



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 آلكالاز، پروتامکس و فلاورزایم تولید شد. نتایج نشان داد که پروتئین هیدرولیز شده توسط آلكالاز به صورت معنی داری از لحاظ میزان پروتئین، بازیافت نیتروژنی و درجه هیدرولیزاسیون بالاتر از سایر پروتئین‌های هیدرولیز شده بود ($P < 0.05$). اما هیچ اختلاف معنی داری از لحاظ میزان چربی، رطوبت و خاکستر بین نمونه‌ها وجود نداشت ($P > 0.05$). ترکیب اسیدهای آمینه نیز نشان داد که پروتئین‌ها هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف دارای ترکیب نسبتاً 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 می‌توانند 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 می‌توان آنزیم آلكالاز را نسبت به دو آنزیم دیگر، ارجح دانست. همچنین با توجه به ارزش غذایی بالای پروتئین هیدرولیز شده، می‌توان کاربرد آن را در جیره غذایی توصیه نمود.

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

مقدمه

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 می‌باشد (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 می‌شوند. از طرف دیگر به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی هستند و می‌توانند 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 (۲۸، ۲۷، ۱۳).

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

بر اساس آمار رسمی سازمان خواروبار جهانی، میزان تولید سالانه آبزیان بالغ بر ۱۳۲ میلیون تن می‌باشد (۱۱). این میزان نسبتاً 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 می‌شود. عمده ترین مواد جانبی صنایع عمل آوری آبزیان شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوان‌های تنه می‌باشد (۷). این ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و چربی بوده که باعث تسریع فساد در آنها می‌گردد (۸). اگر این ترکیبات بیولوژیکی به نحو احسن مورد استفاده قرار بگیرند، از یک سمت باعث کاهش آلودگی زیست محیطی ناشی از دور ریختن

۴ و ۱ دانشجوی دکتری و دانشیار گروه 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

بستگی زیادی به نوع سوبسترا (ماده خام اولیه)، شرایط هیدرولیز (دما، زمان و pH) و نوع آنزیم دارد (۱۶). به طوری که با تغییر نوع آنزیم، می‌توان پروتئین هیدرولیز شده‌ای با خصوصیات مختلف از لحاظ درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت نیتروژنی و ترکیب اسیدهای آمینه انتظار داشت (۶، ۲۵ و ۳۲).

تون ماهیان یکی از مهمترین ماهیان صنعتی دنیا محسوب می‌شوند که رقم قابل توجهی از کل صید سالانه را که در حدود ۳ میلیون تن می‌باشد به خود اختصاص داده اند (۱۴). یکی از مهمترین گونه‌های تون ماهیان، ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) می‌باشد که بر اساس آمار رسمی سازمان شیلات ایران، از ۲۰۰ هزار تن صید تون ماهیان در سال، رقمی معادل ۴۱ هزار تن را به خود اختصاص داده است (۲). این میزان نسبتاً بالای صید و در کنار آن، صنایع عمل‌آوری، می‌تواند میزان زیادی از ضایعات را به دنبال داشته باشد.

با توجه به مطالب بیان شده، تحقیق حاضر با هدف بررسی اثر سه آنزیم با منشأ میکروبی (آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم) روی خواص (درجه هیدرولیزاسیون، بازیافت نیتروژنی، نرخ کارایی پروتئین و شاخص شیمیایی) پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله، انجام شده است.

مواد و روش‌ها

ماده خام اولیه

به منظور هیدرولیز آنزیمی، از امعاء و احشاء ماهی تون زردباله استفاده شد. به همین منظور، امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله از کارخانه تولید کنسرو ماهی تون (شرکت دریاخوراک، بابلسر، ایران) تهیه گردید و به صورت منجمد به آزمایشگاه دانشکده منابع طبیعی و علوم دریایی دانشگاه تربیت مدرس (نور، ایران) انتقال داده شدند. مواد خام اولیه با استفاده از چرخ گوشت صنعتی، کاملاً چرخ شدند. سپس مقداری از نمونه چرخ شده، به منظور تعیین ترکیب شیمیایی برداشته شد. بقیه مواد خام چرخ شده، در ظروف یک لیتری پلاستیکی قرار داده و منجمد شدند.

آنزیم

به منظور هیدرولیز آنزیمی امعاء و احشاء ماهی تون، از سه آنزیم پروتاز با منشأ میکروبی استفاده شد. آنزیم‌های مورد استفاده و خصوصیات آنها در جدول ۱ ارائه شده است. همه آنزیم‌ها از شرکت نووزایم (دانمارک) تهیه و تا زمان آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگه‌داری شدند.

تحقیقات، اثر آنزیم‌های مختلف را مورد بررسی قرار داده اند که از آن جمله می‌توان به آنزیم پاپاین با منشأ گیاهی (۲۹ و ۱۵)، آنزیم تریپسین و کموتریپسین با منشأ جانوری (۳۱ و ۲۵)، آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس، فلاورزایم و نئوتراز با منشأ میکروبی (۶، ۷، ۸، ۴۷ و ۲۴) اشاره نمود. به طور کلی، آنزیم‌های با منشأ میکروبی نسبت به سایر آنزیم‌ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آنجمله می‌توان به پایداری بیشتر در حرارت‌ها و pH‌های بالا و خصوصیات مناسب پروتئولیتیکی اشاره نمود (۱۰).

یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده، درجه هیدرولیزاسیون می‌باشد که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیزاسیون می‌باشد (۳۲). از طرف دیگر، هیدرولیز شدید آنزیمی که باعث از بین رفتن خواص حساسیت‌زای پروتئین‌ها شده و کاربرد آنها را در تغذیه کودکان دچار حساسیت، ممکن می‌سازد، با بررسی درجه هیدرولیزاسیون، تخمین زده می‌شود (۲۱).

بازیافت نیتروژنی یکی دیگر از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان‌کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از انواع غیر محلول، و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیزاسیون آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می‌باشد (۱۴ و ۲۰).

مشخص شده است که ارزش غذایی یک پروتئین بستگی زیادی به میزان، تنوع و ترکیب اسیدهای آمینه آن پروتئین دارد. روش‌های مختلفی برای تعیین ارزش غذایی پروتئین‌ها وجود دارد. که یکی از روش‌های متداول، روش‌های زیستی و آزمایشگاهی است، ولی از جمله معایب این روش می‌توان به وقت‌گیر و پرهزینه بودن آن اشاره نمود (۳۲). آلزمر و همکاران (۳) روشی را ابداع نمودند که با استفاده از ترکیب اسیدهای آمینه یک پروتئین، می‌توان میزان نرخ کارایی پروتئین را پیش‌بینی نمود. اساس این روش، مبتنی بر کاربرد معادلاتی می‌باشد که توسط لی و همکاران (۱۹) تکمیل گردیده است. مطالعات محققین حاکی از آن است که، این روش یک روش دقیق و قابل استناد می‌باشد (۱۰، ۲۵، ۲۹، ۳۰ و ۳۲).

یکی دیگر از پارامترهای بررسی خواص پروتئین هیدرولیز شده، بررسی شاخص شیمیایی می‌باشد که مبتنی بر ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین است. شاخص شیمیایی با استفاده از مقایسه بین اسیدهای آمینه ضروری پروتئین مورد آزمایش و میزان نیاز انسان (۱۲) و یا یک آبری (۲۳) محاسبه می‌گردد (۸، ۲۵ و ۲۶).

تحقیقات نشان می‌دهد که خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده،

جدول ۴ آنزیم‌های مورد استفاده در تحقیق و اطلاعات کاربردی آنها

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

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)

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

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

بازیافت نیتروژنی

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

$$100 \times (A \times B/C \times D) = \text{بازیافت نیتروژن}$$

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^۱ فتال دی آلدهید^۱ عمل مشتق سازی اسیدهای آمینه انجام شد (۴). میزان اسیدهای آمینه کل با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۲ مدل کنوئر^۳ (آلمان) با استفاده از ستون اسفریکال^۴ 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 (۳ و ۱۹). معادلات در جدول ۵ ارائه شده است.

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، نمونه‌ها، برای مدت ۲۰ دقیقه درون حمام آبی (W-614-B، فاطر ریزپرداز، تهران، ایران) در دمای ۸۵ درجه سانتی گراد قرار داده شدند (۱۴، ۴۸، ۲۴). بعد از خنک شدن نمونه‌ها، 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، ۴۸، 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 ۸۰۰۰ g سانتریفوژ شدند و سوپرناتانت جمع آوری و با استفاده از دستگاه اسپری درایبر، 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 سوپرناتانت با استفاده از روش اسپکتروفتومتری بیورت (۱۸) انجام گرفت. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین آلبومین سرم گاوی و قرانت در طول موج ۵۴۰ نانومتر در اسپکتروفتومتر مدل Jenway 6305 (انگلستان) استفاده شد.

درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیزاسیون یکی از پارامترهای تعیین میزان باندهای

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 ارائه 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، ۴۶، 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 سوپرناتانت دیده می شود که به راحتی قابل برداشت بوده و از ارزش غذایی بالایی نیز برخوردار می باشد (۱۶ و ۳۲).

نتایج نشان داد که میزان چربی در تحقیق حاضر کاهش پیدا

نمود، به طوری که میزان آن در سه پروتئین هیدرولیز شده تقریباً 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 معمولاً 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 کاملاً 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 (عوف ۲۵). اویسی پور و همکاران (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 حاضر می باشد (عوف ۲۵). 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 پروتئولیتیکی بالاتر آنزیم آلکالاز نسبت به سایر آنزیم‌ها دانست.

درجه هیدرولیزاسیون

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

این حالت در سه آنزیم مشابه می‌باشد. این نتایج مشابه نتایج سایر محققین بوده و توسط آنها تایید می‌شود (۱۰، ۱۴، ۱۶، ۱۷، ۲۴ و ۲۵). علت این حالت را می‌توان چنین توجیه نمود که با افزایش زمان هیدرولیزاسیون، تعداد باندهای پپتیدی در دسترس آنزیم کاهش پیدا می‌کند، همچنین، از میزان فعالیت پروتئولیتیکی آنزیم کاسته می‌شود. از طرف دیگر، شکل گیری ترکیباتی که ممانعت کننده فعالیت آنزیمی هستند نیز می‌تواند در این امر دخیل باشد (۱۴ و ۲۵).

مقایسه بین درجه هیدرولیزاسیون آنزیم‌های مختلف در پایان واکنش (شکل ۱) نشان می‌دهد که درجه هیدرولیزاسیون توسط آنزیم آلکالاز به صورت معنی داری از دو آنزیم دیگر بالاتر می‌باشد ($P < 0.05$). نتایج سایر محققین، نتایج تحقیق حاضر را تایید می‌کند (۱۷ و ۲۵). دلیل این حالت را می‌توان در میزان فعالیت بیشتر آنزیم

آلکالاز نسبت به دو آنزیم دیگر دانست.

ترکیب اسیدهای آمینه

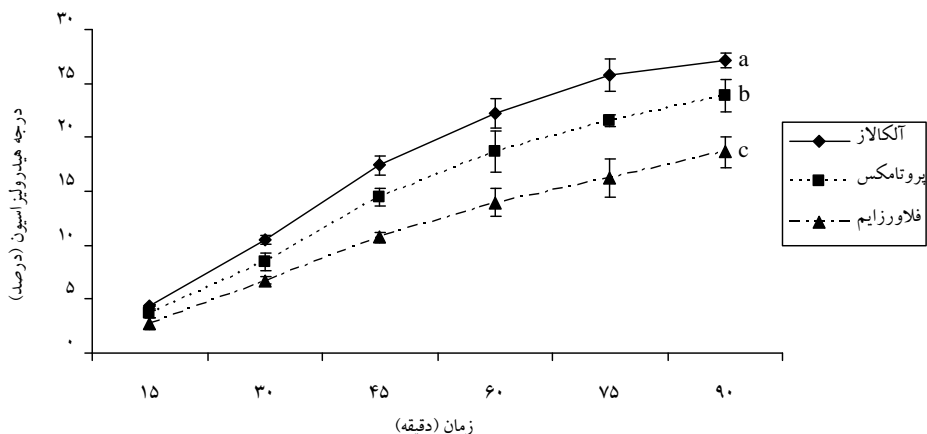
نتایج مربوط به ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین‌های هیدرولیز شده با آنزیم‌های مختلف در جدول ۳ ارایه شده است. نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله دارای ارزش غذایی بالایی است. به طوری که نسبت میزان اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه در پروتئین‌های هیدرولیز 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 می‌باشد. 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 ۴ ترکیب شیمیایی ماده خام و پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف^{۲،۱}

ماده	پروتئین (%)	چربی (%)	رطوبت (%)	خاکستر (%)	باز یافت نیتروژنی (%)
ماده خام	۲۱/۵ ± ۰/۵	۵/۰۸ ± ۱/۵۳	۶۹/۶۶ ± ۲/۳۲	۴/۴۶ ± ۱/۲۱	-
آلکالاز	۷۲/۳۴ ± ۳/۳ ^a	۱/۴۳ ± ۰/۵۷ ^a	۲/۸۲ ± ۲/۷۴ ^a	۲۲/۳۴ ± ۱/۳۸ ^a	۸۰/۶۷ ± ۲/۸۴ ^a
پروتامکس	۶۷/۳۶ ± ۲/۳ ^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 ۴ 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
گلايسين ^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

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 ارائه 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، ۲۴ و ۲۶). اویسی پور و همکاران (۲۶ و ۲۴) 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 (۲۶ و ۲۴) اعلام نمودند که مهمترین اسیدآمینه محدودکننده

از طرف دیگر میزان اسیدهای آمینه طعم زا (آسپارتیک اسید، گلايسين، 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 پروتئین‌ها، 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.

هیدرولیز شده کوسه ۴/۱۴ 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 می‌تواند 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 می‌توانند نیازهای یک انسان بالغ را به اسیدهای آمینه رفع کنند، درحالی که نسبت به نیاز ماهی کپور معمولی به اسیدهای آمینه، دارای محدودیت‌هایی هستند.

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

علی‌رغم 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 می‌باشد (۳۲).

نرخ کارایی پروتئین

نتایج مربوط به نرخ کارایی پروتئین در جدول ۵ ارایه شده است. این نتایج نشان می‌دهد 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 و ۲/۵۳ ۴/۳۹ و ۲/۳۷ می‌باشد. میزان نرخ کارایی پروتئین برای پروتئین هیدرولیز شده ماهی کاد، ۴/۳۴ و ۲/۸۶ و برای ماهی کاپلین ۴/۱۱ ۲/۶۱ گزارش شده است (۲۹ و ۳۰). دینیز و مارتین (۱۰) نیز نرخ کارایی پروتئین را برای پروتئین‌های

جدول ۴ 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	۲/۴۸	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

نرخ کارایی پروتئین‌های هیدرولیز شده	معادلات	
آلکالاز	پروتامکس	فلاورزایم
۲/۸۹	۲/۶۳	۲/۳۸
(تیروزین) ۰/۱۰۴ + (لایزین) ۰/۴۵۴ + ۰/۴۶۸		
(تیروزین) ۰/۹۴۴ + (هیستیدین) ۰/۲۱۱ + (لوسین) ۰/۷۸۰ + (متیونین) ۰/۴۳۵ + ۰/۸۱۶		
۰/۱۰۹۴ - (A) ۰/۰۸۰۸۴		
۰/۱۵۳۹ - (B) ۰/۰۶۳۲۰		

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

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

۶۰۳/۱۹۲۸) دانشگاه تربیت مدرس می باشد. نگارندگان بر خود 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.

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)،

منابع

- ۳ اویسی پور م، قمی م. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فرآورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۳۷-۴۰.
- ۴ 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- Aspino 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- Liasset 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., Synowiecki J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food Chemistry*, 53:285–293.
 - 30- Shahidi F., Nacz M., Pegg R.B., Synowiecki J. 1991. Chemical composition and nutritional value of processing discards of cod (*Gadus morhua*). *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.