نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۳ شماره ۴/ سال ۱۳۹۲

اثر آنزیم نئوتراز بر درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژنی و طول زنجیره پپتیدی پروتئین گوشت کوسه چانه سفید

ریحانه شکرپور رودباری[۱]، علی معتمد زادگان[*۲]، سید هاشم حسینی پرور[۲] و محمود رضا اویسی پور[۳]

تاریخ دریافت: ۹۰/۱۱/۲۳ تاریخ پذیرش: ۹۲/۷/۱

[۱] دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۲] استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری

[۳] پژوهش‌یار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه واشنگتن آمریکا

[*]مسئول مکاتبه: Email: amotgan @yahoo.com

چکیده

کوسه چانه سفید *(Carcharhinus dussumieri)* یکی از گونه‌های مهم کوسه ماهیان در خلیج فارس است که به دلیل وجود اوره زیاد، گوشت و سایر فرآورده‌های مستقیم آن در ایران از بازار خوبی برخوردار نمی‌باشد. در تحقیق حاضر اثر شدت هیدرولیز بوسیله آنزیم نئوتراز روی درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژنی و طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه ماهی چانه سفید مورد بررسی قرار گرفت. برای هیدرولیز آنزیمی از نسبت آنزیم به سوبسترا ۱۲ آنسون به ازای یک کیلوگرم پروتئین و دمای ۵۰ ^{o}C استفاده شد. شدت هیدرولیز در بازه‌های زمانی۱۰،۲۰ و۳۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژنی و کاهش طول زنجیره پپتیدی افزایش یافت. به طور کلی، میانگین درجه هیدرولیز ۲/۹۰، ۳/۷۹ و ٤/٤٨ درصد، راندمان بازیافت نیتروژنی ۷٤/۷۹، ۸۰/۷۵ و ۸۹/٦٤ درصد و طول زنجیره پپتیدی ٥١/٥٤، ۳۹/٦۸ و ۳۳/۹۸ بترتیب برای زمان‌های هیدرولیز ۱۰ ،۲۰ و۳۰ دقیقه بدست آمد. اگرچه با افزایش زمان هیدرولیز به صورت معنی‌داری ($P<۰/۰۵$) درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی افزایش یافته و طول زنجیره پپتیدی کاهش می‌یابد.

واژه‌های کلیدی: بازیافت نیتروژنی، طول زنجیره پپتیدی، کوسه ماهی چانه سفید، هیدرولیز آنزیمی

مقدمه

هر ساله مقدار زیادی از ضایعات صنایع تبدیلی شیلاتی دور ریخته شده و تلاش چندانی برای ایجاد ارزش افزوده در آن ها و بالا بردن سطح مصارف انسانی صورت نمی گیرد. بسیاری از تولید کنندگان فرآورده های دریایی مجاز نیستند تا ضایعات را مستقیماً در محیط زیست رها سازند در نتیجه یک هزینه اضافه‌ای برای تصفیه مواد قبل از دور ریختن آن‌ها متحمل می‌شوند. از طرفی بسیاری از این مواد منابع غنی از ترکیبات با ارزش از جمله پروتئین ها محسوب شده که قابل بازیافت می باشند (اویسی پور و همکاران ۲۰۰۹، کریستینسن و راسکو **a**۲۰۰۰، واسوا و همکاران ۲۰۰۷). کوسه ماهی چانه سفید*(Carcharhinus dussumieri)* یکی از گونه های مهم کوسه ماهیان در آب های جنوب ایران می باشد که به دلیل بالا بودن میزان اوره در گوشت آن بازار پسندی کمی دارد. علی رغم اوره زدایی باز هم گوشت کوسه برای افرادی که بیماری قلبی-عروقی، نقرس و فشار خون بالا دارند توصیه نمی شود. لذا کوسه ماهی ها انواعی از محصولات دریایی هستند که مصرف کمی داشته و بخش اعظمی از آنها به عنوان ضایعات دور ریخته می شوند. امروزه پژوهشگران به دنبال روش‌هایی برای استخراج مواد با ارزش از این گونه آبزیان و ضایعات آن ها هستند که از جمله می توان به استخراج پروتئین اشاره کرد. پروتئین استخراج شده از این ماهی ها به عنوان یک منبع جدید پروتئینی محسوب شده که علی رغم ارزش تغذیه ای زیاد از نظر اقتصادی کم هزینه بوده و خواص کارکردی مطلوبی را دارا می‌باشد (دینیز و مارتین۱۹۹۷، جسالدو و لی چان ۱۹۹۹).

برای تبدیل ضایعات ماهی و بخش های کم مصرف آنها به پروتئین از روش های هیدرولیز شیمیایی و آنزیمی، می توان استفاده کرد. طی بررسی های انجام شده روی نتایج این روش ها هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌های بهتری از نظر تغذیه‌ای و کارکردی ایجاد می‌کند (کریستینسن و راسکو a۲۰۰۰). به منظور تولید پروتئین‌های هیدرولیز شده از آنزیم های مختلفی استفاده گردیده است. به عنوان مثال لیاست و همکاران (۲۰۰۰) از آلکالاز، نئوتراز و پپسین؛ اویسی پور و همکاران (۲۰۱۰) از آلکالاز و پروتامکس؛ کلومپونگ و همکاران (۲۰۰۷) از آلکالاز و فلاوورزایم؛ آسمپو وهمکاران (۲۰۰۵) از آلکالاز، نئوتراز، پروتامکس، پاپائین و بروملاین برای تبدیل فرآورده های دریایی و ضایعات آن ها به پروتئین های هیدرولیز شده استفاده کرده اند. برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با خواص کارکردی مطلوب انتخاب نوع آنزیم و فراهم کردن شرایط هیدرولیز مثل زمان، pH و دما بسیار حائز اهمیت است (هال و احمد ۱۹۹۲).

در این تحقیق از آنزیم نئوتراز برای تولید پروتئین هیدرولیز شده گوشت کوسه ماهی چانه سفید استفاده شده است. آنزیم نئوتراز یک آنزیم با منشا میکروبی است که توسط *Bacillus amyloiquience* تولید می شود. این آنزیم با فعالیت L ۰/۸ (آنسون[1] به ازای هر میلی لیتر آنزیم)، یک اندوپروتئاز بوده و اپتیمم فعالیت آن در pH=۵/۵-۷/۵ و دمای ۵۰ درجه سانتی گراد می باشد (اسلیزیت و همکاران ۲۰۰۵).

تحقیق حاضر با هدف بررسی تاثیر شدت هیدرولیز آنزیم نئوتراز روی درجه هیدرولیز، راندمان بازیافت نیتروژنی و طول زنجیره پپتیدی پروتئین های هیدرولیز شده کوسه ماهی چانه سفید انجام گردیده است. هم چنین به منظور افزایش راندمان محلول سازی پروتئین ها و احتمالا حفظ بهتر خواص کارکردی پروتئین های هیدرولیز شده از طریق ممانعت از هیدرولیز شدید، هیدرولیز مرحله‌ای (٤ مرحله متوالی) در بازه‌های زمانی ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه انجام شد.

[1]Anson

مواد و روش ها

ماده خام اولیه

کوسه ماهی چانه سفید*Carcharhinus dussumieri* از بندر چابهار صید شد و به صورت منجمد در دمای ۲۰- ^{o}C به کارخانه بسته بندی ماهی (کیان ماهی خزر، بابلسر، ایران) ارسال گردید. در کارخانه، امعاء و احشاء آن به صورت منجمد خارج شده و ماهی پوست گیری شد. گوشت کوسه ماهی به صورت منجمد در داخل یونولیت طی یک ساعت به آزمایشگاه مرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان در ساری منتقل گردید. در محل آزمایشگاه گوشت ماهی توسط چرخ گوشت صنعتی با قطر سوراخ ۰/۵ میلی متر به طور کامل چرخ شد. سپس گوشت چرخ شده ماهی در کیسه های پلی اتیلنی بسته بندی شده و به منظور آزمایشات بعدی در فریزر با دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

آنزیم

به منظور هیدرولیز آنزیمی، از آنزیم نئوتراز (Novozymes Co. Denmark) با فعالیت آنزیمی ۰/۸ آنسون به ازای هر میلی لیتر آنزیم استفاده شد. این آنزیم تا زمان آزمایش در دمای ٤ درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

آماده سازی نمونه قبل از انجام هیدرولیز

به دلیل وجود اوره و مواد ازته فرار زیاد در گوشت کوسه، قبل از انجام هیدرولیز طی دو مرحله شستشو با آب نمک ۰/۱ مولار در دمای ٤ درجه سانتی گراد به روش اونادنالوره و شهیدی (۱۹۹٦) مقدار مواد ازته فرار آن کاهش داده شد. بدین منظور در مرحله اول شستشو یک قسمت از گوشت با وزن معلوم با مقدار ۳ برابر آب نمک با غلظت ۰/۱ مولار (حجمی- وزنی) مخلوط و با استفاده از یک همزن مکانیکی (RW20, IKA, Germany) با سرعت۱۵۰ دور بر دقیقه در مدت ۱۰ دقیقه پخش و یکنواخت گردید. مخلوط حاصله سپس به مدت ۱۵ دقیقه و با دور۳۲۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ (BH-1200, Behdad, Iran) شد. پس از سانتریفوژ مایع رویی برداشته شده و پروتئین رسوبی برای بار دوم (همانند مرحله اول) شستشو داده شد. در مرحله دوم نیز مایع رویی دور ریخته شد و پروتئین رسوب یافته آماده هیدرولیز با آنزیم نئوتراز گردید.

هیدرولیز پروتئین گوشت کوسه

برای انجام هیدرولیز، یک نسبت از گوشت شستشو شده کوسه ماهی با ۲ برابر آب مقطر (حجمی- وزنی) در ارلن مایرهای ۱۰۰۰ میلی لیتری ریخته و در بن ماری با دمای ۵۰ ^{o}C قرار داده شد. پس از تنظیم دما، آنزیم نئوتراز (۱۲آنسون به ازای یک گیلوگرم پروتئین) به آن افزوده شد و به مدت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه عمل هیدرولیز روی نمونه ها در همین دما انجام گردید. بعد از پایان هیدرولیز به منظور غیر فعال سازی آنزیم، ظروف حاوی نمونه در بن ماری با دمای ۹۰ ^{o}C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شدند. برای خنک کردن نمونه های غیر فعال شده از آب و یخ استفاده گردید.

نمونه‌ها بعد از خنک شدن تا دمای معمولی اتاق با استفاده از سانتریفوژ با سرعت۳۲۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شدند. تمام مراحل هیدرولیز ذکر شده در بالا در هر دوره زمانی هیدرولیز (۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه) در ٤ مرحله متناوب ادامه یافت. بطوری که ماده رسوبی حاصل از هر سانتریفوژ بعنوان ماده اولیه هیدرولیز بعدی با زمان هیدرولیز مشابه استفاده گردید.

اندازه گیری مواد ازته فرار[۲](TVN)

میزان مواد ازته فرار نمونه ها به روش کلدال (AOAC ۱۹۹۲) اندازه گیری گردید و به صورت میلی گرم در ۱۰۰ گرم نمونه گزارش شد.

اندازه گیری پروتئین

مقدار پروتئین نمونه ها به روش لوری (لوری و همکاران ۱۹۵۱) با اندازه گیری شدت جذب در طول موج ۷۵۰ نانومتر به کمک اسپکتروفوتومتر (T 80^{+}, uv/vis Spectrum, British) انجام شد و برای رسم

[2]Total volatile nitrogen

منحنی استاندارد از سرم آلبومین گاوی (Zist-shimi co, Iran، Albumin RGT) استفاده گردید.

اندازه گیری درجه هیدرولیز[3](DH)

درجه هیدرولیز به روش فونک و سینگ (۱۹۹٦) اندازه گیری شد. مبنای این روش اندازه گیری درصد نسبت پروتئین های محلول در تری کلرواستیک اسید (TCA) ۱۰ درصد به کل پروتئین های موجود در نمونه می باشد. برای این منظور ۵ میلی لیتر از نمونه با ۵ میلی لیتر از تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۳۲۰۰ دور بر دقیقه طی ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه گیری و میزان هیدرولیز با استفاده از فرمول ۱ محاسبه شد.

$$DH = \frac{\text{پروتئین حل شده در محلول 10 درصد از TCA}}{\text{کل پروتئین های نمونه}} \times ۱۰۰$$

{فرمول ۱}

اندازه گیری بازیافت نیتروژنی

میزان بازیافت نیتروژنی براساس فرمول۲ محاسبه شد.

بازیافت نیتروژنی = A/B

{فرمول ۲}

A: میزان نیتروژن در پروتئین هیدرولیز شده

B: میزان نیتروژن در نمونه

اندازه گیری طول زنجیره پپتیدی

برای اندازه گیری طول تقریبی پپتیدهای حاصل(PCL)[4] از روش کریستنسن و راسکو (۲۰۰۰a) استفاده شد. در این روش از درجه هیدرولیز برای محاسبه طول زنجیره پپتیدی مطابق فرمول زیر استفاده گردید. در این فرمولDH درجه هیدرولیز پروتئین ها بوده و برحسب درصد بکار می رود.

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

{فرمول ۳}

[3] Degree of hydrolysis
[4] Peptide chain length

آنالیز آماری

برای آنالیز آماری داده ها از روش آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون آماری دانکن در سطح اعتماد ۹۵ درصد استفاده شد. بدین منظور نرم افزارMSTATC نسخه ۱/٤۲ برای آنالیز آماری و از نرم افزار Excel برای رسم شکل ها استفاده شد.

نتایج و بحث

تاثیر شستشو بر میزان مواد ازته فرار گوشت کوسه ماهی چانه سفید

شستشوی گوشت کوسه ماهی با استفاده از آب نمک باعث کاهش مواد ازته از جمله اوره از گوشت می شود (اونادنالوره و شهیدی ۱۹۹٦). در این تحقیق میزان TVN گوشت کوسه چانه سفید ۱۰۵ میلی گرم در ۱۰۰ گرم گوشت اندازه گیری گردید که طی دو مرحله شستشو تا ٦٤ درصد کاهش یافت.

درجه هیدرولیز

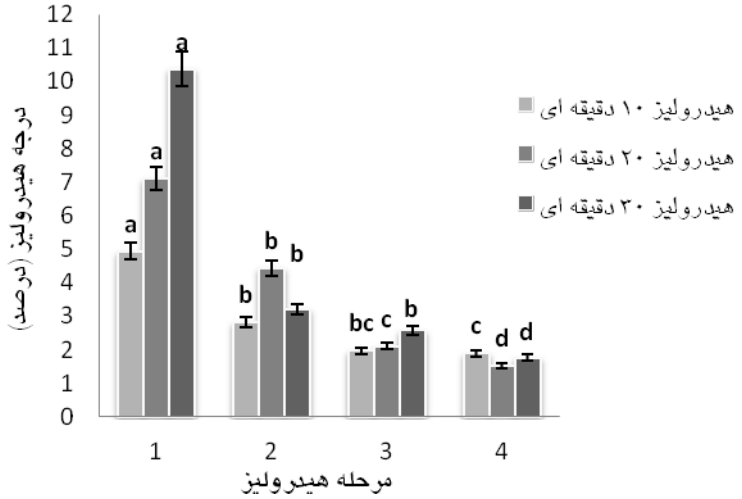
برای بررسی اثر شدت آنزیم و شرایط هیدرولیز بر تولید پروتئین از چند فاکتور استفاده می شود. درجه هیدرولیز یکی از مهمترین فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده است که میزان شکسته شدن باندهای پپتیدی را بیان می‌کند و باید کنترل گردد. این فاکتور و کنترل آن بسیار مهم است، زیرا که بسیاری از خواص پروتئین هیدرولیز شده، از جمله میزان اسیدهای آمینه آزاد، میزان انحلال پذیری و وزن مولکولی پروتئین تولید شده، وابسته به شدت و درجه هیدرولیز می باشد (اویسی پور و همکاران ۱۳۸۹).

با توجه به شکل ۱، با افزایش مراحل هیدرولیز در بازه زمانی ۱۰ دقیقه درجه هیدرولیز کاهش می یابد. آنالیز آماری این داده‌ها نشان داد که بین مرحله اول با سایر مراحل اختلاف معنی داری وجود دارد اما اختلاف بین مرحله دوم با سوم و سوم با چهارم معنیدار نیست.

در هیدرولیز انجام شده در مدت ۲۰و۳۰ دقیقه نیز مشابه با هیدرولیز ۱۰ دقیقه ای درجه هیدرولیز طی

مراحل هیدرولیز کاهش می یابد. در مدت زمان ۲۰ دقیقه بین تمام مراحل هیدرولیز اختلاف معنی دار وجود دارد اما در مدت زمان ۳۰ دقیقه بین مرحله اول با سایر مراحل اختلاف معنی دار بوده ولی اختلاف بین مرحله دوم با سوم معنی دار نیست. با استفاده از محاسبه میانگین درجه هیدرولیز در زمان های هیدرولیز ۱۰،۲۰ و۳۰ مقدار درجه هیدرولیز بترتیب ۲/۹۰ ، ۳/۷۹ و ٤/٤٨ بدست آمد (جدول ۱). در نتیجه می توان گفت با افزایش مدت زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز بصورت معنی داری افزایش می یابد (P<۰/۰۵).

شهیدی و همکاران (۱۹۹۵) پروتئین های ماهی کاپلین (*Mallotus villous*) را تحت تاثیر دو آنزیم آلکالاز و نئوتراز هیدرولیز نمودند. بر اساس نتایج بدست آمده، آنزیم نئوتراز فعالیت کمتری نسبت به آنزیم آلکالاز داشته و برای زمانی که درجه هیدرولیز پایین است ترجیح داده می شود. این محققین همچنین افزایش میزان درجه هیدرولیز در اثر افزایش زمان را اثبات نمودند. لیاست وهمکاران (۲۰۰۰)، ماهی آتلانتیک کاد وآتلانتیک سالمون را تحت تأثیر سه آنزیم نئوتراز، آلکالاز و پپسین به مدت۱۰، ۱۵، ۳۰، ٤٥، ٦٠، ۹۰ و۱۲۰ دقیقه هیدرولیز نمودند و نشان دادند که میزان درجه هیدرولیز با افزایش زمان هیدرولیز زیاد می شود. در بررسی دیگری جرارد و همکاران (۲۰۰۲) نیز اثر آنزیم یومامیزایم را در دمای ٤٥ درجه سانتی گراد در مدت زمان ۲۵۰ دقیقه، روی درجه هیدرولیز پروتئین های امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacores*) مورد مطالعه قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که افزایش زمان باعث افزایش درجه هیدرولیز می گردد. محققینی مثل کریستینسن و راسکو (۲۰۰۰b)، اویسی پور و همکاران (۲۰۱۰) و کائو و همکاران (۲۰۰۸)، نیز نتیجه بدست آمده را تایید نمودند.



شکل ۱- تاثیر افزایش دفعات هیدرولیز بر درجه هیدرولیز. حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی داراست (P<۰/۰۵)

بازیافت نیتروژنی

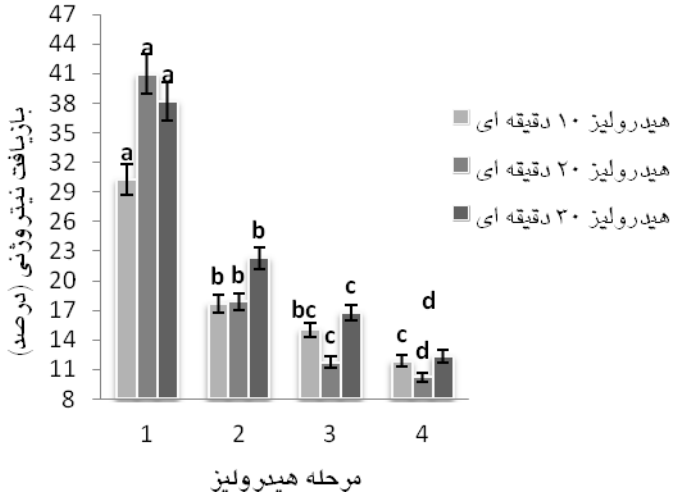
بازیافت نیتروژنی، یکی دیگر از فاکتورهای مهم در بررسی عملکرد آنزیم ها در هیدرولیز پروتئین های غذایی محسوب می شود که بیان کننده توانایی یک آنزیم در جداسازی پروتئین های محلول از انواع غیر محلول، و در نتیجه میزان بازدهی فرایند در طی هیدرولیزاسیون آنزیمی بوده که از جنبه اقتصادی نیز مهم می باشد (اویسی پور و همکاران ۱۳۸۹ و لیاست و همکاران ۲۰۰۰).

در زمان های هیدرولیز ۱۰،۲۰و۳۰ دقیقه با افزایش مراحل هیدرولیز بازیافت نیتروژنی کاهش می یابد (شکل۲). لذا شدت هیدرولیز در مرحله اول هیدرولیز بیشتر بوده و مقدار بیشتری نیتروژن بازیافت می شود. اما هرچه که جلوتر می رویم با کاهش درجه هیدرولیز بازیافت نیتروزنی هم کاهش می یابد.

با توجه به آنالیز آماری انجام شده اختلاف میزان بازیافت نیتروژنی در مدت زمان ۱۰ دقیقه بین مرحله اول با سایر مراحل معنی داری بوده اما اختلاف بین مرحله دوم با سوم و سوم با چهارم معنی دار نیست ($P<۰/۰۵$).

در زمان ۲۰ دقیقه بازیافت نیتروژنی از مرحله اول تا سوم به صورت معنی دار کاهش می یابد اما اختلاف بین مرحله سوم با چهارم معنی دار نیست. در مدت زمان ۳۰ دقیقه میزان بازیافت نیتروژنی از مرحله اول تا چهارم به صورت معنی داری کاهش می یابد. بطور کلی با افزایش زمان هیدرولیز از ۱۰ دقیقه به ۳۰ دقیقه مطابق با جدول ۱، بازیافت نیتروژنی به صورت معنی داری افزایش می یابد ($P<۰/۰۵$).

اویسی پور و همکاران (۲۰۰۹) نشان دادند که با افزایش زمان هیدرولیز آنزیم آلکالاز، مقدار بازیافت نیتروژنی افزایش می یابد. شهیدی و همکاران (۱۹۹۵) میانگین بازیافت نیتروژنی ٪ ۱/۹۲± ۵۱/٦ را برای آنزیم نئوتراز گزارش نمودند. این محققین نشان دادند که بازیافت نیتروژنی آنزیم آلکالاز بالاتر از نئوتراز بوده اما در هر دو مورد بازیافت نیتروژنی با افزایش زمان افزایش می یابد.



شکل ۲- تاثیر افزایش دفعات هیدرولیز بر بازیافت نیتروژنی، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی دار است ($P<۰/۰۵$)

طول زنجیره پپتیدی

با افزایش مراحل هیدرولیز (از مرحله اول به مرحله چهارم) در زمان های هیدرولیز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه طول زنجیره پپتیدی بصورت معنی‌دار افزایش می‌یابد (شکل ۳).

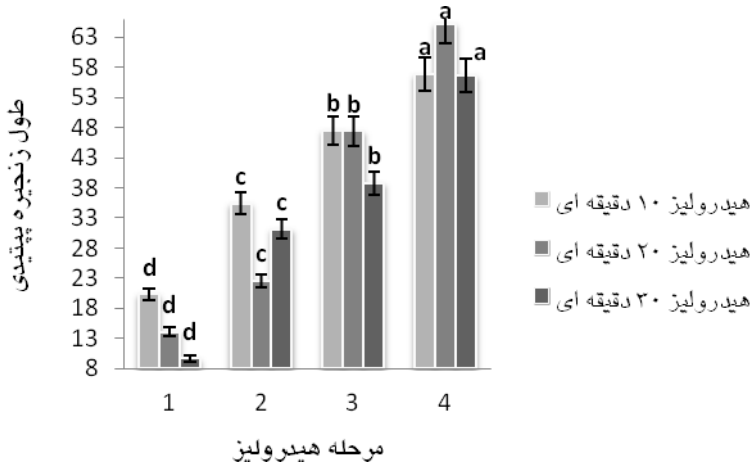
میانگین طول زنجیره پپتیدی در زمان‌های هیدرولیز ۱۰، ۲۰ و ۳۰ دقیقه بترتیب ۵۱/۵٤، ۳۹/٦۸ و ۳۳/۹۸ بدست آمد. لذا می توان نتیجه گرفت با افزایش زمان هیدرولیز و افزایش درجه هیدرولیز طول زنجیره پپتیدی به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد (جدول ۱).

طول زنجیره پپتیدی یا میزان شکسته شدن زنجیره، به میزان و شدت هیدرولیز، شرایط هیدرولیز، غلظت آنزیم و نوع پروتئینی که هیدرولیز می شود بستگی دارد (تاکار و همکاران ۱۹۹۱). در واقع با کنترل طول زنجیره

پپتیدی می توان از هیدرولیز شدید پروتئین جلوگیری کرد، چرا که افزایش شدت هیدرولیز باعث ایجاد پپتیدهای بسیار محلول می شود که خواص کارکردی مطلوبی ندارند (کریستینسن و راسکو a۲۰۰۰).

معتمد زادگان و همکاران (۱۳۸۸) با بررسی اثر آنزیم پاپائین بر میانگین تقریبی طول زنجیره پپتیدی حاصل از هیدرولیز ماهی کیلکا نشان دادند که این صفت تحت تأثیر درجه حرارت قرار ندارد بلکه، تابع درجه دوم فعالیت آنزیم و زمان اثر آن می باشد.

هیدرولیز ضایعات ماهی تن با استفاده از آنزیم آلکالاز توسط جرارد و همکاران (۱۹۹۲) انجام گردید و مشخص شد که وزن مولکولی با افزایش درجه هیدرولیز کاهش می یابد. گبوگوری و همکاران (۲۰۰٤) و سویسی و همکاران (۲۰۰۷) نیز نشان دادند افزایش درجه هیدرولیز باعث کاهش وزن مولکولی شده و درصد پپتیدها با وزن مولکولی کمتر افزایش می یابد.



شکل ۳- تاثیر افزایش دفعات هیدرولیز بر طول زنجیره پپتیدی، حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف آماری معنی-دار است (P<۰/۰۵)

جدول ۱- تاثیر زمان هیدرولیز بر درجه هیدرولیز، بازیافت نیتروژنی و طول زنجیره پپتیدی

زمان هیدرولیز	درجه هیدرولیز (٪)	بازیافت نیتروژنی (٪)	طول زنجیره پپتیدی
۱۰ دقیقه	۲/۹۰ ±۰/۰۸[a]	۷٤/۷۹ ±۰/۸۸[a]	۳٤/٤۲ ± ۰/٦۳[a]
۲۰ دقیقه	۳/۷۹ ±۰/۰۱[b]	۸۰/۷۵ ±۰/۲۸[b]	۲٦/۳۳ ± ۰/٤۷[b]
۳۰ دقیقه	٤/٤۸ ±۰/۰۸[c]	۸۹/٦٤ ±۰/۷۹[c]	۲۲/۳۱±۰/۵۲[c]

اعداد با حروف غیر مشابه در هر ستون دارای اختلاف آماری معنی‌دار می‌باشند (P<۰/۰۵)

نتیجه گیری

در این تحقیق اثر افزایش زمان هیدرولیز در مقدار ثابت نسبت آنزیم به سوبسترا و دمای ثابت بررسی شد. نتایج نشان دادند که با افزایش مدت زمان هیدرولیز، آنزیم و سوبسترا مدت زمان بیشتری در مجاورت هم قرار داشته و شدت هیدرولیز افزایش می یابد. افزایش

شدت هیدرولیز به صورت افزایش میزان درجه هیدرولیز و بازیافت نیتروژنی و به دنبال آن کاهش طول زنجیره پپتیدی قابل مشاهده است. هم چنین با کنترل مرحله ای پروتئین‌های هیدرولیز شده نسبت به روش معمول (هیدرولیز یک مرحله‌ای) بازده استحصال پروتئین افزایش یافته و از هیدرولیز شدید پروتئین ها جلوگیری می‌گردد و احتمالا پروتئین‌هایی با خواص کارکردی مطلوب تر ایجاد می‌گردد.

سپاسگزاری

از مرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان جهت تامین امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می گردد.

منابع مورد استفاده

اویسی پور م، عابدیان کناری ع، معتمدزادگان ع و محمد نظری ر، ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئینهای هیدرولیزشده امعاء و احشاء ماهی تون زرد باله (*Thunnus albacares*) با استفاده ازآنزیم های تجاری، نشریه پژوهش های علوم وصنایع غذایی ایران، جلد ٦، شماره ۱، صفحه‌های ٦٨-٧٦.

معتمدزادگان ع، شهیدی ف، مرتضوی ع، پور آذرنگ ه، حمزه ش، شهیدی یاساقی ا، قربانی حسن سرایی ا، خانی پور ا، ۱۳۸۸. اثرآنزیم پاپائین بر درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین های میوفیبریلار ماهی کیلکا، مجله علوم کشاورزی و منابع طبیعی، جلد شانزدهم، شماره سوم صفحه ۱۷۲.

AOAC, 1992. Official Methods of Analysis. 15th Ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia, USA.

Aspmo SI, Horn SJ and Eijsink VGH, 2005. Enzymatic hydrolysis of Atlantic cod (*Gadus morhua L.)* viscera. Process Biochemistry 40: 1957–1966.

Cao W, Zhang C, Hong P and Ji H, 2008. Response surface methodology for autolysis parameters optimization of shrimp head and amino acids released during autolysis. Food Chemistry 109: 176-183.

Diniz FM and Martin AM, 1997. Effects of the extent of enzymatic hydrolysis on functional properties of shark protein hydrolysate. Lebensmittel-Wissenschaft and Technologie 30: 266-272.

Fonkwe LG, and Singh RK, 1996. Protein recovery from enzymatically deboned turkey residue by enzymic hydrolysis. Process Biochemistry 31: 605.

Gbogouri GA, Linder M, Fanni J and Parmentier M, 2004. Influence of hydrolysis degree on the functional properties of salmon by product hydrolysates. Journal of Food Science 69: 615–622.

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 20: 489–498.

Hall GM and Ahmad NH, 1992. Functional properties of fish protein hydrolysates. Fish Processing Technology 249-265.

Klompong V, Benjakul S, Kantachote D and Shahidi F, 2007. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripe trevally *(Selaroides leptolepis)* as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. Food Chemistry 102: 1317-1327.

Kristinsson HG and Rasco BA, 2000a. Fish protein hydrolysates: Production, biochemical and functional properties. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 40: 43–81.

Kristinsson, HG and Rasco, BA, 2000b. Biochemical and functional properties of Atlantic salmon (*Salmo salar)* muscle proteins hydrolyzed with various alkaline proteases. Agricultural Food Chemistry 48: 657–666.

Liaset B, Lied E and Espe M, 2000. Enzymatic hydrolysis of by-products from the fish-filleting industry; chemical characterization and nutritional evaluation. Journal of the Science of Food and Agriculture 80: 581-589.

Liceaga-Gesualdo AM and Li-Chan ECY, 1999. Functional properties of fish proteinhydrolysate from Herring *(Clupea harengus).* Journal of Food Science 64: 6.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. Journal of Biol Chemistry 193: 265-275.

Onadenalore A, Shahidi F, 1996. Protein dispersions and hydrolysates from Shark *(Isurus oxyrinchus).* Journal of Aquatic Product Technology 5: 43-59.

Ovissipour M, Abedian A, Motamedzadegan A, Rasco B, Safari R and Shahiri H, 2009. The effect of enzymatic hydrolysis time and temperature on the properties of protein hydrolysates fromPersian sturgeon *(Acipenser persicus)* viscera. Journal of Food Chemistry 115: 238-242.

Ovissipour M, Benjakul S, Safari R and Motamedzadegan A, 2010. Fish protein hydrolysates production from yellowfin tuna Thunnus albacares head using Alcalase and Protamex. International Aquatic Research 2: 87-95.

Shahidi F, Han X-Q and Synowiecki J, 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin *(Mallotus villosus)*. Food Chemistry 53: 285- 290.

Souissi N, Bougatef A, Triki-Ellouz Y and Nasri M, 2007. Biochemical and Functional Properties of Sardinella *(Sardinella aurita)* By-Product Hydrolysates. Food Technology 45: 187–194.

Slizyte R, Dauksˇas E, Falch E, Storrø I and Rustad T, 2005. Yield and composition of different fractions obtained after enzymatic hydrolysis of cod *(Gadus morhua)* by-products. Process Biochemistry 40: 1415–1424.

Thakar PN, Patel JR, and Joshi NS, 1991. Protein hydrolysates: a review, Indian Journal Dairy Science 44l: 557.

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

The effect of neutrase on degree of hydrolysis, nitrogen recovery and peptide chain length of white cheek shark meat protein hydrolysate

R Shokrpour Roodbari[1], A Motamedzadegan[*2], S H Hosseiniparvar[2] and M R Ovissipour[3]

Received: February 12, 2012 Accepted: September 23, 2013
[1]MSc Student, Department of Food Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[2]Assistant Professor, Department of Food Science, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
[3]Assistant Professor ,School of Food Science, Washington State University, Washington, USA
[*]Corresponding author: E-mail: amotgan@yahoo.com

Abstract
White cheek shark *(Carcharhinus dussumieri)* is an important species shark fish in Persian Gulf. Because of high urea content in shark meat, there is a weak market for its fillet or other direct products in Iran. In this study, the effect of enzymatic hydrolysis by Neutrase on degree of hydrolysis (DH), nitrogen recovery (NR) and peptide chain length (PCL) of white cheek shark meat has been studied. Enzyme to substrate ratio of 12 AU/Kg proteins at 50°C has been applied for enzymatic hydrolysis. Degree of hydrolysis were determined during 10, 20 and 30 minutes. DH, and NR decreased, but PCL increased in each stage compared with the previous one. However, the mean of DH in the whole process of 10, 20 and 30 minute were 2.90, 3.79, 4.48% for DH, 74.79, 80.75, 89.64% for NR, and 51.54, 39.68, 33.98 for PCL, respectively. However, at longer hydrolysis time, DH, and NR increased, but PCL decreased significantly ($P< 0.05$).

Keywords: Enzymatic hydrolysis, White cheek shark, Peptide chain length, Nitrogen recovery