶۶	۳/۶	۲/۴۸	۲/۰۹	۲/۰۴

۱ پروتئین مرجع، بر اساس نیاز انسان به اسیدهای آمینه (۱۲).

۲ پروتئین مرجع، بر اساس نیاز ماهی کپور به اسیدهای آمینه (۲۳).

جدول ۵ نرخ کارایی پروتئین برای پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف

معادلات	نرخ کارایی پروتئین‌های هیدرولیز شده		
	آلکالاز	پروتامکس	فلاورزایم
(تیروزین)۱۰۴/+ (لایزین)۰/۴۵۴+۴۶۸/+	۲/۸۹	۲/۶۳	۲/۳۸
(تیروزین)۹۴۴/+ (هیستیدین) ۰/۲۱۱+ (لوسین) ۰/۷۸۰+(متیونین) ۰/۴۳۵+ ۱/۸۱۶	۵/۳۸	۴/۹۷	۴/۳۹
۰/۱۰۹۴- (A) ۰/۰۸۰۸۴	۲/۸۵	۲/۵۳	۲/۳۷
۰/۱۵۳۹- (B) ۰/۰۶۳۲۰	۳/۳۳	۳/۰۶	۲/۸۵

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

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

به طور کلی تحقیق حاضر نشان می دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده دارای ارزش غذایی بالایی بوده و می توانند به عنوان یک مکمل پروتئینی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین با توجه به وجود صنایع عمل آوری آبزیان در کشور، پتانسل بالایی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده وجود دارد.

قدردانی

تحقیق حاضر، بخشی از رساله دوره دکتری با شماره (ت، ۶۰۳/۱۹۲۸) دانشگاه تربیت مدرس می باشد. نگارندگان برخود لازم میدانند که از دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس به دلیل حمایت‌های مالی و معنوی و همچنین از جناب آقای مهندس رضا صفری در پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، کمال تشکر و قدردانی را داشته باشند.

منابع

۱- اویسی پور م.، قمی م.ر. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۳۰۴ ص.
۲- سازمان شیلات ایران. ۱۳۸۷. آمار صید آبزیان.
3- Alsmeyer R.H., Cunningham A.E., Happich M.L. 1974. Equations predicting PER from amino acid analysis. Food Technology, 28(7):34–40.
4- Antoine F.R., Wei C.I., Littell R.C., Marshall M.R. 1999. HPLC method for analysis of free amino acids in fish using o-Phthaldialdehyde precolumn derivatization. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47:5100–5107.
5- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis (16th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists.
6- Aspmo S.I., Horn S.J., Eijsink V.G.H. 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. Process Biochemistry, 40:1957–66.
7- Benjakul B., Morrissey M.T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45: 3423–3430.
8- Bhaskar N., Benila T., Radha C., Lalitha R.G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. Bioresource Technology, 99 (2):335-343.
9- 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. Food Chemistry, 109, 176–183.
10- Diniz A.M., Martin A.M. 1997. Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. International Journal of Food Science and Nutrition, 48:191–200.
11- FAO. 2006. Food and Agricultural Organisation of the United Nations. Year book of fishery statistics. Rome, 98, 1&2.
12- FAO/WHO. 1990. Energy and protein requirements. Report of joint FAO/ WHO/UNU Expert Consultation Technical Report. FAO/WHO and United Nations University, Geneva, Series No. 724, pp. 116–29.
13- Gildberg A., Batista I., Strøm E. 1989. Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. Biotechnology and Applied Biochemistry, 11, 413–423.
14- Guerard F., Guimas L., Binet A. 2002. Production of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 19–20, 489–498.
15- Hoyle N.T., Merritt J.H. 1994. Quality of fish protein hydrolysate from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59, 76–79.
16- Kristinsson H.G., Rasco B.A. 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 40, 43–81.
17- Kristinsson H.G., Rasco B.A. 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar*) muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:657–666.
18- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods in Enzymology, 3: p. 450. New York: Academic Press.
19- Lee Y.B., Elliot J.G., Rickansrud D.A., Mugberg E.C. 1978. Predicting protein efficiency ratio by the chemical determinations of connective tissue content in meat. Journal of Food Science, 43, 1359–1362.
20- Liaset B., Nortvedt R., Lied E., Espe M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymatic hydrolysis of Atlantic salmon (*Salmo salar*, L.) frames by Protamex™ protease. *Process Biochemistry, 37*, 1263–1269.
21- Mahmoud M.I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrolysates in nutritional products.

Food Technology, 89– 94.
22- Niittynen L., Nurminen M.L., Korpela R., Vapaatalo H. 1999. Role of arginine, taurine and homocysteine in cardiovascular diseases. Annals of Medicine**,** 31, 318–326.
23- NRC. 1993. National Research Council. National Academy of Sciences, Nutrient Requirements of Fish. p. 124. Washington, USA.
24- Ovissipour M., Abedian A.M., Motamedzadegan A., Rasco B., Safari R., Shahiri H. 2009a. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from the Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. Food Chemistry, 115:238–242.
25- Ovissipour M., Safari R., Motamedzadegan A., Shabanpour B. 2009b. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/ s11947-009-0284-x.
26- Ovissipour M., Taghiof M., Motamedzadegan A., Rasco B., Esmaeili Mulla A. 2009c. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeons *Huso huso* using Alcalase. International Aquatic Research, 1:31–38.
27- Ovissipour M., Safari R., Motamedzadegan A., Rasco B., Pourgholam R., Mohagheghi E., Esmaeili Mulla A. 2009d. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna *Thunnus albacares* fisheries by-products as a nitrogen source for bacteria growth media. International Aquatic Research, 1:73–77
28- Safari R., Motamedzadegan A., Ovissipour M., Regenstein J.M., Gildberg A., Rasco B. 2009. Use of hydrolysates from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1107/s11947-009-0225-8.
29- Shahidi F., Han X. Q., Syniwiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). Food Chemistry, 53:285–293.
30- Shahidi F., Naczk M., Pegg R.B., Synowiecki J. 1991. Chemical composition and nutritional value of processing discards of cod (*Gadus murhus*). Food Chemistry, 42:145–151.
31- Simpson B.K., Nayeri G., Yaylayan V., Ashie N.A. 1998. Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. Food Chemistry, 61(1/2):131–138.
32- Šližyte R., Daukšas E., Falch E., Storrø I., Rustad T. 2005. Characteristics of protein fractions generated from cod (*Gadus morhua*) by-products. Process Biochemistry, 40:2021–2033.