جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثر زمان هیدرولیز ضایعات پس از پخت ماهی تن هوور (*Skipjack tuna*) با آنزیم آلکالاز بر راندمان بازیافت و اندازه مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده

نفیسه شرافت[1*]، علی معتمدزادگان[2]، رضا صفری[3]

[1] دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد ورامین، ورامین، ایران
[2] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
[3] پژوهشکده اکولوژی دریای خزر، ساری، ایران

تاریخ دریافت: 1391/9/27 تاریخ پذیرش: 1391/12/5

چکیده

هیدرولیز آنزیمی ضایعات کارخانجات فراوری ماهی روش مناسبی برای ایجاد ارزش افزوده در آن‌ها می‌باشد. در این پژوهش برای هیدرولیز آنزیمی ضایعات پس از پخت ماهی تن هوور (Skipjack tuna) از آنزیم آلکالاز با فعالیت آنزیمی 35 Au/Kg در دمای 55°c، pH=8/5، و زمان‌های 10، 20 و 30 دقیقه هر یک در سه مرحله متوالی در غالب طرح آماری کاملاً تصادفی در سه تکرار استفاده گردید. بعد از هیدرولیز، غیر فعال سازی آنزیم در دمای 90°c انجام شد، سپس پروتئین‌های محلول به کمک سانتریفوژ با دور3000×g در مایع رویی جدا شده و به کمک فریزدرایر (خشک کن انجمادی) خشک شدند. درجه هیدرولیز، راندمان استحصال پروتئین، طول زنجیره پپتیدی و وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده ارزیابی گردید. نتایج نشان دادند که در مرحله اول هیدرولیز، در زمان 30دقیقه بیشترین درجه هیدرولیز (8/12%) و بالاترین درصد بازیافت پروتئین (27/71%) بدست آمد($p<0/05$). طول زنجیره پپتیدی در زمان 10 دقیقه سوم از بیشترین میزان، معادل 48/23% برخوردار بود. کوتاه‌ترین طول زنجیره پپتیدی در زمان‌های طولانی هیدرولیز مشاهده گردید. وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر اساس الگوی الکتروفورز با ژل جداکننده 15% تا 12/5 کیلو دالتون برآورد شد.

واژه‌های کلیدی: هیدرولیز آنزیمی، ضایعات ماهی تن ، آلکالاز.

---

*مسوول مکاتبه: nafis_sherafat@yahoo.com

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

1- مقدمه

در دهه 1960 تحقیقات زیادی برای دست‌یابی به منابع پروتئینی ارزان قیمت جهت تغذیه جمعیت انسانی در حال رشد و نیز حیوانات صورت گرفت و در این راستا توجه زیادی به استفاده از ضایعات معطوف شد(2). میزان نسبتاً بالای صید جهانی و به دنبال آن صنایع عمل آوری، منجر به تولید حجم بالایی از ضایعات[1] غیر قابل استفاده گردیده که میزان آن در سال به 20میلیون تن می‌رسد و بدون هیچ توجه زیست محیطی، دور ریخته می‌شوند (20). عمده‌ترین مواد جانبی صنایع عمل آوری آبزیان شامل امعاء و احشاء، پوست، فلس، ستون مهره و استخوان‌های تنه می‌باشد (6). یکی از مهم‌ترین ضایعات که باعث آلودگی زیست محیطی می‌شود، ضایعات بعد از پخت ماهی تن می‌باشد که این ضایعات شامل: گوشت قهوه‌ای، استخوان، پوست و کمی چربی می‌باشد.این ضایعات صنایع شیلاتی غنی از پروتئین و اسیدهای چرب غیر اشباع بوده که باعث تسریع فساد در آن‌ها می‌گردد و این ترکیبات بیولوژیکی بایستی به نحو احسن مورد استفاده قرار گیرند (7). استفاده از تکنولوژی آنزیمی خصوصاً آنزیمهای پروتئاز، به منظور تجزیه باندهای پروتئینی، کاربرد گسترده ایی در صنایع غذایی پیدا کرده است(19). آنزیم‌های میکروبی در مقایسه با آنزیم‌های بدست آمده گیاهی و یا حیوانی چندین مزایا دارد که شامل: واریته وسیعی از فعالیت کاتالیتیکی قابل دسترس، pH و مقاومت دمایی بالا می‌باشد(8). آلکالاز یک پروتئاز باکتریایی قلیایی است که توسط Bacillus licheniformis تولید می‌شود و به طور کلی، آلکالاز 2/4L مکرراً برای هیدرولیز ماهی بکار می‌رود، به خاطر اینکه در زمان نسبتاً کوتاه و در شرایط pH مناسب نسبت به آنزیم‌های اسیدی یا طبیعی می‌تواند درجه هیدرولیز بالایی را بدست آورد (13و19). پروتئین‌های هیدرولیز شده ماهیان، دارای کاربردهای وسیعی هستند این مواد به دلیل کوتاه بودن زنجیره پپتیدی، دارای قابلیت هضم بالایی بوده و می‌توانند به عنوان مکمل پروتئینی در تغذیه انسان و دام و آبزیان مورد استفاده قرار گیرند. از آن جمله می‌توان به جایگزین‌های شیر، مکمل‌های پروتئینی، پایدار کننده نوشیدنی‌ها و ترکیبات تشدید کننده طعم در فرآورده‌های قنادی اشاره کرد (13). یکی دیگر از مهم‌ترین کاربردهای پروتئین هیدرولیز شده، استفاده از این منابع مهم پروتئینی در تهیه محیط‌های کشت باکتری به عنوان منبع ازت می‌باشد (20). تحقیقات زیادی در این زمینه صورت گرفت از جمله، اثر آنزیم‌های مختلف ،دما، زمان، نسبت آنزیم به سوبسترا و pH مورد بررسی قرار گرفتند.

Rasco & Kristinsson در سال(2000) اثر آنزیم آلکالاز را بر درجه هیدرولیزاسیون و بازیافت نیتروژنی پروتئین‌های عضله ماهی سالمون گونه آتلانتیک در دمای 40°c و مدت زمان 180 دقیقه را بررسی نمودند (13). Bhaskar و همکاران **در سال** (2008) بروی ضایعات احشایی ماهی کپور آب شیرین هندوستان مطالعه کردند و شرایط هیدرولیز pH= 8/5، دمای 50 درجه سانتی‌گراد و زمان 135 دقیقه و نسبت آنزیم به سوبسترا 1/5% (V/W) با استفاده از آنزیم آلکالاز بوده است (7).

یکی از پارامترهای کلیدی هیدرولیز پروتئین، درجه هیدرولیز است که به عنوان درصدی از پیوندهای پپتیدی شکسته شده تعریف می‌شود (25). خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولید شده تعیین می‌شود و این موارد بستگی به طبیعت پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز به ویژه دما و pH دارد (13). بازیافت نیتروژنی یکی دیگر از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم‌ها در هیدرولیز پروتئین‌های غذایی محسوب می‌شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین‌های محلول از غیر محلول و میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیزاسیون آنزیمی می‌باشد (11 و16). طول زنجیره پپتیدی ارتباط مستقیمی با ویژگی‌هایی نظیر امولسیونی و تلخی دارد (24).طول زنجیره به اندازه هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئین هیدرولیز شده بستگی دارد (13). ویژگی آنزیم بر وزن مولکولی و میانگین اندازه پپتیدها نیز موثر می‌باشد (19).

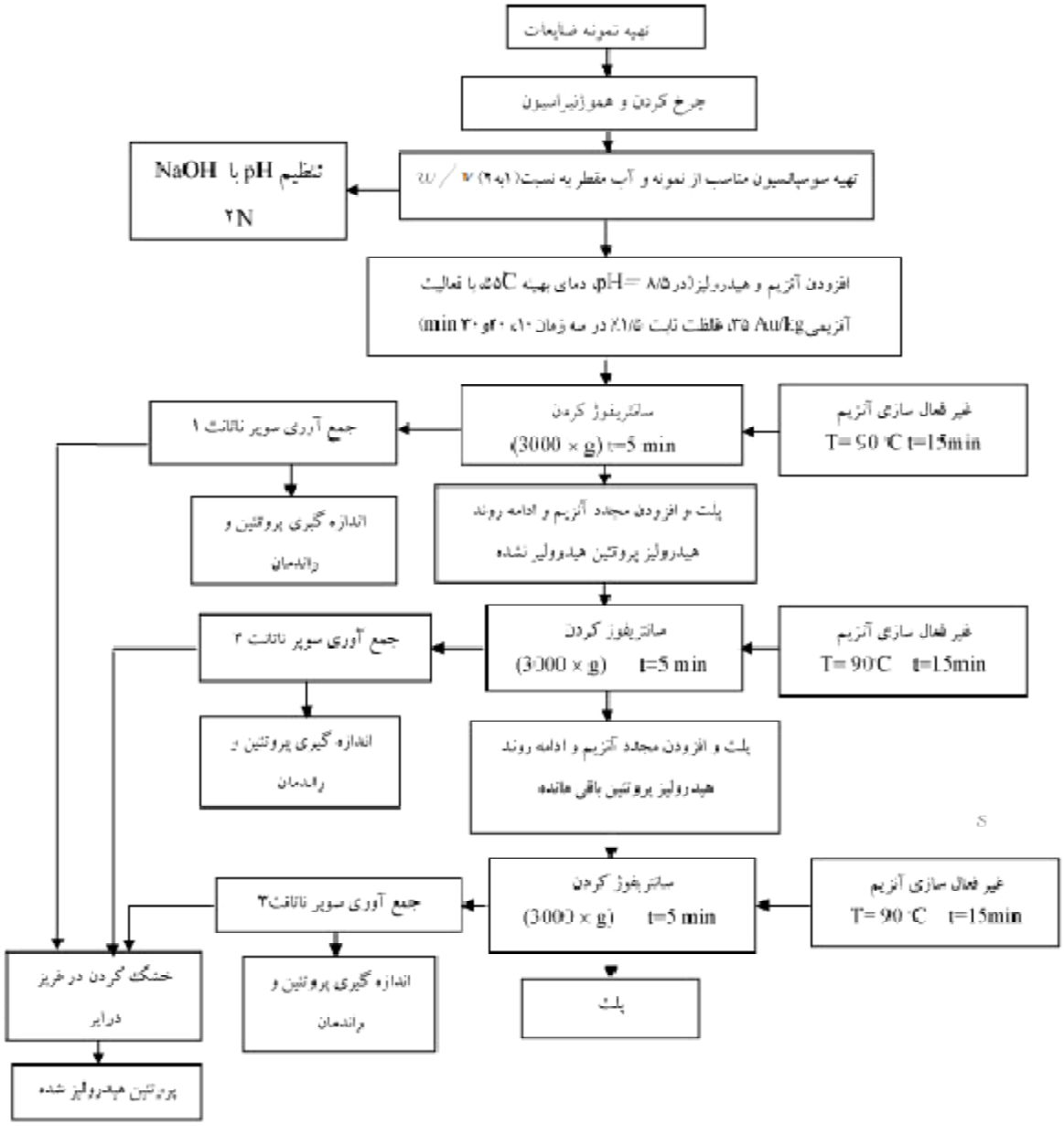
انواع ماهی‌های تن از ارزش اقتصادی بالایی برخوردار بوده و رقم قابل توجهی از کل صید سالانه حدوداً 3 میلیون تن را به خود اختصاص داده‌اند(9). در سال 2007 صید کل تن ماهیان (7 گونه) 4230809 تن بوده است (10). میزان صید کل تن ماهیان در ایران در سال 1388، 141,000 تن می‌باشد (1).

2-مواد و روش‌ها

نمونه را چرخ کرده و در ظرف پلاستیکی پلی اتیلنی قرار داده و تا شروع آزمایش در دمای 20°C- نگه داری گردید.

[1] By -product

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



شکل 1- دیاگرام هیدرولیز آنزیمی برای تولید پروتئین هیدرولیز شده.

آنزیم Alcalase 2.4 L با فعالیت آنزیمی 35AU/Kg و چگالی1/18g/ml از شرکت نووزیم[1] دانمارک تهیه شد و تا زمان شروع آزمایش در دمای 4 درجه سانتی‌گراد نگه داری گردید (24).

2-1- مواد اولیه

ضایعات پس از پخت ماهی تن به عنوان ماده خام اولیه، از کارخانه کنسرو ماهی تن تلاجی واقع در شهرک صنعتی می‌رود بابلسر تهیه شد.

2-3-اندازه گیری پروتئین

میزان کل پروتئین در مواد خام (N×6.25) به روش کجلدال (5) اندازه گیری شد .

2-4- اندازه گیری غلظت پروتئین

نمونه‌ها به روش بیورت با اندازه گیری شدت جذب در طول موج 540 نانومتر آزمایش شدند(12). برای رسم منحنی استاندارد در هر دو روش مذکور از سرم آلبومین گاوی خالص استفاده گردید (15).

2-5- اندازه گیری درجه هیدرولیز پروتئین

میزان هیدرولیز بر اساس گزارش‌های Fonkwe و Singh (1996) و kristinsson و Rasco (2000) و به روش تری کلرواستیک اسید (TCA)محاسبه گردید.میزان درجه هیدرولیز از طریق فرمول ذیل محاسبه گردید :

100× نیتروژن در نمونه اولیه / نیتروژن محلول در 10TCA%

2-6- بازیافت پروتئین

میزان بازیافت پروتئینی بر اساس فرمول زیر محاسبه گردید:

100 × مقدار پروتئین اولیه / پروتئین موجود در پروتئین هیدرولیز شده

2-7-اندازه گیری طول زنجیر پپتیدی

برای اندازه گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل از هیدرولیز با آنزیم آلکالاز از روش Adler-Nissen استفاده شد. این روش توسط Kristinsson و Rasco (2000) نیز ارائه شده است. در این روش از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره به کمک فرمول ذیل استفاده گردید:

$$PCL = \frac{100}{\%DH}$$

2-8-تخمین وزن مولکولی

سدیم دودسیل سولفات پلی آکریل آمید ژل الکتروفورز (SDS-PAGE) به روش لاملی (1970) انجام شد. الگوی الکتروفورز با ژل متراکم کننده 6% و ژل جدا کننده 15% استفاده شده است (14).

3-طرح و تجزیه و تحلیل آماری

صفات مورد بررسی در این مطالعه راندمان استحصال پروتئین، درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی بوده که از طرح آماری کاملاً تصادفی و برای مقایسه میانگین داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه و برای مقایسه صفات مربوط به هیدرولیز در سه زمان هیدرولیز (10,20و30) دقیقه (3 تیمار و 3 تکرار و جمعاً 27 نمونه) از تست دانکن استفاده شده و نتایج در سطح معنی دار (p= %5) و ضریب اطمینان 95 درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. نرم افزار مورد استفاده برای آنالیز آماری SPSS 15بوده است.

4-نتایج و بحث

4-1- اندازه گیری شیمیایی

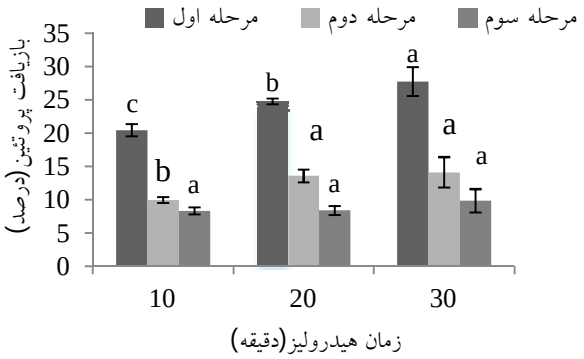
میزان کل پروتئین موجود در نمونه اولیه با روش کجلدال 27/5% می‌باشد.با توجه به اینکه 30 گرم نمونه هیدرولیز شد بنابراین پروتئین در 30 گرم 8/25 گرم خواهد بود.

4-2- بازیافت پروتئین

نتایج آنالیز آماری نشان می‌دهد که بین سه زمان 10، 20 و 30 در مرحله اول (p< 0/01) و همچنین در مرحله دوم اختلاف معنی داری وجود داشته (p<0/05) ولی در مرحله سوم اختلاف معنی داری مشاهده نشد. بیشترین میزان بازیافت پروتئینی در مرحله اول هیدرولیز سه زمان نسبت به مرحله دوم و سوم هیدرولیز مشاهده شده است. زیرا در مرحله اول هیدرولیز، پروتئین بیشتری در دسترس آنزیم قرار می‌گیرد در نتیجه بازیافت پروتئین افزایش می‌یابد. همچنین در هر مرحله به طور جداگانه با افزایش زمان از 10دقیقه تا زمان 30 دقیقه میزان بازیافت پروتئینی افزایش یافته است و با طولانی‌تر شدن زمان هیدرولیز در 10، 20 و 30 دقیقه

[1] Novozymes

مرحله دوم از میزان بازیافت پروتئینی کاسته می‌شود و در مرحله سوم به روند ثابت می‌رسد. طبق مطالعات انجام شده توسط محققین، دلیل این امر را احتمالاً عدم دسترسی آنزیم با پروتئین دانسته‌اند و یا به دلیل محدود شدن فعالیت آنزیمی به خاطر شکل خاصی که فراورده در هیدرولیز شدید می‌گیرد، می‌باشد در نتیجه راندمان پروتئینی کمتری در زمان طولانی‌تر بدست می‌آید(19و21). نتایج مطالعات Shahidi et al.,(1995) Ovissipour et al.,(2009);تائید کننده این نتیجه می‌باشد. نتایج آن‌ها حاکی از افزایش دو فاکتور درجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی، متناسب با افزایش زمان می‌باشد به طوری که بعد از گذشت 120 دقیقه به ترتیب، دو فاکتور مذکور به 23 و 65% افزایش یافت (21). نتایج مطالعه Liast و همکاران (2000)، نیز نشان داد که بعد از 120 دقیقه، بازیافت پروتئین از 30 درصد به 70-60 درصد می‌رسد.



شکل2- میزان بازیافت پروتئین سه مرحله هیدرولیز در زمان‌های (10، 20 و 30) دقیقه

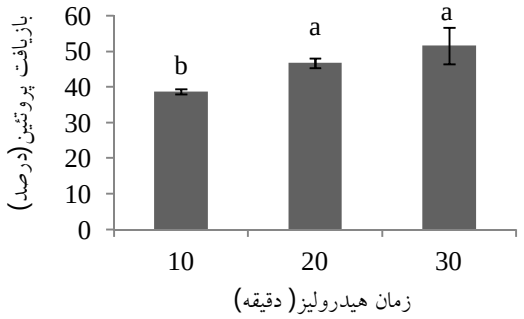
*در هر مرحله حروف‌های غیر مشابه اختلاف معنی داری دارند (P<0.01).

4-3- تعیین کل راندمان بازیافت پروتئین در سه زمان 10، 20 و 30 دقیقه

با توجه به نتایج بدست آمده از آنالیز دانکن بین زمان‌های 10 و 20 دقیقه و همچنین 10 با 30 دقیقه اختلاف معنی داری وجود دارد. مطابق شکل3 بیشترین مجموع راندمان استحصال پروتئین سه مرحله هیدرولیز در زمان 30 دقیقه می‌باشد که میزان آن 51/67% است. نتایج بدست آمده با گزارش Kristinsson & Rasco., (2000) مطابقت دارد. آن‌ها اثر آنزیم آلکالاز بر بازیافت نیتروژنی پروتئین‌های عضله ماهی سالمون در دمای 40°c و مدت زمان 180 دقیقه را مورد بررسی قرار دادند. نتایج مطالعه آن‌ها نشان می دهد که با افزایش زمان میزان بازیافت نیتروژنی (تا حدود 47%) افزایش یافت (13).در این تحقیق راندمان استحصال کل با افزایش زمان، افزایش می‌یابد و با گذشت زمان بالاتر به روند ثابتی می‌رسد. در واقع سینیتیک بازیافت پروتئین در طی هیدرولیز آنزیمی به دو قسمت تقسیم می‌شود یک واکنش اولیه سریع که در آن زنجیره‌های پلی پپتیدی با باندهای ضعیف از ذرات پروتئینی نا محلول جدا می‌شوند و یک واکنش آهسته‌تر که در آن پروتئین‌های مرکزی زنجیره شکسته می‌شوند (11و16).

4-4- درجه هیدرولیز

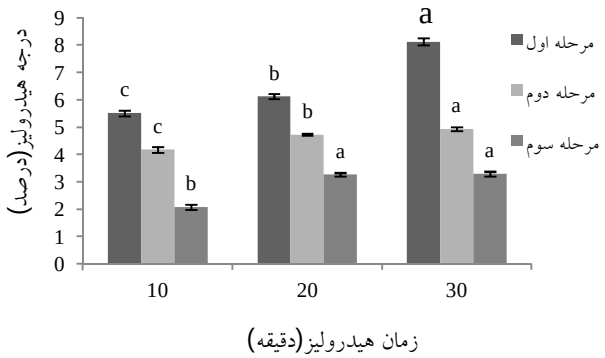
بر اساس تأثیر زمان بر هیدرولیز پروتئین‌های ضایعات پس از پخت ماهی توسط آنزیم آلکالاز، این عامل در میزان درجه هیدرولیز تأثیر قابل توجهی داشته است.



شکل 3- میزان کل بازیافت پروتئین در زمان‌های 10، 20 و 30 دقیقه

طبق نتایج بدست آمده از آنالیز T-TEST اختلاف معنی داری بین سه مرحله وجود داشته است. همچنین در مرحله اول و دوم هیدرولیز طبق نتایج بدست آمده از آنالیز واریانس و دانکن اختلاف کاملاً معنی داری بین سه زمان 10، 20 و 30 دقیقه وجود داشته است (p<0/01). در مرحله سوم هیدرولیز طبق نتایج بدست آمده از آنالیز واریانس و دانکن اختلاف معنی داری بین زمان 10 با زمان های20 و 30 دقیقه وجود داشته است (p<0/05). مطابق شکل (4) میزان درجه هیدرولیز در هر مرحله از زمان 10 تا30 دقیقه روند افزایشی دارد.با طولانی‌تر شدن زمان هیدرولیز در مرحله دوم و سوم سه زمان (10، 20 و 30 دقیقه) از میزان درجه هیدرولیز کاسته می‌شود. بالاترین درجه هیدرولیز در 30 دقیقه مرحله اول معادل 8/12درصد است. نتایج بدست آمده با نتایج سایر محققین مطابقت دارد (11و19). بر اساس نتایج بدست آمده از اثر زمان بر هیدرولیز، با افزایش زمان واکنش هیدرولیز آنزیمی با یک

فاز سریع آغاز می‌شود و طی این مرحله تعداد زیادی از باندهای پپتیدی شکسته می‌شود (13).در ادامه واکنش نرخ رشد هیدرولیز کاهش پیدا می‌کند و با طولانی‌تر شدن زمان، درجه هیدرولیز کاهش می‌یابد و وارد مرحله فاز سکون می‌شود. کاهش در سرعت واکنش ممکن است به دلیل کاهش در غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای هیدرولیز، مهار آنزیمی و غیر فعال سازی آنزیم می‌باشد(13). Ovissipour و همکاران(2009) در مطالعات خود بر ماهی خاویاری، بالاترین میزان درجه هیدرولیز (46/13%)در زمان 205 دقیقه و دمای 55درجه سانتی‌گراد بدست آوردند. Souissiو همکاران(2007) نیز اثر آنزیم آلکالاز را بر درجه هیدرولیزاسیون پروتئین‌های امعاء و احشاء ماهی ساردین در دمای 50°c مورد بررسی قرار دادند و بیشترین میزان درجه هیدرولیز را در زمان 180 دقیقه مشاهده نمودند.



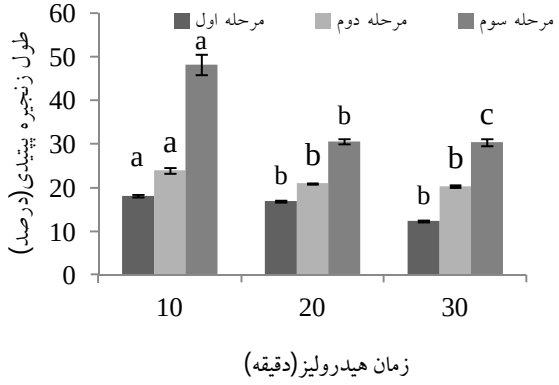
شکل4- تأثیر زمان بر درجه هیدرولیز در مراحل اول، دوم و سوم هیدرولیز

در هر مرحله حروف‌های غیر مشابه اختلاف معنی داری دارند (P<0.01).

4-5-طول زنجیره پپتیدی

نتایج بدست آمده از تحقیق نشان داد که اختلاف کاملاً معنی دار(p<0/01) بین سه زمان در مرحله اول و همچنین مراحل دوم و سوم وجود داشته است (p<0/05).با افزایش زمان، طول زنجیره پپتیدی کوتاهی بدست آمده و در زمان 10 دقیقه سوم طول زنجیره پپتیدی بیشتر از زمان‌های 20 و30 دقیقه بدست آمد. نتایج بدست آمده مطابق با نتایج بدست آمده از اثر آنزیم پاپائین بر پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا که توسط معتمدزادگان و همکاران (1388) ارائه شد، می‌باشد و طول تقریبی زنجیره‌ها از کمتر از 10 تا حدود 80 متغیر بوده است. کم‌ترین طول زنجیره در فعالیت‌های بالای آنزیمی و یا زمان‌های طولانی مشاهده گردید بطوریکه در حداکثر زمان و فعالیت آنزیم بکار رفته پپتیدهایی با طول زنجیر کمتر از 20 اسید آمینه شکل می‌گیرند(3).

البته نتایج بدست آمده از تحقیق حاضر را می‌توان این‌گونه تفسیر نمود که با افزایش زمان، منحنی طول پپتیدی کاهش می‌یابد. به نظر 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 به تدریج افزایش و سپس در هر مرحله با افزایش زمان به روند ثابت رسید که علت آن مربوط به ممانعت آنزیمی است که احتمالاً آنزیم‌ها خودشان را هیدرولیز می‌کنند(3). بنابراین در مرحله سوم آزمایش نسبت به مرحله دوم و مرحله اول میزان طول زنجیره پپتیدی افزایش یافته اما در هر مرحله از زمان 10 تا زمان 30 دقیقه میزان طول زنجیره پپتیدی کاهش و به روند ثابت رسید.



شکل 5-تأثیر زمان بر طول زنجیره پپتیدی در سه مرحله هیدرولیز

در هر مرحله حروف‌های غیر مشابه اختلاف معنی داری دارند (P<0.01).

4-6-وزن مولکولی

وزن مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده ضایعات پس از پخت ماهی تن تا 12/5 KDa برآورد شد. همچنین در همه خطوط وزن مولکولی 45 کیلودالتون نیز مشاهده شد. وجود پروتئین‌هایی با وزن مولکولی بالا در این خطوط که درجه هیدرولیز بالایی نیز دارند ممکن است به دلیل هیدرولیز ناقص یا به دلیل پروتئین‌های که توسط آنزیم هیدرولیز نشده‌اند، باشد (22).این نتیجه با نتایجی که توسط Souissi و همکاران (2007) بدست آوردند مطابقت دارد. مطالعه آن‌ها نشان داد که در درجه هیدرولیز کمتر، وزن مولکولی باندهای پپتیدی بیشتر از درجه هیدرولیز بالاست. در DH=%10/16 درصد بالایی از پپتیدهای با وزن مولکولی کمتر از

14/2KDa را دارند و در DH 9/31% و 6/62% به ترتیب پپتیدهایی با وزن مولکولی 35KDa و 55 را دارند.ممکن است به دلیل پروتئین‌های بزرگ از مواد اولیه یا پروتئین‌های حاوی مواد خام که کلاً توسط آنزیم هیدرولیز نشده‌اند، باشد. مطالعات انجام شده توسط Bahaskar و همکاران در سال 2008 بر روی ضایعات احشایی ماهی Catla نشان داد که به دلیل هیدرولیز و افزایش درجه هیدرولیز، وزن مولکولی پروتئین‌های بدست آمده کمتر از 8KDa بود.

5- نتیجه گیری

بررسی روند هیدرولیز در زمان‌های مختلف نشان داد که درجه هیدرولیز، راندمان استحصال پروتئین و طول زنجیره پپتیدی تحت تأثیر زمان هیدرولیز می‌باشند. با افزایش زمان از 10 تا 30 دقیقه میزان راندمان استحصال پروتئین و درجه هیدرولیز افزایش ولی طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد. نتایج آنالیز وزن مولکولی نشان داد که این آنزیم می‌تواند پپتیدهای محلولی با وزن مولکولی تقریباً مشابه زیر 12/5 کیلو دالتون ایجاد نماید و پپتید محلول با وزن مولکولی متوسط ایجاد نمی‌گردد. در هر صورت تبدیل پروتئین های نا محلول به پپتید های کوچک محلول می‌تواند سبب بروز خواص کاری مطلوب در آن‌ها شده و با ایجاد ظرفیت استفاده صنعتی از انها منجر به افزایش ارزش افزوده گردد.

6- منابع

1 - پایگاه اطلاع رسانی سازمان شیلات ایران. 1389. www.shilat.com

2-رضوی شیرازی ،ح . 1380. تکنولوژی فراورده دریایی-اصول نگهداری و عمل آوری، انتشارات پارس نگار.

3-معتمدزادگان، ع. شهیدی، ف. مرتضوی، س.ع و همکاران1388. اثر آنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین‌های میوفیبریلار ماهی کیلکا. *مجله علوم کشاورزی. منابع طبیعی گرگان*. جلد شانزدهم. شماره سوم.

4-Adler-Nissen, J. 1986. A Review of Food Hydrolysis Specific Areas. In: Enzymic Hydrolysis of Food Proteins, J.Adler-Nissen (Ed.), Elsevier Applied Science Publishers, Copen hagen, Denmark pp. 57–109.

5- AOAC. 2005. Official Methods of Analysis, (Sixteenth Ed.) Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.

6-Benjakul, B. and Morrissey, M. T. 1997. Protein hydrolysates from Pacific whiting solid wastes, *J. Agric. Food Chem.*, 45: 3423-3430.

7-Bhaskar, N. Benila, T. Radha, C. & Lalitha, R. G. 2008. Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral waste protein of catla(Catla catla) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease, *Bioresource Technology*, 99: 335-343.

8-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.

9- FAO, 2006. Year book of fishery statistics, vol. 98/1&2. Food and Agricultural Organisation of the United Nations, Rome,Italy

10- FAO, 2010. Statics, Fisheries and Aquaculture Statics, Tuna global caches by Stocks. From www.fao.org, online.

11- Guerard, F. Guimas, L. Binet, A. 2002. Prouction of tuna waste hydrolysates by a commercial neutral protease preparation, *Jorunal of Molecular Catalysis B*: Enzymatic: 489-498.

12-Jean WG, Sharron LO. 2001. Comparison of refractometer and biuret methods for total protein measurement in body cavity fluids. *Vet Clin Path* 30(1): 16-18

13-Kristinsson, H. G. & Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40(1): 43-81.

14-Laemmli, U.K 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*,22: 680–685.

15-Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. *Methods in Enzymology*, 3:p. 450. New York: Academic Press.

16-Liaset B, Nortvedt R, Lied E, Espe M. 2002. Studies on the nitrogen recovery in enzymic hydrolysis of Atlantic salmon (Salmosalar, L.) frames by Protamex ^{MT} protease. *Process Biochem*. 37:1263–9.

17-Mukhin, V. A., Novikov, V. Yu., and Ryzhikova, L. S., 2001.A protein hydrolysate enzymatically produced from the industrial waste of processing Icelandic scallop chlamys islandica. *Applied Biochemistry and Microbiology* 37(3): 338-343.

18-Nilsang, S., Lertsiri, S., Suphantharika, M., Assavanig, A., 2005. Optimization of enzymatic hydrolysis of fish soluble concentrate by commercial proteases. *J. Food Engineering*. 70: 571–578.

19-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 persiansturgeon (Acipenser Persicus) viscera. *Food Chemistry*. 115: 238-242.

20-Rustad, T. 2003. Utillization of marine byproducts, *Electronic J. Enuviron.Agri. Food Chem.* 2 (4): 458-463

21-Shahidi, F. Han, X. Q. Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (Mallotus villosus), *Food Chemistry*, 53: 285-293.

22-Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y., Nasri, M., 2007. Biochemical and functional properties of Sardinella By- Product hydrolysate. *Food Technol. Biotechnol*. 45 (2): 187- 194.

23-Safari, R., Motamedzadegan, A., Ovissipour, M., Regenstein, J. M.,Gildberg, A., & Rasco, B. 2009. Use of hydrolysates fromyellowfin tuna (Thunnus albacares) heads as a complex nitrogen source for lactic acid bacteria. *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1107/s11947-009-0225-8.

24-Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. H., Yuan, X. Q., 2007. Influence of the extent of enzymatic hydrolysis on the functional properties of protein hydrolysate from grass carp (Ctenopharyngodon idella) skin. *Food Chemistry*, 104 (4): 1698-1704.

25 -Whiaker, G. R., Alphons, G. J. Vorajen, Dominic W. S. Wong. et al. 2003. *Handbook of Food Enzymology*, 221-236.