نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۸، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۱، ص. ۱۴۹-۱۳۷

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 8, No. 2, Summer 2012, p. 137-149

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

بهاره داورنیا[1*]- علی معتمد زادگان[2] - غلامحسن اسدی[3]- عبدالمحمد عابدیان[4]- محمود رضا اویسی پور [5]

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 [6] با استفاده از طرح فاکتوریل (CCD) مورد مطالعه قرار گرفت. طول زنجیره پپتیدی (PCL)[7] به عنوان سطح پاسخ به شرایط هیدرولیز (فعالیت آنزیمی، دما، زمان) برآورد شد. ضریب رگرسیون R^2=۰/۸۴ 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 ^{0C} ۵۰ 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 ۱۲-۱۰ 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 ۵-۲سال اسید آمینه غالب بود. الگوی الکتروفورتیک نشان می‌دهد، وزن مولکولی پروتئین هیدرولیزشده 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 هیدرولیزشده، ماهی تون زرد باله، نیوتراز، بهینه سازی، RSM

مقدمه

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 منابع خوراکی دریایی مبذول گردد و مطالعات بیشتری در زمینه آبزیان 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 می دهد (رضوی شیرازی، ۱۳۷۳).

از آنجایی که بخش اعظمی از تون ماهیان، طی فرآیند کنسروسازی تبدیل به کنسرو می‌شوند، ضایعات حاصل از این صنعت می‌تواند۵۰ 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، امّا روند کلی صید تن ماهیان از سال ۱۹۵۰ تا ۲۰۰۷ روند افزایشی داشته است (FAO,۲۰۱۰). از

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

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 به‌عنوان 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 می شود (Arnesen and Gildberg, ۲۰۰۷ Bhaskar *et al*,۲۰۰۸ ;Gildberg,۲۰۰۱) ،درحالی‌که 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 طورکلی ویژگی پروتئین هیدرولیز شده، روی خواصی مانند درجه حلالیت، 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 غذای حیوانات، اجزای پپتونی محیط رشد میکروبی یا غنی‌سازی خاک کاربرد دارد(Aspmo *et al* .,۲۰۰۴) و در بیمارانی 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. بنابرین 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).

به‌منظور 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 انجام شده است که شامل استفاده از عضله و پوست ماهی کاپلین (*Malottus villosus*)(Gildberg and Raa.,۱۹۹۳) و (۱۹۹۵ Shahidi *et al*.,) و ماهی هرینگ(Hoyle and *Clupea harengus*) (Merritt,۱۹۹۴) ، پروتئین کوسه (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 (Gboyouri *et al*.,۲۰۰۴) و (Kirstinsson and ۲۰۰۰) Rasco.,، ماهی ساردین کامل و امعاء و احشاء ساردین (Quaglial and ۱۹۸۷،۱۹۹۰) (Souissi *et al*., ۲۰۰۷) orban.,پوست ماهی کپور علف‌خوار(Wasswa *et al*.,۲۰۰۷) و کپور هندی می باشد (Bhaskar *et al*.,۲۰۰۸).

هیدرولیز آنزیمی پروتین‌های ماهی مخلوطی از آمینو اسیدهای آزاد، دی، تری و الیگوپپتید را به‌وجود 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 and Cuadrado ,۱۹۹۳، بنابراین پپتیدهای به‌دست 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 Shahidi و همکاران (۱۹۹۵)، Nilsang و همکاران (۲۰۰۵) و Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) و Ovissipour و همکاران (۲۰۰۹) اشاره کرد. به‌طورکلی 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 ۱۳۸۸به روش رشته نخ طویل صید شده و فوراً به‌صورت یخ زده در دمای $-20^{o}c$ به شمال ایران منتقل شدند و امعاء و احشاء از ماهی منجمد با اره برقی

در کارخانجات کنسرو سازی شهرک صنعتی میرود 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 در pH =۵/۵-۷/۵ و در دمای ۵۵-۴۵°c است نیوتراز L ۰/۸ فعالیت $\frac{Au}{gr}$ ۰/۸ دارد و از شرکت نوو آنزیم خریداری شد و تا زمان مصرف در دمای ۴°c نگهداری شد.

تهیه پروتئین‌های هیدرولیز شده: امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله ابتدا با چرخ گوشت با دور متوسط (سایز صفحه 5mm) 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 ۲۰°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(B- ۶۱۴ W، فاطرریز پرداز، ایران) در دمای ۸۵°c به مدت ۲۰ دقیقه قرار گرفت. هدف از این عمل، غیر فعال نمودن آنزیم‌های داخلی بود (Gaerard *et al*; Ovissipour *et al*.,۲۰۰۹). pH محلول های 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 میکروسمپلر اضافه شد و نمونه‌ها در دستگاه انکوباتور شیکردار (Ivymen system ،Comecta، اسپانیا) با دور ثابت rpm ۲۰۰۰ قرار گرفتند. (همه واکنش‌ها در لوله‌های شیشه‌ای ml ۲۵۰ با میزان سوبسترا 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 آنزیم نیوتراز قرار داده شد (Guerard ovissipour *et al*.,۲۰۰۲) *et* ۲۰۰۹/ *al*,. پروتئین‌های هیدرولیز شده سرد شده و در سانتریفوژ با دور g ۸۰۰۰ در ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفوژ 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 5 دقیقه در فریزر قرار داده می‌شود و سپس با استفاده از دستگاه فریز درایر (Epu-۷۰۱۲، Operon ،کره جنوبی) در دمای ۶۰- درجه سانتی‌گراد تا ۷۰- درجه سانتی‌گراد اقدام به خشک کردن کرده تا به‌صورت پودر درآید (Kristinsson and Rasco,۲۰۰۰).

اندازه‌گیری شیمیایی

محتوای رطوبت ضمن خشک کردن در آون در دمای ۲±۱۰۵ °c تا حصول وزن ثابت اندازه‌گیری شد (AOAC,۲۰۰۲) . میزان خاکستر به‌وسیله سوزاندن نمونه در دمای ۶۰۰ °c تعیین شد (AOAC,۲۰۰۲).

میزان کل پروتئین در مواد خام (N×۶/۲۵) به روش کلدال به‌دست آمد (AOAC,۲۰۰۲) . کل لیپید در نمونه ها به‌وسیله روش سوکسله با حلال تعیین شد (AOAC,۲۰۰۲). میزان پروتئین در سوپرناتانت بعد از سانتریفوژ با روش بیورت اندازه‌گیری شد. سرم آلبومین گاوی به عنوان پروتئین استاندارد بکار برده شد و جذب با اسپکتوفوتومتر5UV/VIS ۶۳۰(، Jenway ،انگلستان) در طول موج ۵۴۰ nm اندازه‌گیری شد (Layne , ۱۹۵۷).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیز

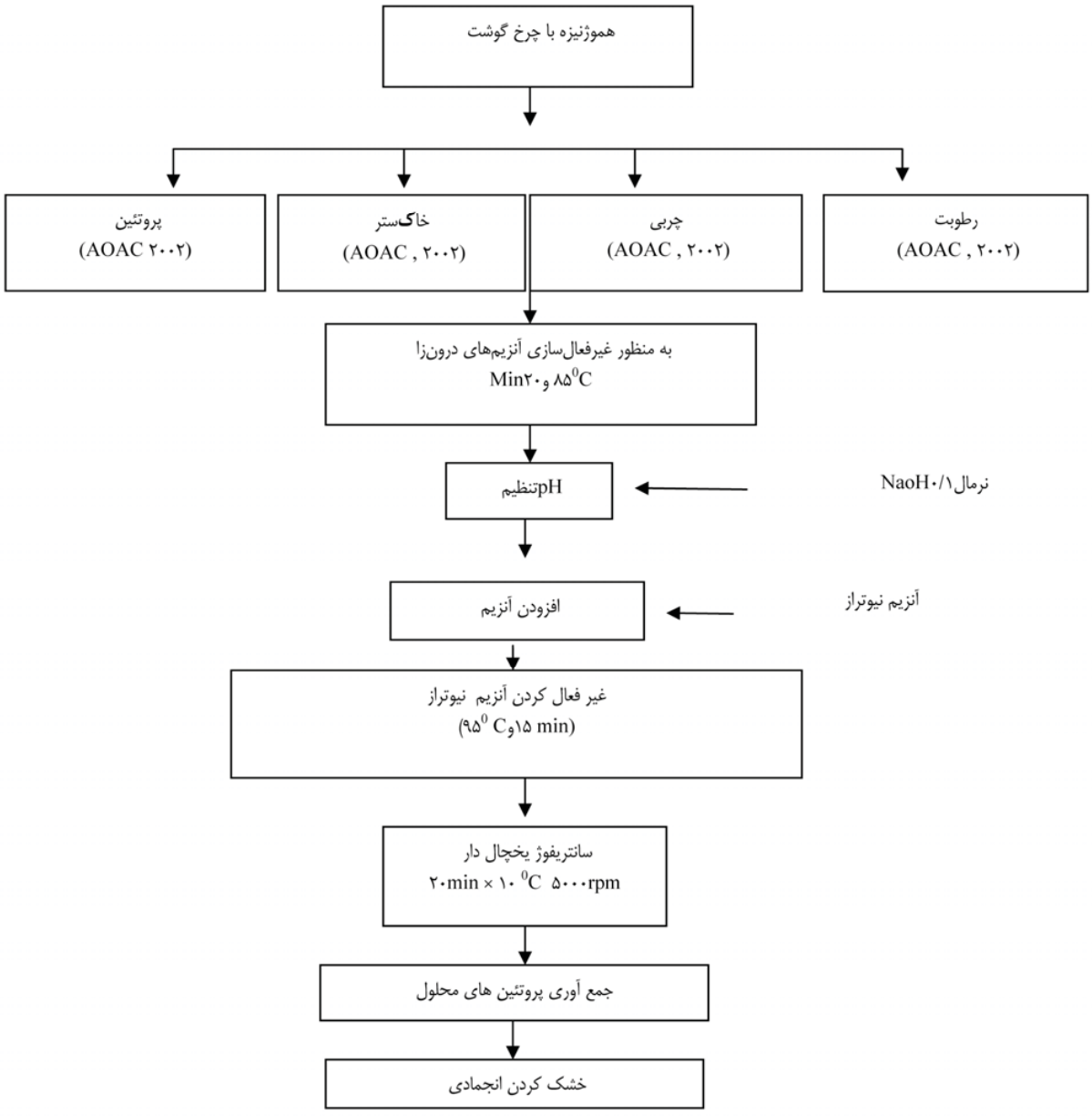
درجه هیدرولیز بر طبق روش (Hoyle and Merit,۱۹۹۴) ، انجام شد، حجم مساوی از محلول پروتئینی جدا شده و محلول تری کلرو استیک اسید ۲۰ درصد اضافه شده و پس از سانتریفوژ (Hermle labortechnic ،GmbH Z ۲۰۶ A، آلمان) در دمای ۲۰°c با دور $6700g$ غلظت پروتئین محلول در تری کلرو استیک اسید۱۰ درصد به روش بیورت تعیین شد. درجه هیدرولیز (DH) طبق فرمول (۱) به‌دست می‌آید.

$$DH\ (\%) = \frac{\text{نیتروژن محلول در نمونه ٪۱۰TCA}}{\text{نیتروژن کل در نمونه}} \times ۱۰۰ \qquad (۱)$$

اندازه‌گیری طول زنجیره پپتیدی

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

$$PCL = \frac{۱۰۰}{\%DH} \qquad (۲)$$



شکل۱-فرآیند آنزیمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده

ترکیب اسید امینه

پودر پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی در آون با دمای ۱۱۰±۱°C به مدت ۲۴ ساعت در معرض ۶ مولار HCl قرارگرفت. مشتق‌سازی با افتال دی آلدهید قبل از آنالیز با HPLC اتفاق افتاد. کل آمینواسیدها به‌وسیله HPLC با ستون نوع C ۱۸ با سرعت جریان $1ml\ min^{-1}$ با آشکار کننده فلورسانس (Germany 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 معادله۳ بیان

می‌گردد.
(۳)

$$\text{شاخص شیمیایی} = \frac{\text{اسید امینه ضروری درپروتئین نمونه } (g^{-1}00g)}{\text{اسید امینه ضروری در پروتئین استاندارد } (g^{-1}00\ g)} \times 100$$

پیش بینی ضریب کارایی پروتئین[1]

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 درجدول ۱ داده شده است.

جدول ۱- معادلات ضریب کارایی پروتئین

شماره معادلات	معادلات[a]
۱	-۰/۴۸۶ +۰/۴۵۴ [Len] -۰/۱۰۴ [Tyr] +۰/۴۳۵ [Met]+۰/۷۸۰ [Leu]+۰/۲۱۱ [His] -۱/۸۱۶
۲	-۰/۹۴۴ [Tyr] ۰/۰۸۰۸۴ [Σ AA $_7$]-۰/۱۰۹۴
۳	۰/۰۶۳۲۰ [Σ AA$_{10}$] -۰/۱۵۳۹
۴	

[a]ΣAA_7=Thy+Val+Met+Ile+Leu+phe+Lys; ΣAA_{10}=ΣAA_7+his

وزن مولکولی

الکتروفورز SDS-PAGE[2] (انگلستان، cleaver) در همه نمونه‌ها با ۴% ژل متراکم کننده[3] 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 ;KDa ۶۶ اووآلبومین جوجه ۴۵ KDa ;گلیسرالدهید -۳- فسفات دهیدروژناز خرگوش;KDa ۳۶ بوین،کربونیک انهیدراز;KDa ۲۹ بوین، ترپسینژن، -PMSF Treated KDa ۲۴; سویا، ممانعت‌کننده تریپسین KDa ۲۰/۱ ; بوین، آلفا لاکتوآلبومی ,KDa ۱۴/۲ وآپروتینین KDa۸) 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.

برای تحلیل داده‌ها و بیان روابط بین متغیرها ازتحلیل رگرسیونی استفاده شد. روش رگرسیون سطح پاسخ (RSREG) با استفاده از نرم‌افزار آماری (SAS ، نسخه9/1) 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_0 (عرض از مبدأ) عدد ثابت، $B_{ii}B_i$ ضرایب مدل رگرسیون و X_j, X_i، پایه‌های متغیرهای مستقل به شکل کدبندی شده هستند.که تاثیر خطی و درجه دوم و متقابل $X_3,X_2 X_1$ را بر پاسخ نشان می‌دهد. این مدل تاثیر هر متغیر مستقل را ارزیابی می‌کند (Cao *et al*.,۲۰۰۸).

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 به‌دست آمده Shahidi و همکاران (۱۹۹۵)، Onodenalore وShahidi (۱۹۹۶)، Kristinsson و Rasco (۲۰۰۰ b)، Nilsang و همکاران، Wasswa و همکاران (۲۰۰۷)، Soussi و همکاران (۲۰۰۷)، Bhaskar و همکاران (۲۰۰۸) و Ovissipaur و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت دارد. میزان لیپید در پروتئین هیدرولیز شده ماهی‌تون زردباله در مطالعه جاری به ۱/۸۶درصد رسید.

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

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

$$Y = B_{\circ} + \sum_{i=1}^{3} B_i X_i + \sum_{i=1}^{3} B_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} B_{ij} X_i X_j \qquad (۳)$$

جدول۲- میزان پایه‌های کدبندی شده بکار برده شده در آزمایش بهینه‌سازی

عامل	پایه‌ها				
	-α	−۱	0	+۱	+α
فعالیت آنزیمی (X_1) (AU /kg protein)	۱۳	۲۰	۳۰	۴۰	۴۷
دما(X_2) (°C)	۳۲	۳۷	۴۵	۵۳	۵۹
زمان(X_3) (min)	۵۰	۷۸	۱۲۰	۱۶۲	۱۹۱

α=۱/۶۸

جدول۳-ترکیبات شیمیایی ماده خام اولیه و پروتئین هیدرولیز شده (درصد)

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

میانگین ± SD(n=۳)

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

پیش فرآوری 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(shahidi *et al*.,; ۱۹۹۵ ; Diniz and Martin ۱۹۹۷Kristinsson and Rasco ۲۰۰۱,b; Nilsang *et al*.,۲۰۰۵, kris). اما از سویی دیگر میزان خاکستر FPH 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 برازش معادله چند جمله‌ای درجه دوم برای داده‌های آزمایشی استفاده شده تمام ضرایب ساده (x_1 ,x_2 ,x_3)، درجه دوم (x_{11},x_{22},x_{33}) و اثرات متقابل آن‌ها (x_{21}, x_{31}, x_{33}) 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 جدول۵ آمده است. به منظور تعیین معادلات مدل سطح پاسخ برازش شده، تمام ضرایب فاقد معنی (P> ۰/۰۵) حذف شدند و ضرایب معنی‌دار براساس معادله چند جمله‌ای (۴) به صورت مدل برازش شده در زیرآورده شده است:

$$y=۲/۹۹-۱/۰۲x_1+۰/۵۴x^2_1+۰/۴۸x^2_3 \qquad (۴)$$

مقادیر مشاهده شده ترکیبات متفاوت متغیرهای مستقل برای طول زنجیره پپتیدی در جدول۴ ارائه شده است. بر طبق جدول۵ 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 برایند کلی اثرات ساده متغیرها در مورد طول زنجیره پپتیدی در سطح اطمینان۹۵ 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). مقدارP به عنوان ابزاری برای بررسی معنی‌دار بودن هر جمله بکار برده شد. کیفیت تناسب مدل به‌وسیلهR^2 تعیین شد. میزان R^2 (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.

جدول٤ – طرح مرکب مرکزی و پاسخ های متغیرهای وابسته به متغیرهای مستقل

مشاهدات	فعالیت آنزیم X_1	دما X_2	زمان X_3	متغیرهای پاسخ 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

جدول۵ –آنالیز واریانس طول زنجیره پپتیدی

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات	میانگین مربعات	F سطح
رگرسیون				
خطی	۳	۱۷/۴۸	۰/۵۵	۹/۷۵**
درجه دوم	۳	۶/۷۲	۰/۲۱	۳/۷۵*
متقابل	۳	۲/۶۸	۰/۰۸	۱/۵۰
کل	۹	۲۶/۹۸	۰/۸۴	۵**
باقیمانده				
عدم برازش	۵	۴/۶۸۷	۰/۹۳۷	—
خطای خالص	۳	۰/۰۹۴	۰/۰۳۱۶	—
خطای کل	۸	۴/۷۸۲	۰/۵۹۷	—
r^2=0/86				
عوامل				
فعالیت آنزیمی(AU/kg protein)	۴	۲۰/۱۹۱	۵/۰۴۷	۸/۴۴**
دما(°C)	۴	۵/۹۸۰	۱/۴۷۲	۲/۴۶
زمان(دقیقه)	۴	۶/۲۶۲	۱/۵۶۵	۲/۶۲

** معنی‌دار در سطح ۱%

معنی‌دار در سطح ۵%

در شکل۲ تاثیرات متقابل دما و نسبت آنزیم به سوبسترا به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. با افزایش مقدار آنزیم، منحنی طول زنجیره پپتیدی با شیب بسیار تندی کاهش می‌یابد و در مقدار

۴۰ $\frac{Au}{kg}$ به حداقل مقدار خود می‌رسد. همان‌طورکه در شکل (۲-الف) مشاهده می‌کنید، دما تاثیر معنی‌داری بر منحنی طول زنجیره پپتیدی ندارد. درکانتور 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 (شکل۲-ب) بازه دمایی ۵۸-۳۳ درجه سانتی‌گراد و مقادیر آنزیمی $\frac{Au}{kg}$ $\frac{Au}{kg}$ ۱۳/۵, ۱۵/۵ $\frac{Au}{kg}$ و ۱۷ $\frac{Au}{kg}$ ۲۰/۵ و $\frac{Au}{kg}$ ۲۳ و $\frac{Au}{kg}$ ۲۷ و ۳۰/۵ $\frac{Au}{kg}$ دو بـــــه دو از نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به ترتیب معادل طول زنجیره پپتیدی ۶/۵، ۶، ۵/۵، ۵، ۴/۵، ۴، ۳/۵ درصد هستند. در شکل ۳ تاثیرات متقابل زمان ونسبت آنزیم به سوبسترا به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. طول زنجیره پپتیدی با افزایش مقدار آنزیمی با شیب تندی کاهش می‌یابد و در مقدار آنزیمی $\frac{\mathrm{Au}}{\mathrm{kg}}$ ۴۰ طول زنجیره پپتیدی به حداقل مقدار خود می رسد. 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 (شکل۳ب) بازه زمانی ۱۸۹-۵۱ دقیقه، دامنه‌های آنزیمی $\frac{Au}{kg}$ ۱۳/۵ -۱۴/۵ و $\frac{Au}{kg}$ ۱۳/۵-۱۷/۲ و $\frac{Au}{kg}$ ۱۸/۶ -۱۴/۴و $\frac{Au}{kg}$ ۱۷/۲-۲۲و $\frac{Au}{kg}$ ۱۸/۶-۲۵و $\frac{Au}{kg}$ ۲۰-۲۸ 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، ۶/۵، ۶، ۵/۵، ۵، ۴، ۴/۵، ۳/۵، ۳ است.

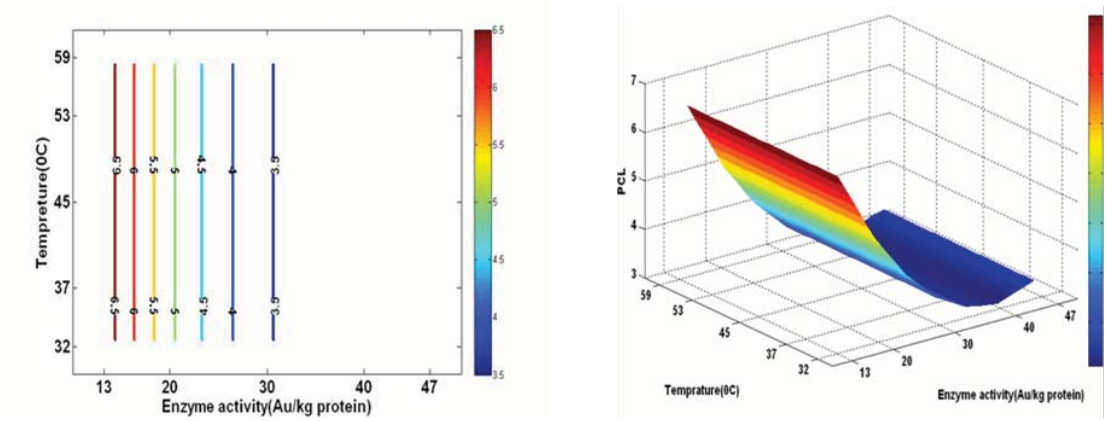
در شکل ۴ تاثیرات متقابل دما و زمان به طول زنجیره پپتیدی نشان داده شده است. با گذشت زمان مقدار و شدت هیدرولیز کم شده و طبیعتاً طول زنجیره کمتر کاهش پیدا می‌کند.

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

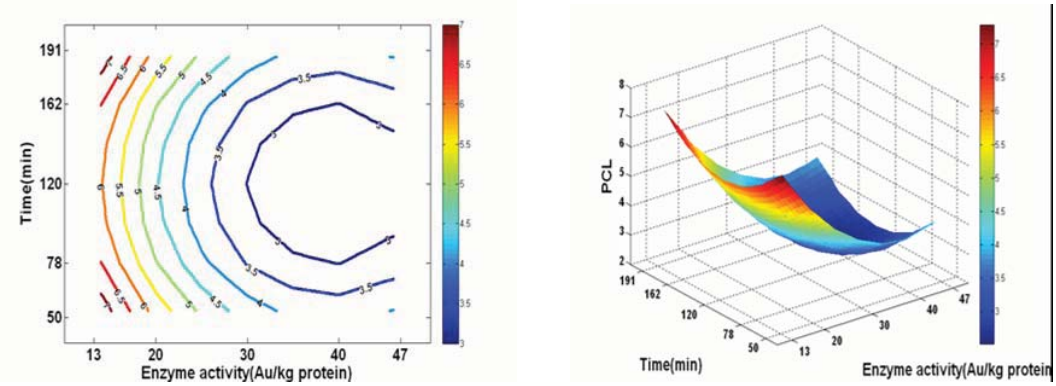
در مقادیر مختلف دمایی با افزایش زمان تا محدوده نقطه بهینه ۱۲۰ دقیقه طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. بر اساس کانتور دو بعدی (شکل۴ب) زمان ۵۵ دقیقه، دامنه دمایی۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۰ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۶۵ دقیقه، دامنه دمای۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۷۰ دقیقه، دامنه دمایی ۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۸۲ دقیقه، دامنه دمایی۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد و زمان ۸۶/۴ دقیقه، دامنه دمایی۵۹-۳۲ درجه سانتی‌گراد دو به دو از نقاط خطوط هم‌تراز می‌باشند که به‌ترتیب معادل طول زنجیره پپتید ۴/۸، ۴/۶، ۴/۴، ۴/۲، ۴، ۳/۸ هستند .

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

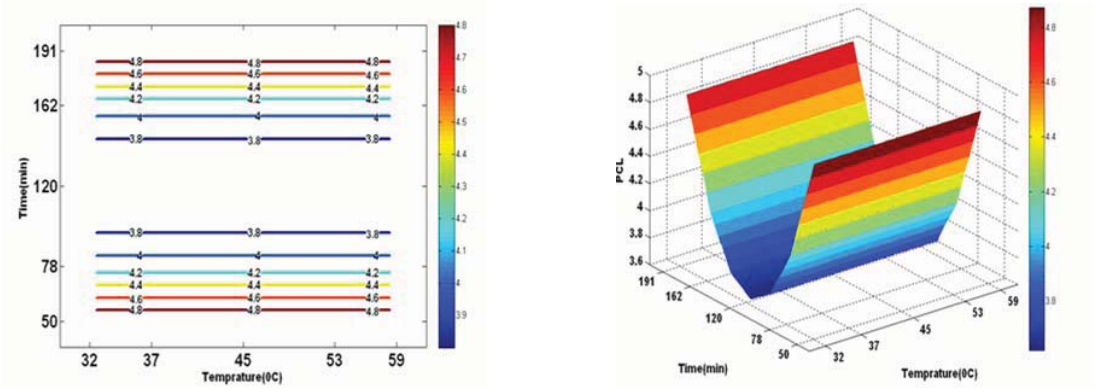
بسته به شرایط پیش فرآوری، طول زنجیره پپتیدی در تحقیق حاضر در محدوده ۶/۵-۳/۵ تغییر می‌کند، که با گزارشات به‌دست آمده از وزن مولکولی کمتر از ۱۰KDaمطابقت دارد که این امر بیانگر کارایی بسیار مناسب تکنیک استفاده شده در این مطالعه در هیدرولیز پروتئین ماهی تون زرد باله می‌باشد. نتایج به‌دست آمده از این پژوهش 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 معمولا 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 معمولا پروتئین‌های ماهیچه توسط آنزیم‌های طبیعی تجزیه شده وضمن کاهش وزن مولکولی گاهی ارزش تغذیه‌ای افزایش می‌یابد (Kurokawa,۱۹۷۹) . بر اساس مدل رگرسیون میزان بهینه طول زنجیره پپتیدی برآورد شد. این میزان در شرایط اپتیمم میزان آنزیمی $\frac{Au}{kg}$ ۳۷ و دمای ^{o}c ۵۰ و زمان ۱۳۰ دقیقه تخمین زده شد. طول زنجیره پپتیدی با افزایش مقدار آنزیمی کاهش می‌یابد و در مقدار آنزیمی ۵۴/۶-۲۷ به حداقل مقدار خود می‌رسد و اگر زمان از رنج خاصی تجاوز کند طول زنجیره پپتیدی افزایش می‌یابد.



شکل۲- سطح پاسخ سه بعدی(الف) وکانتور دوبعدی(ب) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و دما طول زنجیره پپتیدی



شکل۳- سطح پاسخ سه بعدی(الف) وکانتور دوبعدی (ب) اثر زمان ونسبت آنزیم به سوبسترا بر طول زنجیره پپتیدی



شکل ٤ -سطح پاسخ سه بعدی(الف) وکانتور دوبعدی (ب) اثر دما و زمان بر طول زنجیره پپتیدی

به‌نظر می‌رسد در طول فاز اولیه هیدرولیز بخشی از پروتئین‌های اولیه هیدرولیز می‌شود و طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد، اما با گذشت زمان غلظت زیاد این پپتیدها در مخلوط واکنش سرعت هیدرولیز را کاهش و طول زنجیره پپتیدی را افزایش می‌دهد (۱۹۹۵ shahidi *et al.*,). در مقادیر آنزیمی پایین با کاهش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی بیشتر می‌شود که علت آن مربوط به ممانعت آنزیمی است که احتمالاً آنزیم‌ها خودشان را هیدرولیز می‌کنند (Diniz and Martin.,۱۹۹۵).۱۹۹۵

پیش بینی ضریب کارایی پروتئین

افـزایش وزن حیـوان نـسبت بـه پـروتئین مـصرفی آن محاسـبه می‌شود و آن را نسبت پروتئین موثر یا ضریب کـارایی پـروتئین مـوثر می‌نامنـد. مقـدار PER بـه‌دسـت آمـده بـر طبـق جـدول ۶ در رنـج ۳/۸۲-۲/۳۳ گزارش شد که بر طبق جدول میزان PER به‌دست آمده برای ماهی کاد ۳/۲۴–۲/۸۷ و برای کاپلین ۳/۱۱–۲/۶۱ بوده کـه بـه وسیله شهیدی و همکاران در سال ۱۹۹۵–۱۹۹۱گـزارش شـده اسـت. میزان PER برای تاسماهی ایرانی که توسط اویسی پـور و همکـاران در سال ۲۰۰۹ محاسبه شده در دامنه ۶/۴۵–۲/۴ بوده است.

جدول۶ –ضریب کارایی پروتئین ماهی کاپلین، کاد و تن زرد باله

PER		معادلات
کاپلین	کاد	تن زرد باله
۲/۷۲	۲/۸۷	۲/۳۳	۱
۳/۱۱	۳/۲۴	۳/۸۲	۲
۲/۷۹	۲/۹۹	۲/۷۴	۳
۲/۶۴	۲/۹۰	۳/۱۳	۴

ترکیبات اسیدهای آمینه

ترکیب آمینواسیدهای پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی تـون زرد باله بر حسب گرم بر ۱۰۰ گـرم پـروتئین و شـاخص شـیمیایی آن در جدول ۷ ارائه شده است. شاخص شیمیایی ارزش تغذیه‌ای پـروتئین را تخمین می‌زند و همان‌طورکـه گفتـه شـد شـاخص شـیمیایی نـسبت اسیدهای آمینه ضروری در پروتئین مورد آزمایش بر میزان اسـیدهای آمینه ضروری پروتئین استاندارد می‌باشد. این پارامتر میزان اسـیدهای آمینه ضروری پروتئین‌های مورد آزمایش و پـروتین‌هـای اسـتاندارد را مقایسه می‌کند و یک روش قابل قبول برای تعیین ارزش تغذیـه اجـزا اسـت (Sgarbieri , ۱۹۸۷). در مطالعـه جـاری شـاخص شـیمیایی ارزیـابی شـده بـر اسـاس پـروتئین رفـرنس ارائـه شـده توسـط WHO/FAO (۱۹۸۵) برای بچه‌ها در سـنین ۵–۲ و ۱۲–۱۰ سـال پایه‌ریزی شده است.

جدول۷- امینو اسیدهای پروتئین هیدرولیز شده

امنیواسید	کمیت ($g100g^{-1}$)			شاخص شیمیایی	
	پروتئین هیدرولیزشده	پروتئین رفرنس۱[a]	پروتئین رفرنس۲[b]	RP_1	RP_2
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[c]	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	–	–	–	–

RP۱ شاخص شیمیایی محاسبه شده با پروتئین‌های استاندارد FAO/WHO

RP۲ شاخص شیمیایی محاسبه شده با پروتئین‌های استاندارد FAO/WHO

۱– پروفایل پیشنهاد شده امینو اسیدهای ضروری موردنیاز برای بچه‌ها در سن ۵–۲ (FAO/WHO ۱۹۸۵)

۲–پروفایل پیشنهاد شده امینو اسیدهای ضروری موردنیاز برای بچه‌ها در سن۱۲– ۱۰ (FAO/WHO ۱۹۸۵)

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 ماهی تون زرد باله نشان می‌دهد لیزین، متیونین بیشترین اسیدآمینه‌های محدودکننده در مقایسه با نیاز بچه های ۱۲-۱۰سال 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 ۲۰۰۲ tucker,).

وزن مولکولی

الگوی الکتروفورز پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهی‌تون زرد باله نشان داد وزن مولکولی پپتیدهای تشکیل از هیدرولیز کمتر از KDa ۱۰ 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 حدالامکان پایین امینواسیدهای 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 زیر۱۰ کیلودالتون گزارش کردند. وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از ماهی تون زرد باله کمتر از۱۰کیلودالتون است و این مطالعه با نتایج تحقیقاتی که به‌وسیله Ovissipour و همکاران در سال (۲۰۰۹) با استفاده از آنزیم آلکالاز بر روی ماهی خاویاری قره برون انجام گرفت و تحقیقات مشابه که توسط Benjakul و Morrissey درسال Kristinsson ۱۹۹۷, و Rasco در سال ۲۰۰۰ انجام گرفت مطابقت دارد. در مطالعه حاضر، طول زنجیره پپتیدی بین ۶/۵-۳/۵ گزارش شد که با نتایج وزن مولکولی گزارش شده در دیگر مطالعات از این دست، هماهنگی داشت. Bhaskar و همکاران در سال ۲۰۰۸، وزن مولکولی را کمتر از

KDa ۸ 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).

نتیجه‌گیری

اگرچه مدتی است که کارهای پژوهشی بر روی پروتئین‌های ضایعات شیلاتی در سطح دانشگاه‌ها و مراکز پژوهشی ایران انجام می‌شود، ولی تلاش قابل‌توجهی 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. مقادیرآنزیمی، دما و زمان به‌طور معنی‌داری بر روی PCL تاثیر داشتند و مقادیر اپتیمم برای طول زنجیره پپتیدی در مقادیر آنزیمی $\frac{Au}{kg}$ ۳۷ دمایی 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 (kristinsson and Rasco,۲۰۰۰). بنابراین، شرایط اپتیمم هیدرولیز سوبستراهای متفاوت، مختلف خواهد شد و بستگی زیاد به سوبسترای بکار برده شده به‌خصوص میزان و فعالیت پروتئازهای اندوژناز 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 آبزی پروری و به‌عنوان اجزای غذای حیوانات و پپتون منبع نیتروژنی در محیط کشت میکروبی دارد.

منابع

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

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.)Viscara. 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 andMahendrakar, N.S. 2007. Effect of acid ensiling on the stability of visceral wast prorease 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., HΘgΘg,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 caches by Stocks. From 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 untilization.In: Bremner, H. A. (Ed), Safety and Quality Issues in Fish Prossing.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.

Guerard, F., Sumaya-Martines, M.T., Laroque, D., Chabeaud, A., and

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

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, uk.1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the bacterio phage 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 Hydrolysares .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 Syniwiecki 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