

اثر نسبت‌های مختلف آنزیم تریپسین و دماها و زمان‌های اثر آن بر راندمان استخراج پروتئینی امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*)

مریم مدانلو کردکلایی^{۱*} - غلامرضا رفیعی^۲ - علی معتمد زادگان^۳ - سهراب معینی^۴ - علیرضا میرواقفی^۵ - محمود رضا اویسی پور^۶

تاریخ دریافت: ۸۹/۵/۲۴

تاریخ پذیرش: ۹۰/۵/۲۵

چکیده

در مقاله حاضر شرایط بهینه استخراج پروتئین هیدرولیز شده از امعاء و احشاء ماهی تون زردباله بررسی شده است. هیدرولیز آنزیمی با نسبت آنزیم به سوبسترای ۳/۷ - ۱/۳ میلی گرم به ازای هر گرم پروتئین، زمان ۱۰-۱ ساعت و دمای ۳۰-۴۴ °C با استفاده از روش RSM و با کمک طرح آزمایشی CCD با چهار تکرار در نقطه مرکزی و ۵ سطح از هرمتغیر انجام شد. نتایج در سطح آماری $p = 0/05$ مقایسه میانگین شدند. بر اساس نتایج بدست آمده، با افزایش فعالیت آنزیم از ۱/۳ تا ۲/۵ میلی گرم میزان بازیافت پروتئینی افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت آنزیم تا ۳/۳۵ میلی گرم به حالت ثابتی می‌رسد و پس از آن تا ۳/۷ میلی گرم راندمان استخراج پروتئین کم می‌شود. با افزایش دما از ۳۰-۳۷ °C شدت راندمان استخراج پروتئینی زیاد می‌شود و پس از آن تا ۴۲ °C نرخ رشد بازیافت کاهش می‌یابد و پس از ۴۲ °C تقریباً ثابت می‌ماند. با افزایش زمان از ۱ ساعت تا ۲ ساعت و ۱۸ دقیقه راندمان استخراج کم می‌شود. هیدرولیز طولانی‌تر تا ۵ ساعت و ۳۰ دقیقه راندمان بازیافت پروتئینی ثابت ماند و با ادامه هیدرولیز تا ۱۰ ساعت افزایش می‌یابد. در بهترین شرایط راندمان بازیافت پروتئین از ۷۵ درصد تجاوز نمی‌کند. این شرایط در نسبت آنزیمی ۲/۴۱ میلی گرم، دمای ۳۸/۸ °C درجه سانتی‌گراد و زمان ۹ ساعت و ۳۰ دقیقه دیده می‌شود. نتایج نشان داد که درصد بازیافت پروتئینی بیشتر تحت تاثیر نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای اثر آنزیم می‌باشد و زمان تابعی از نسبت آنزیمی و دما است.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیز شده، بازیافت پروتئینی، بهینه‌سازی، ضایعات تون زردباله، تریپسین

مقدمه

برآوردهای اخیر نشان می‌دهد که در حال حاضر ضایعات صنایع شیلاتی جهان بیش از ۲۰ میلیون تن می‌باشد (FAO, 2003). امعاء و احشاء ماهی یکی از مهم‌ترین محصولات جانبی، یک منبع غنی از پروتئین با اسیدهای چرب غیر اشباع هستند که اگر منجمد نشوند یا شرایط نگه‌داری مناسب آنها فراهم نشود، پایداری کمی دارند (Raa & Gildberg, 1982). ضایعات امعاء و احشاء ماهی تون به تنهایی در حدود ۳۰۰ هزار تن برآورد شده است (Machendrakar, 2000). استفاده از فناوری‌هایی که از این ضایعات استفاده بهینه و یا حتی برخی مواد آلی مفید را پیش از رهاسازی بازیافت کنند و نیز منجر به کاهش آلودگی شوند، ضروری به نظر می‌رسد (Baca et al, 1991). با توجه به اینکه در طی دهه گذشته نیاز به تامین منابع جدید پروتئینی در دنیا افزایش یافته، بازیافت پروتئین‌های موجود در این مواد جانبی و کاربرد آنها به عنوان اجزای کاربردی در فرمولاسیون غذایی، روش

بسیاری از محصولات جانبی حاصل از فرآوری ماهی مانند زباله بی‌ارزش، بدون هیچ تلاشی برای بازیافت آن دور ریخته می‌شوند (Kristinson & Rasco, 2000; Ovissipour et al, 2009a).

۱- دانش آموخته، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

*- نویسنده مسئول: (Email: M.Modanlow@gmail.com)

۲ و ۵- استادیار، گروه شیلات و محیط زیست، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه تهران.

۳- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه مازندران.

۴- استاد، گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تهران.

۶- استادیار، گروه شیلات، دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه گرگان.

محیط رشد میکروبی (Gildberg *et al*, 1989; Guerard *et al*, 2001, Safari *et al*, 2009) به کار برده می شود. ماهی تون زرد باله یکی از مهم ترین تون ماهیان در خلیج فارس می باشد که ۳۵ درصد کل صید را به خود اختصاص داده است. ضایعات امعاء واحشاء این ماهی غنی از پروتئین هستند. اگرچه تاکنون گزارشاتی مبنی بر تاثیر هیدرولیز آنزیمی روی پروتئین های امعاء واحشاء ماهی تون زرد باله ارائه شده است (Ovissipour *et al*, 2009a)، ولی در تحقیق حاضر تاثیر آنزیم تریپسین، و دماها و زمان های مختلف اثر آن بر راندمان بازیافت پروتئین امعاء واحشاء ماهی مورد نظر بررسی قرار گرفته است.

مواد و روش ها

آماده سازی ماده اولیه برای هیدرولیز آنزیمی

ماهی تون زردباله از سواحل خلیج فارس صید شد و پس از انجماد در دمای °C (۲۸-) - (۳۰-) به روی عرشه به صورت یخ زده به محل فرآوری (شرکت فرآوری زرین واقع در شهر ساری) منتقل شد. پس از انجمادزایی زیر دوش آب و سر و دم زنی، حفره شکمی تخلیه شد. ضایعات امعاء واحشاء بدون کیسه شنا حاصل از تخلیه حفره شکمی به صورت یخ زده به آزمایشگاه منتقل شد.

مناسب برای ایجاد ارزش افزوده می باشد (Aspmo *et al*, 2005). کاربرد آنزیم های خارجی به منظور هیدرولیز پروتئین های غذایی، فرایند مهمی است که برای بهبود یا اصلاح خواص بیوشیمیایی و عملکردی پروتئین ها بدون هیچ اثر سوئی روی ارزش غذایی و قابلیت جذب آنها استفاده می شود (Mullally *et al*, 1994) آنزیم هایی که برای هیدرولیز پروتئین مورد استفاده قرار می گیرند باید از درجه غذایی برخوردار بوده و اگر منشا میکروبی دارند ارگانسیم تولید کننده آنها غیر بیماریزا باشد (Petersen *et al*, 1981). پروتئین های تجاری متداول برای هیدرولیز پروتئین های ماهی، منشا گیاهی مانند پاپائین (Hoyle & Merritt, 1994; Shahidi *et al*, 1995)، منشا جانوری مانند پپسین (Viera *et al*, 1995)، کیموتریپسین و تریپسین (Simpson *et al*, 1998) و منشا میکروبی مانند آلكالاز (Diniz & Martin, 1997) دارند. تولید پروتئین های هیدرولیز شده باعث افزایش ارزش تغذیه ای به دلیل بالارفتن قابلیت هضم پروتئین ها می شود. همچنین، اثر حساسیت زایی برخی از پروتئین ها از بین می رود (Myers & Montgomery, 2002). پروتئین های هیدرولیز شده به عنوان عناصری در تغذیه آبزی پروری (Viditti *et al*, 2003; Nilseng *et al*, 2005) و به عنوان منبع نیتروژنی تاثیر گذار در

جدول ۱- فاکتورهای مستقل و سطوح مورد استفاده برای بهینه سازی شرایط هیدرولیز با آنزیم تریپسین

سطوح مورد استفاده					تیمارها
-α	-۱	۰	+۱	+α	کد
۳۰	۳۲	۳۷	۴۲	۴۴	دما (درجه سانتی گراد) (X ₁)
۱	۲:۱۸	۵:۳۰	۸:۴۵	۱۰	زمان (ساعت) (X ₂)
۱/۳	۱/۶۵	۲/۵	۳/۳۵	۳/۷	نسبت آنزیم به سوبسترا (میلی گرم / گرم پروتئین) (X ₃)

و سپس به منظور غیرفعال کردن آنزیم های داخلی در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی^۳ قرار گرفت. غیرفعال سازی آنزیم های داخلی به این دلیل انجام شد که شرایط کامل کنترل شده باشد و نتایج به دست آمده حاکی از اثر فقط آنزیم خارجی تحت شرایط تعریف شده باشد. pH مخلوط هموژن شده، براساس pH ایتیمم (pH: ۷) فعالیت آنزیم تریپسین (آنزیم خارجی مورد استفاده برای هیدرولیز) توسط pH متر^۴ و با اضافه کردن NaOH ۰/۲N تنظیم شد. سپس هیدرولیز پروتئینی توسط آنزیم تریپسین با فعالیت ۲۰۰ FIP-(u/g)^۵ (تهیه شده از شرکت Merck) در شرایط

به منظور جلوگیری از فرآیند اتولیز آنزیمی و میکروبی، نمونه ها در ظروف پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد تا شروع آزمایش نگه داری شدند. قبل از فرآیند هیدرولیز آنزیمی، نمونه ها در طول شب در یخچال در دمای ۱±۴ درجه سانتیگراد انجماد زدایی شدند. سپس در چرخ گوشت^۱ کاملاً خرد و مخلوط شده در اندازه های ۵۰ گرمی تقسیم شدند. برای انجام هیدرولیز آنزیمی آزمایش از ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری استفاده شد. در هنگام شروع آزمایش ۵۰ گرم از نمونه که قبلاً توزین و جدا شده بود در ارلن های ۲۵۰ میلی لیتری به نسبت ۱:۲ (W/V) با آب مقطر مخلوط گردید. مخلوط تهیه شده توسط دستگاه هموژنایزر^۲ به مدت ۲ دقیقه، در دمای معین همگن شد

3- Imemmer type:w NB-22,Germany
4- HANNA,Model:211 HI 1131,Romaina
5- Fédération International Pharmaceutique

1- SAYA,Model:promeatw-1800,Tehran.Iran
2 -Wiggen hauser Germany

تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق از طرح آماری (CCD) با چهار تکرار در نقطه مرکزی و پنج سطح از هر متغیر استفاده گردید (جدول ۱). سپس نتایج به کمک نرم افزار آماری SAS به روش سطح پاسخ-RSM^۶ REG تجزیه و تحلیل شده و مدل های به دست آمده به صورت منحنی و به روش (RSM) برازش شدند. سطوح مورد استفاده به فاصله +۱، -۱، +α و -α از نقطه مرکزی قرارداشتند. رسم نمودارها توسط نرم افزار Matlab و Excell انجام گرفت. فاکتور α معادل ۱/۴۱۴ در نظر گرفته شد (Myers & Charles, 1982; Montgomery, 2002). نقطه بهینه بر اساس پارامترهای فوق الذکر از روی منحنی های همتراز بدست آمد. مقایسه میانگین ها به روش دانکن و با سطح معنی داری P=۰/۰۵ و یا P=۰/۰۱ انجام شد.

جدول ۲- طرح آزمایش و سطوح کدبندی شده متغیرهای مستقل و میزان بازیافت پروتئینی

Run	X ₁	X ₂	X ₃	PR
۱	۴۲	۸:۴۵	۳/۳۵	۷۷/۱۳
۲	۴۲	۸:۴۵	۱/۶۵	۷۵/۸۶
۳	۴۲	۲:۱۸	۳/۳۵	۷۱/۴۱
۴	۴۲	۲:۱۸	۱/۶۵	۶۷/۵۲
۵	۳۲	۸:۴۵	۳/۳۵	۶۵/۵۴
۶	۳۲	۸:۴۵	۱/۶۵	۶۰/۳۱
۷	۳۲	۲:۱۸	۳/۳۵	۵۸/۸۷
۸	۳۲	۲:۱۸	۱/۶۵	۵۵/۳۶
۹	۳۷	۱۰	۲/۵	۷۹/۲۴
۱۰	۳۷	۱	۲/۵	۷۳/۷۴
۱۱	۳۷	۵:۳۰	۳/۷	۷۰/۶۸
۱۲	۳۷	۵:۳۰	۱/۳	۵۸/۱۲
۱۳	۴۴	۵:۳۰	۲/۵	۷۲/۱۴
۱۴	۳۰	۵:۳۰	۲/۵	۵۶/۷۳
۱۵	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۶۸/۴۶
۱۶	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۶۸/۵۱
۱۷	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۷۱/۳۶
۱۸	۳۷	۵:۳۰	۲/۵	۷۰/۵۷

X₁: درجه حرارت، X₂: زمان، X₃: نسبت آنزیم به سوپسترا، α: ۱/۴۱۴، PR: بازیافت پروتئینی

نتایج و بحث

مدل سازی اثر آنزیم تریپسین بر بازیافت پروتئینی

مقادیر بازیافت پروتئین در ترکیب های متفاوتی از متغیرهای مستقل در جدول ۲ آورده شده است. جدول آنالیز واریانس اثر ساده متغیرها (جدول ۳) نشان می دهد که هر سه فاکتور مستقل دما، زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا تاثیر مشخص نسبتا بالایی بر روی بازیافت پروتئین دارند (P < ۰/۰۱).

6 -Response surface methodology - Regression

ذکر شده در جدول ۱ انجام گرفت.

آزمایشات بهینه سازی

بهینه سازی شرایط هیدرولیز با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM)، بر پایه طرح مرکب مرکزی (CCD)^۱ انجام شد. فاکتورهای متفاوت و سطوح به کارگرفته شده در جدول ۱ نشان داده شده است. سه فاکتور دما، زمان و نسبت آنزیم به سوپسترا (E/S) در ۵ سطح مساوی (+α و +۱ و ۰ و -۱ و -α) به کارگرفته شدند (جدول ۲). هیدرولیز در دستگاه انکوباتور شیکر^۲ با دور ثابت ۲۰۰rpm انجام شد. در پایان هر فرآیند آنزیمی نمونه های هیدرولیز شده در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد به مدت ۲۰ دقیقه (Guerard et al, 2002) در حمام آبی، به منظور غیرفعال شدن آنزیم تریپسین حرارت داده شدند. اگرچه استفاده از حرارت سبب دناتوراسیون نسبی پروتئین های هیدرولیز شده می گردد ولی هم چنان یک روش متداول برای متوقف کردن فعالیت آنزیم ها ضمن بررسی ویژگی های پروتئین های هیدرولیز شده می باشد. (Ovissipour et al, 2009, Kristinsson & Rasco, 2000). پس از غیرفعال سازی آنزیم خارجی، نمونه ها در دمای اتاق سرد و سپس به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۱۰ درجه سانتیگراد و با دور ۶۷۰g به منظور جمع آوری سوپرناتنت، سانتریفیوژ^۳ شدند. غلظت پروتئین محلول در سوپرناتنت حاصل از سانتریفیوژ به روش بیورت (Layne, 1957) اندازه گیری شد. شدت جذب در طول موج ۵۴۰ نانومتر در دستگاه اسپکتروفتومتر^۴ قرائت شد. برای رسم منحنی استاندارد از پودر سرم آلبومین به عنوان یک پروتئین استاندارد استفاده گردید. ناحیه خطی منحنی های مربوطه به عنوان منحنی استاندارد در اندازه گیری پروتئین نمونه های آزمایش استفاده شد. معادله منحنی استاندارد با R² = 0/9975 به شرح زیر می باشد.

$$Y = 0.041x + 0.035 \quad (۱)$$

اندازه گیری بازیافت پروتئین

برای اندازه گیری راندمان بازیافت پروتئین^۵ از سوپرناتانت حاصل از سانتریفیوژ استفاده شد. نیتروژن کل در بخش محلول و در مواد هیدرولیز شده با استفاده از روش بیورت تعیین و سپس با استفاده از معادله Benjakul & Morrissey (1997) زیر محاسبه شد:

$$PR\% = \frac{۱۰۰ \times \text{مقدار پروتئین موجود در محصول هیدرولیز شده}}{\text{مقدار پروتئین اولیه موجود در نمونه خام}}$$

- 1- Central composite design
- 2- Ivymen system, Comecta, Spain
- 3 - Hermle labortchnik GmbH 206 A, Germany
- 4- 6305, Serial No:1532, Germany JEN WAY
- 5- Protein Recovery

جدول ۳- آنالیز واریانس اثر ساده متغیرها بر میزان بازیافت پروتئینی

مقدار F	میانگین مربعات	مجموع مربعات	درجه آزادی	پارامتر
۲۷/۶۰	۱۳۲/۴۹	۵۲۹/۹۸ ^{**}	۴	درجه حرارت ^o C (X ₁)
۸/۵۳	۴۰/۹۳	۱۶۳/۷۴۱ ^{**}	۴	زمان h (X ₂)
۸/۴۳	۴۰/۴۷	۱۶۱/۹۱ ^{**}	۴	آنزیم / سوبسترا (mg/gr.protein) (X ₃)

** سطح معنی داری ۰/۰۱ P =

جدول ۴- برآورد ضرایب معادله رگرسیونی بازیافت پروتئینی

پارامتر	درجه آزادی	برآورد	خطای استاندارد	مقدار t	برآورد از روی داده های کد بندی شده
Intercept	۱	۷۰/۰۱ ^{**}	۱/۰۳	۶۷/۷۹	۷۰/۰۱
X ₁	۱	۶/۱۳ ^{**}	۰/۶۳	۹/۷۰	۸/۶۷
X ₂	۱	۲/۷۸ ^{**}	۰/۶۳	۴/۴۱	۳/۹۴
X ₃	۱	۲/۶۳ ^{**}	۰/۶۳	۴/۱۷	۳/۷۳
X ₁ X ₁	۱	-۳/۰۷ ^{**}	۰/۷۷	-۳/۹۷	-۶/۱۵
X ₂ X ₁	۱	۰/۳۰ ^{ns}	۰/۷۷	۰/۳۹	۰/۶۰
X ₂ X ₂	۱	۲/۹۵ ^{**}	۰/۷۷	۳/۸۱	۵/۸۹
X ₃ X ₁	۱	-۰/۴۴ ^{ns}	۰/۷۷	-۰/۵۸	-۰/۸۹
X ₃ X ₂	۱	-۰/۱۱ ^{ns}	۰/۷۷	-۰/۱۵	-۰/۲۲
X ₃ X ₃	۱	-۳/۰۹ ^{**}	۰/۷۷	-۴	-۶/۱۹

P= سطح معنی داری ۰/۰۱^{ns}؛ عدم وجود اثر معنی داری

همکاران (۲۰۰۸) روی قره برون با استفاده از آنزیم آلکالاز بازیافت پروتئینی ۶۱/۹۶ درصد بدست آمد. آنها نیز افزایش میزان بازیافت پروتئینی را همراه با افزایش دما تا ۵۵°C و افزایش درجه هیدرولیزاسیون مشاهده کردند.

تغییرات میزان بازیافت پروتئینی با افزایش زمان

با افزایش زمان در نمودارهای اثر همزمان دما و زمان (شکل ۱) و همچنین نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان (شکل ۲) بر روی بازیافت پروتئینی، در زمان های اولیه شروع واکنش تا حدود ۵ ساعت و ۳۰ دقیقه در میزان بازیافت پروتئین تغییر محسوسی مشاهده نمی شود. تغییر در راندمان بازیافت پس از حدود ۶ ساعت شدت می یابد و پس از حدود ۹/۵ ساعت به حداکثر خود می رسد به طوری که بیشترین میزان بازیافت در هیدرولیز های طولانی مشاهده می شود (شکل ۱) و (۳). از روند تغییرات می توان نتیجه گرفت که بازیافت پروتئینی کمتر تحت تاثیر زمان و بیشتر تحت تاثیر نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا و دما است. بازه زمانی انتخابی تابعی از فعالیت آنزیمی و دمای اثر آنزیم می باشد. به دلیل عدم افزایش معنی دار بازیافت پروتئین پس از ۹/۵ ساعت، دسترسی سریعتر به نتیجه مطلوب طی زمان کمتر و صرف

معادله رگرسیونی مربوط به بازیافت پروتئین با توجه به جدول برآورد ضرایب معادله رگرسیونی (جدول ۴) به صورت زیر برآورد شد:

$$Y = 70.01 + 6.13X_1 + 2.78X_2 + 2.63X_3 - 3.08X_1^2 + 2.95X_2^2 - 3.1X_3^2 \quad (2)$$

تغییرات میزان بازیافت پروتئینی با افزایش دما

همانطور که در شکل های اثر همزمان دما و زمان (شکل ۱) و اثر همزمان دما و نسبت آنزیم به سوبسترا (شکل ۳) نشان داده شده است، با افزایش دما از ۳۰°C تا ۳۷°C سرعت هیدرولیز به علت شکسته شدن زنجیره پپتیدی، افزایش می یابد با پیشرفت واکنش تا ۴۲°C، نرخ رشد بازیافت کاهش می یابد تا اینکه در دمای بالاتر از ۴۲°C نمودار بازیافت پروتئینی وارد فاز سکون می شود. از علت های کاهش سرعت هیدرولیز در دماهای بالاتر، می توان به کاهش باندهای پپتیدی دست نخورده و کاهش فعالیت آنزیم در دماهای بالاتر اشاره کرد (Kristinsson & Rasco, 2000). بیشترین بازیافت پروتئینی به میزان ۷۵ درصد در دمای ۴۴°C - ۳/۷۵ مشاهده شده است (شکل الف، ب). نتایج مشابهی در تحقیق اوپسی پور و

درصد بوده که در دامنه فعالیت آنزیمی ۳/۲۶-۲/۴۱ میلی گرم حاصل شده است (شکل ۲، ۳). افزایش غلظت پروتئازها و بنابراین افزایش حجم هیدرولیز بازایافت نیترژن محلول را زیاد می کند (Beddows & Ardeshir, 1979; Rebeca *et al*, 1991; Surowka & Fik, 1992). کاهش میزان بازایافت پروتئین با افزایش فعالیت آنزیم احتمالا به دلیل کاهش باندهای پپتیدی دست نخورده به عنوان بستری مناسب برای فعالیت آنزیم و ممانعت آنزیمی می باشد. در واقع میزان سوپسترا محدود است و تا حدی آنزیم را می پذیرد (Guerard *et al*, 2002). عدم مصرف بیش از حد لازم آنزیم از دیدگاه اقتصادی بسیار حائز اهمیت است. Guerard و همکاران (۲۰۰۲) با استفاده از نسبت های ۰/۱، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۱/۵ درصدی آنزیم Umamizyme، بیشترین بازایافت پروتئینی را در نسبت آنزیمی ۱/۵ درصد گزارش کردند. Aspmo و همکاران (۲۰۰۵) افزایش میزان بازایافت پروتئینی را همراه با افزایش نسبت آنزیمی مشاهده کردند.

تعیین شرایط بهینه برای میزان بازایافت پروتئینی

در جدول ۵ دامنه تغییرات متغیرها به نحوی که میزان بازایافت نیترژن در حداکثر خود قرار می گیرد آورده شده است. فصل مشترک این متغیرها تعیین کننده شرایط بهینه می باشد.

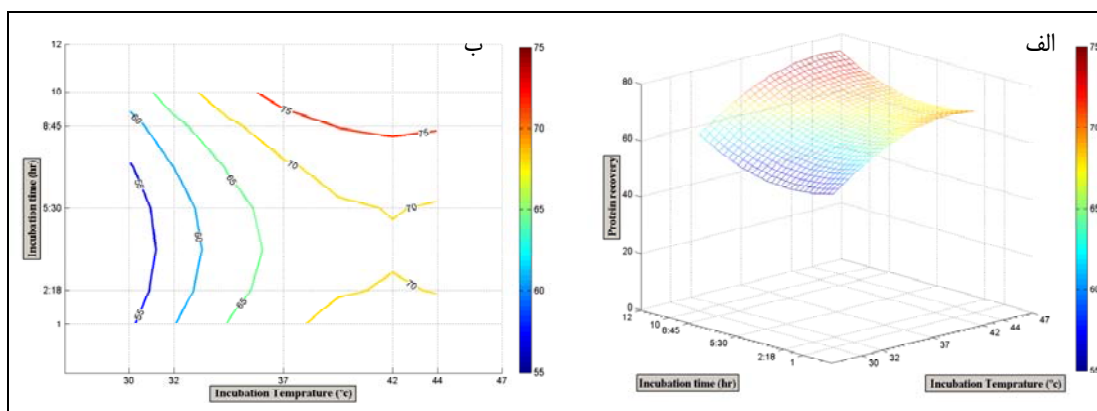
انرژی کمتر، زمان ۹ ساعت و ۳۰ دقیقه به عنوان زمان بهینه برای بازایافت پروتئینی خواهد بود. بازایافت پروتئینی ۷۰ درصدی (Quaglia & Orban, 1990)، بازایافت پروتئینی ۴۷ درصدی (Kristinsson & Rasco, 2000)، بازایافت پروتئینی ۷۱ درصدی (Bhaskar *et al*, 2007)، بازایافت پروتئینی ۶۱/۹۶ درصدی همراه با افزایش زمان هیدرولیز گزارش شده است (Ovissipour *et al*, 2008, Ovissipour *et al*, 2009). راندمان بازایافت پروتئینی در این آزمایش حدود ۷۵ درصد بوده و در مقایسه با سایر پژوهشهای مشابه از بیشترین امتیاز برخوردار است.

تغییرات بازایافت پروتئینی همراه با افزایش نسبت آنزیم به سوپسترا

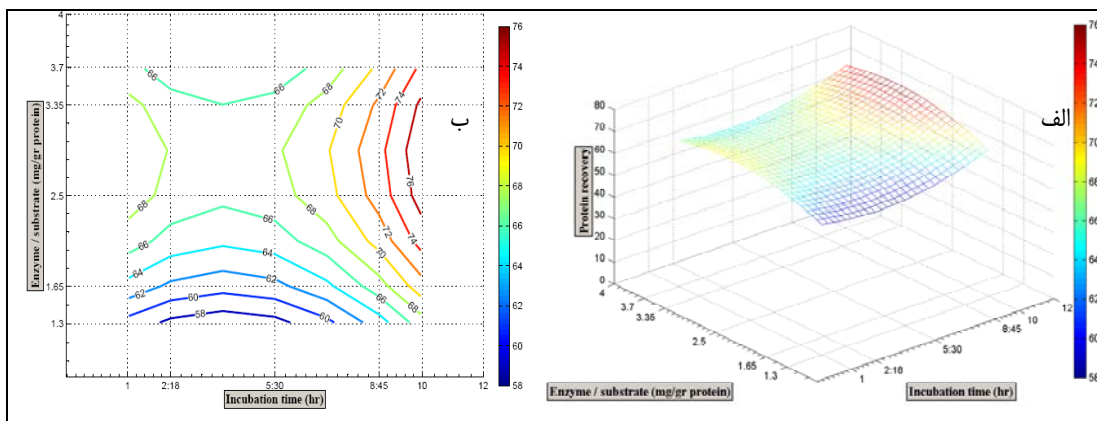
شکلهای اثر همزمان دما و نسبت فعالیت آنزیم به سوپسترا (شکل ۳) و همچنین اثر همزمان نسبت فعالیت آنزیم به سوپسترا و زمان (شکل ۲ و ۳) نشان می دهند که همراه با افزایش فعالیت آنزیم از ۱/۳ تا ۲/۵ میلی گرم، میزان بازایافت پروتئینی با فاز سریع افزایش می یابد (Shahidi *et al*, 1995; Nilseng *et al*, 2005) و در ادامه واکنش با افزایش فعالیت آنزیم تا ۳/۳۵ میلی گرم شکل بازایافت پروتئینی وارد فاز سکون می شود. اما با افزایش بیش از حد فعالیت آنزیم تا ۳/۷ میلی گرم، شاهد کاهش در میزان بازایافت پروتئین خواهیم بود. بالاترین بازایافت پروتئین بدست آمده در این مطالعه در حدود ۷۵

جدول ۵- دامنه متغیرها در شرایط بهینه برای بازایافت پروتئینی

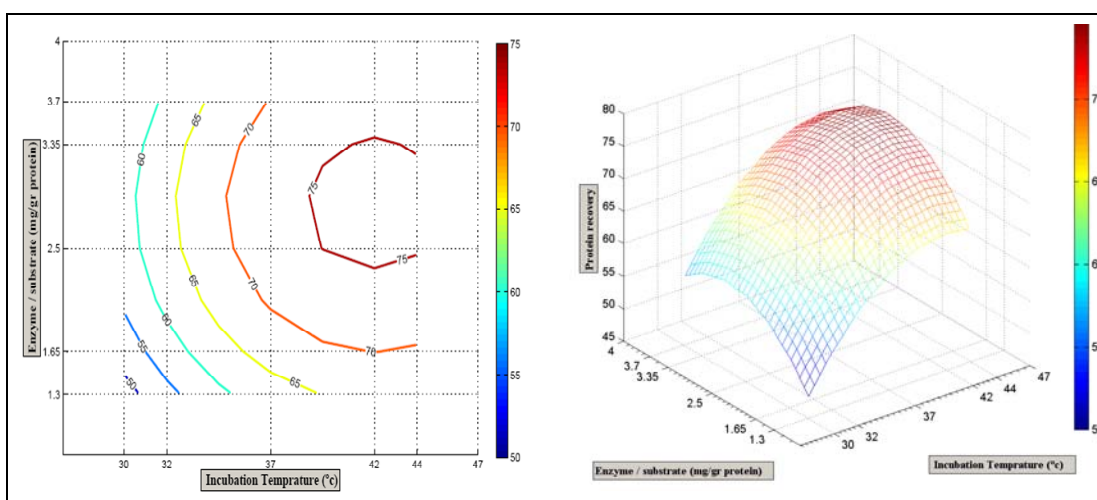
متغیرها	دما (°C)	زمان (h)	نسبت آنزیم به سوپسترا (mg/gr.protein)
دما (°C) و زمان (h)	۳۵/۸-۴۴	۸:۴۲-۱۰	-
دما (°C) و نسبت آنزیم به سوپسترا (mg/gr.protein)	۳۸/۸-۴۴	-	۲/۴۱-۳/۲۶
زمان (h) و نسبت آنزیم به سوپسترا (mg/gr.protein)	-	۹:۳۰-۱۰	۲/۳۳-۳/۴۳



شکل ۱- الف) اثر زمان و دما بر میزان بازایافت پروتئینی. ب) خطوط همتراز اثر دما و زمان بر بازایافت پروتئینی.



شکل ۲- الف) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین. ب) خطوط همتراز اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین.



شکل ۳- الف) اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین. ب) خطوط همتراز اثر نسبت آنزیم به سوبسترا و زمان بر بازیافت پروتئین.

جدول ۶- دامنه و نقطه بهینه برای بازیافت پروتئینی

متغیرها	دما (°C)	زمان (h)	نسبت آنزیم به سوبسترا (mg/gr.protein)
محدوده شرایط بهینه	۳۸/۸-۴۴	۹:۳۰-۱۰	۲/۴۱-۳/۲۶
نقطه بهینه	۳۸/۸	۹:۳۰	۲/۴۱

تریپسین می باشد. با وجود حجم وسیعی از تولیدات جانبی ماهی تلاش بسیار کمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده در ایران صورت گرفته است. به دلیل وجود این مواد خام اولیه و ارزان در کشور پتانسیل مناسبی برای تحقیق و تجاری سازی پروتئین هیدرولیز شده وجود داشته، که نه تنها باعث کاهش آلودگی های زیست محیطی می گردد بلکه تولید فرآورده ای با ارزش افزوده را به دنبال خواهد داشت. در تحقیق حاضر تاثیر زیاد دما و زمان و نسبت فعالیت آنزیم به سوبسترا در زمان هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی تون

با توجه به جدول ۶ محدوده دمایی بهینه ۳۸/۸-۴۴ درجه سانتی گراد و محدوده زمانی بهینه ۹/۵-۱۰ و دامنه فعالیت آنزیمی بهینه ۲/۴۱-۳/۲۶ میلی گرم می باشد. با توجه به اینکه در دماهای پایین تر نیز می توان به نتیجه مطلوب تر دست یافت، به دلیل کاستن سطح انرژی مصرفی دمای ۳۸/۸ درجه سانتی گراد، زمان ۹/۵ ساعت و همچنین به دلیل اینکه فعالیت انجام شده از نظر اقتصادی مقرون به صرفه باشد فعالیت آنزیمی ۲/۴۱ میلی گرم به عنوان نقاط بهینه برای هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی تون با استفاده از آنزیم

آمینو ضروری به کار گرفته شود. نتایج این تحقیق نشان داد که پتانسیل خوبی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با ارزش غذایی بالا به منظور کاربردهای مختلف وجود دارد.

زردباله بر روی راندمان بازیافت پروتئینی به خوبی مشهود بوده است. پروتئین هیدرولیز شده راندمان بالایی از بازیافت پروتئین، حدود ۷۵ درصد، را نشان داده است. پروتئین های هیدرولیز شده امعاء و احشاء تون زرد باله، می تواند به عنوان یک منبع غنی از پپتیدها و اسیدهای

منابع

- Aspmo, S.I., Horn, S.J., Eijsink, V.G.H. (2005). Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) viscera. *Process Biochem.* 40, 1957–1966.
- Baca, D.R., Pena-Vera, M.T., and Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish hydrolysates with bacterial proteases; yield and nutritional value. *J. Food Sci.* 56:309-314.
- Beddows C. G. and Ardeshir, A. G. (1979). The production of soluble fish protein solution for use in fish sauce manufacture, *J. Fd. Technol.*, 14, 603.
- Benjakul, B. and Morrissey, M. T. (1997). Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes, *J. Agric. Food Chem.*, 45, 3424.
- 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(10), 4105.
- Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., Lalitha, R. G. (2007). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, In Press.
- Charles, R.H. (1982). *Fundamental concepts in design of experiment*. 3rd edition. HRW CBS College Pub. New York. Pp:120-320.
- 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.
- FAO, animal feed resources information system. 2003.
- Gildberg, A., Batista, I., & Strom, E. (1989). Preparation and characterization of peptones obtained by a two-step enzymatic hydrolysis of whole fish. *Biotechnology Applied Biochemistry*, 11, 413–423.
- Guerard, F., Duffose, L., De La Broise, D., & Binet, A. (2001). Enzymatic hydrolysis of proteins from yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) wastes using alcalase. *Journa of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 11, 1051–1059.
- 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.
- Hoyle, N. and Merritt, J.H. (1994). Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*), *J. Food Sci.*, 59, 76.
- Kristinsson, H. G. and Rasco, B. A. (2000). Fish Protein Hydrolysates: Production, Biochemical, and Functional Properties. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1):43–81.
- Layne, E. (1957). Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in enzymology* (Vol. 3, pp. 450). New York: Academic press, Ind.
- Mahendrakar, N.S. (2000). Aqua feeds and meat quality of cultured fish. In: John, G., Ninawe, A.S. (Eds.), *Aquaculture – Feed and Health*. Biotech. Consort. India Ltd., New Delhi, pp. 26–30.
- Mullaly, M.M., O’Callaghan, D.M., Fitzgerald, R.J., Donnelly, W.J., Dalton, J.P. (1995). Zymogen activation in pancreatic endoproteolytic preparations and influence on some whey protein characteristics. *J. Food Sci.* 60 (2), 227–233.
- Myers, R.H., and Montgomery, D.C. (2002). *Response surface methodology, Process and product optimization using designed experiments*. 2nd edition. John Wiley & Sons. Pp: 145-202.
- Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A. (2005). Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Engg.* 70, 571–578.
- Ovissipour, M. R., Abedian, A., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Safari, R., & Shahiri, H. (2009a). The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *J. Food Chemistry*, 115, 238-242.
- Ovissipour, M. R., Taghiof, M., Motamedzadegan, A., Rasco, B., Esmaili Molla, A. (2009b). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste proteins of beluga sturgeon *Huso huso* using Alcalase. *Intel Aqu Res*, 2009. In Press.
- Petersen, B. R. (1981) The impact of the enzymatic hydrolysis process on recovery and use of proteins, in *Enzymes and Food Processing*, Elsevier Applied Science Publishers, London, UK, 149–175.
- 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.
- Raa, J. and Gildberg, A (1982)., Fish silage: a review, *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 14, 383.
- Rebeca, B. D., Pena-Vera, M. T., and Diaz-Castaneda, M. (1991). Production of fish protein hydrolysates with bacterial proteases; Yield and nutritional value, *J. Food. Sci.*, 56, 309.
- Safari R, Motamedzadegan A, Ovissipour M, Regenstein JM, Gildberg A, Rasco B. 2009. Use of hydrolysates from Yellowfin tuna (*Thunnus albacares*) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food Bioprocess Technol*, DOI 10.1007/s11947-009-0225-8.
- Shahidi, F., Han, X-Q., and Synowiecki, J. (1995). Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*), *Food Chem.*, 53, 285.
- Simpson, B. K., Nayeri, G., Yaylayan, V., & Ashie, N. A. (1998). Enzymatic hydrolysis of shrimp meat. *Food Chemistry*, 61(1/2), 131–138.
- Surowka, K. and Fik, M. (1992). Studies on the recovery of proteinaceous substances from chicken heads. I. An application of neutrase to the production of protein hydrolysate, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 27, 9,
- Viera, G. H. F., Martin, A. M., Saker-Sampaio, S., Omar, S., and Goncalves, R. C. F.(1995).Studies on the enzymatic hydrolysis of Brazilian lobster (*Panulirus* spp.) processing wastes, *J. Sci. Food Agric.*, 69, 61.
- Vidotti, R.M. Viegas, E.M.M. Carneiro, D.J., Amino acid composition of processed fish silage using different raw materials. *Animal Feed Science and Technology*, 105, 199-204. 2003.

Effect of Different Ratio of Trypsin Enzyme, Times and Temperatures on Protein Recovery of Viscera Yellow Fin Tuna (*Thunus albacores*)

M. Modanlow^{1*} - G.R. Rafiee² - A. Motamedzadegan³ - S. Moeeni⁴ - A. Mirvaghefi⁵ - M. R. Ovissipour⁶

Received: 15-08-2010

Accepted: 16-08-2011

Abstract

In present paper the optimum extraction condition of protein of Hydrolysate from the viscera of yellow fin tuna (*Thunus albacores*) were studied. Enzyme hydrolysis has been performed at enzyme to substrate ratio: 1.3-3.7 mg/gr.protein , time of reaction: 1-10 hours, temperature: 30-44 °C and using RSM method and central composite design(CCD) with 4 repetitions at central point and five levels of each treatment. Results have been compared with average at statistical level where $\alpha = 0.05$. According to results,the protein recovery increases with an increase in enzyme activity from 1.3 to 2.5 mg When enzyme activity increases to 3.35 mg, the protein recovery reaches a constant level and then decreases with an extra increase of enzyme amount to 3.7 mg. The rate of protein recovery increases, With an increase in temperature from 30 °C to 37 °C,And then the enhancement of recovery rate decreases with more increase of temperature from 37°C to 42°C, However it will remain constant for temperatures beyond 42°C.The protein recovery decreases With increasing the hydrolysis time between 60 to 138 min. and it reaches a stationary phase somehow during 138 to 330 min.In optimum point of hydrolysis, protein recovery was 75%. This condition were observed in enzyme ratio of 2.41 mg ,Temperature of 38.75°C,and hydrolysis time of 570 min. Results showed that protein recovery is mainly influenced by ratio of enzyme to substrate rate and temperature ,while time of hydrolysis should be considered as a function of temperature and enzymatic ratio.

Keywords: Protein hydrolysate, Protein recovery, Optimization, Waste of yellow fine tuna, Trypsin

1- Dept. of Fisheries And Environmental Science, Tehran Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.

(* - Corresponding author Email: M.Modanlow@gmail.com)

2&5-Assistant Prof.,Dept.of Fisheries And Environmental Science,Tehran Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.

3- Assistant Prof., Dept. of Food Science, Sari Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.

4- Prof., Dept. of Food science, Tehran Agricultural Science and Natural Resources University ,Iran.

6- Assistant Prof., Dept. of Fisheries, Gorgan Agricultural Science and Natural Resources University,Iran.