(مقاله پژوهشی)

بررسی فعالیت ضدمیکروبی و ویژگی‌های پروتئین‌های‌هیدرولیز شده ضایعات ماهی‌طلال با استفاده از آنزیم‌های‌تجاری

کمیل حسنی [۱]، پیمان آریایی [۲*]، محمد احمدی [۳]

۱- دانشجوی دکتری،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.

۳- استادیار،گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت ا... آملی، دانشگاه آزاد اسلامی،آمل، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۲۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۱۴

چکیده

در این پژوهش پروتئین هیدرولیز شده ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*) با استفاده از دو آنزیم آلکالاز و فلاورزایم و در زمان‌های مختلف هیدرولیز (۱۰، ۲۰ و۳۰ دقیقه) تولید و سپس خاصیت ضدمیکروبی آن علیه باکتری گرم منفی *اشریشیاکلی* و گرم مثبت *استافیلوکوکوس اورئوس* بررسی شد. نتایج نشان داد که بیشترین مقادیر بازیافت نیتروژنی (۸۹/۸۸درصد) و درجه هیدرولیز(۳۸/۷۰درصد) توسط آنزیم‌آلکالاز و در زمان ۳۰ دقیقه هیدرولیز مشاهده شد (P <۰/۰۵). ترکیب اسیدهای آمینه نیز نشان‌دادکه پروتئین‌های هیدرولیزشده با هر دو آنزیم دارای ترکیب نسبتا مشابهی هستند. بیشترین مقادیر اسید آمینه ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، به ترتیب لیزین با ۷/۹۹، ۷/۱۹ درصد و آرژنین با ۷/۵۵ و ۸/۲۱ درصد بوده است، بیشترین مقادیر اسید آمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم، گلوتامیک اسید با ۱۲/۵۵، ۱۱/۷۹درصد و پس از آن اسید آمینه آسپارتیک اسید به ترتیب با ۷/۹۹، ۶/۹۸ درصد بوده است. شاخص شیمیایی نشان داد که هر دو پروتئین هیدرولیز شده، به خوبی می‌توانند نیازیک انسان بالغ به اکثر اسیدهای آمینه را مرتفع سازند. بیشترین فعالیت ضد میکروبی در پروتئین هیدرولیز شده تولیدی توسط آنزیم‌آلکالازمشاهده شد (P<۰/۰۵). همچنین باکتری *استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت پایین‌تری را نسبت به باکتری *اشریشیاکلی* دارا بود. در مجموع به نظر می‌رسد که پروتئین هیدرولیز شده طلال می‌تواند به عنوان مکمل‌های پروتئینی در مواد غذایی و در فرمول‌های رژیم غذایی، به عنوان ضد میکروب طبیعی استفاده شود.

واژه های کلیدی: ماهی طلال، هیدرولیز آنزیمی، ارزش غذایی، *اشریشیاکلی*، *استافیلوکوکوس اورئوس*

* مسئول مکاتبات: p.aryaye@yahoo.com:

۱- مقدمه

اقیانوس‌ها بیش از ۷۰ درصداز زمین را اشغال کرده‌اند و یک منبع‌طبیعی‌غنی‌از ترکیبات زیست فعال، شامل ماهی، صدف، نرم تنان، سخت پوستان و اکینودرم‌ها هستند که به طور قابل توجهی‌در توسعه اقتصادی و تحقیقاتی نقش دارند (۳، ۲۲). موجودات‌دریایی‌تقریباً نیمی از تنوع زیستی جهان را تشکیل می‌دهند که به عنوان منبع ارزشمند مواد مغذی و ترکیبات عملکردی شناخته شده‌اند و دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت ضدمیکروبی، فعالیت ضد سرطانی، فعالیت ضد فشار خون، فعالیت ضدالتهابی و... می‌باشند(۷). ماهی طلال (*Rastrelliger kanagurta*) ساکن آب های کم عمق به ویژه ساحلی بوده، از جمله ماهیان استخوانی با ارزش، متعلق به خانواده تن ماهیان است و از گسترده‌ترین گونه‌ها در سراسر جهان می‌باشد. این ماهی یک گونه اپی پلازیک بوده و غذای بسیاری ازآبزیان است. این‌ماهی جز گونه‌هایی است که در سراسر خلیج فارس و دریای عمان پراکنده می‌باشد (۹). که با توجه به اندازه کوچک، قیمت مناسب آن به نظر می‌رسد برای فرآوری مناسب باشد. به طور کلی، پپتیدهای فعال اغلب دارای ۳ تا ۲۰ بقایای اسید آمینه هستند و فعالیت‌های بیولوژیکی‌آن‌ها براساس ترکیب و ترتیب اسیدآمینه‌آن‌ها است. اخیراً توجه زیادی به آشکارسازی خصوصیات ساختاری، ترکیبی و توالی پپتیدهای‌زیست فعال شده است (۱۵، ۲۲). هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها یکی از روش‌های بهبود خصوصیات پروتئین هاست. خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده با درجه هیدرولیز و ساختار پپتیدهای تولیدشده تعیین می‌شود و این موارد بستگی به ویژگی پروتئین و خصوصاً نوع آنزیم به کار رفته و شرایط هیدرولیز به‌ویژه دما و pH دارد. فرآیند کاربرد آنزیم‌های تجاری به جای فرآیندهای شیمیایی و یا آنزیم‌های با منشاء داخلی دارای‌مزایای‌بسیارزیادی‌است‌زیراکل فرآیند هیدرولیزاسیون کاملا تحت کنترل است در نتیجه محصول و فرآورده‌های با خواص مشخص تولید می‌شود (۱۹). آنزیم‌های مورد استفاده در فرآیند هیدرولیز شامل بافت‌های گیاهی(به عنوان مثال، فیسین ، پاپائین، بروملین)، بافت‌های حیوانی (به عنوان مثال، پپسین، کیموتریپسین، تریپسین) و سلول‌های میکروبی (مانندپروتئیناز K، پروناز، کلاژناز، سابتیلیسین A، آلکالاز، فلاورزایم و نئوتراز) می‌باشد (۸، ۲۳). مهمترین آنزیم‌های که طی تحقیقات مختلف مورد استفاده قرار گرفته است شامل آنزیم آلکلاز و فلاورزایم می باشد، آنزیم آلکالاز، یک آنزیم مایع به رنگ قهوه‌ای تیره است‌که از باکتری *باسیلوس لیکنی فورمیس*[1] جداسازی می‌شود. در حالی که آنزیم فلاورزایم که یک آنزیم مایع به رنگ قهوه‌ای تیره است دارای فعالیت اگزوپپتیدازی و میزان فعالیت ۱/۵ آنسون به ازای هر میلی لیتر می باشد که از میکروارگانیزم *آسپرژیلوس اورایزا*[2] جداسازی‌می‌شود (۲۱،۱۳). خصوصیات پروتئین‌هیدرولیز شده و کاربردهای آن ها در تحقیقات و شاخه های متفاوت از صنعت مورد بررسی قرار گرفته است پروتئین‌های هیدرولیز شده ویژگی‌های کاربردی خاصی را نشان می‌دهندکه‌استفاده آن‌ها را به عنوان منبعی‌قابل دسترس از پروتئین‌ها برای انسان‌ها و حیوانات ممکن می‌سازد. همچنین در بسیاری از مطالعات به خاصیت ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد سرطانی پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات ماهی نیز اشاره شده است (۱۷، ۲۴، ۲۵). بنابراین با توجه به خواص ضد میکروبی، پروتئین‌های هیدرولیز شده از منابع دریایی هدف از مطالعه حاضر، استفاده بهینه از ضایعات ماهی ماهی طلال در جهت تولید فرآورده با ارزش افزوده و بررسی فعالیت ضد میکروبی پروتئین هیدرولیز شده ماهی طلال می‌باشد.

۲-مواد و روش ها

۲-۱-مواد اولیه

ماهی طلال با میانگین وزنی ۳۵±۱۷۰گرم، از اسکله صیادی شهیدحقانی‌بندرعباس تهیه شد و با ظروف یونولیتی و رعایت شرایط صحیح به آزمایشگاه پژوهشکده اکولوژی دریای خزر انتقال داده شد و بلافاصله پس از تخلیه شکمی، پوست و سر ماهی جدا گردید. پوست و سر ماهی با دستگاه

1 -*Bacillus licheniformis*
2 -*oryzae Aspergillus*

چرخ گوشت صنعتی‌کاملاً چرخ شد. سپس مقداری از نمونه‌ها چرخ شده و به منظور تعیین میزان پروتئین نمونه اولیه با استفاده از روش AOAC (۲۰۰۵) برداشته شد (۱). و مابقی در بسته های پلاستیکی بصورت ۵۰ گرمی بسته بندی گردید و در دمای ۲۰- درجه‌سانتی‌گراد منجمد شده و تا شروع آزمایش در همین حالت نگهداری شدند. برای انجام آزمایش نمونه‌ها در یخچال با دمای ۴ درجه‌سانتی‌گراد به مدت یک شبانه روز انجماد زدایی گردید. آنزیم آلکالاز (استخراج‌شده‌از*Bacillus licheniformis*) با کد p4860 (میزان فعالیت ۲/۴ آنسون) و فلاورزایم (استخراج شده از *Aspergillus oryzae*) با کد۲۳۳-۷۵۲-۲ (میزان فعالیت ۱/۵ آنسون) از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد از شرکت نووازیم، دانمارک تهیه شد و تا زمان مصرف در درجه حرارت ۴ درجه‌سانتی‌گراد نگهداری شد. تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش از شرکت مرک آلمان تهیه و از درجهٔ آزمایشگاهی برخوردار می‌باشند.

۲-۲-تولید پروتئین هیدرولیز شده

۵۰ گرم نمونه، درون ارلن مایر ۲۵۰ میلی لیتری ریخته شد و سپس میزان ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر به نسبت (۲:۱) به ارلن مایر اضافه گردید و با همزن دیجیتالی به مدت ۲ دقیقه هموژنیزه شد. سپس به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با درجه حرارت ۸۵ درجه‌سانتی‌گراد به منظور غیرفعال‌سازی آنزیم-های داخلی قرار داده شد. سپس با اضافه کردن هیدروکسید سدیم ۰/۲ نرمال به pH بهینه فعالیت آنزیم‌ها (آلکلاز ۸/۵، فلاورزایم ۷)، رسانده شد. نمونه‌ها در حمام آبی متحرک دردمای۵۰ درجه‌سانتی‌گراد برای تولید پروتئین هیدرولیز شده با دور ثابت۲۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس آنزیم (۱ درصد میزان پروتئین نمونه اولیه) به آن اضافه شد و پس از هر بار نمونه گیری (زمان ۱۰ و ۲۰ دقیقه) و در پایان آزمایش (زمان۳۰ دقیقه) به منظور قطع واکنش آنزیمی در حمام آبی به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد قرار داده شدند. پروتئین‌های هیدرولیز شده پس از خنک شدن با استفاده از سانتریفیوژ با دور ثابت۶۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، مایع شناور جمع آوری گردید و پروتئین هیدرولیز شده در فریزر نگهداری شد و سپس با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی بصورت پودر در آمد (۱۱).

۲-۳- درجه هیدرولیز

میزان هیدرولیز به کمک تری‌کلرواستیک اسید (TCA) اندازه‌گیری شد. مبنای این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در تری کلرواستیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور ۵ میلی‌لیتر از نمونه با ۵ میلی‌لیتر تری کلرواستیک اسید ۲۰ درصد مخلوط گردید و سپس با دور ۶۷۰۰ rpm و زمان ۱۰دقیقه سانتریفیوژ شد. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول اندازه‌گیری و میزان هیدرولیز از طریق فرمول ۱ محاسبه گردید (۱۱):

فرمول ۱:

(میزان پروتئین حل شده در محلول تری کلرو استیک اسید ۱۰درصد / میزان پروتئین در نمونه)= درجه هیدرولیز

۲-٤- میزان بازیافت پروتئینی

میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت نمونه محلول به روش بیورت‌تعیین‌شد. به همین منظور برای رسم نمودار استاندارد از پروتئین‌آلبومین سرم گاوی استفاده شد. شدت جذب نور در طول موج۵۴۰ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر مدل T80 ساخت‌کشورانگلستان قرائت شد. میزان بازیافت پروتئینی از از طریق فرمول ۲ محاسبه گردید (۱۴).

فرمول ۲:

۱۰۰× (میزان پروتئین موجود در نمونه /میزان پروتئین محلول موجود در پروتئین هیدرولیزشده) = بازیافت پروتئینی

۲-۵- ترکیب اسید آمینه

پودر پروتئین هیدرولیز شده برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۱۱۰درجه‌سانتی‌گراد با استفاده از هیدروکلریک ۶ نرمال هیدرولیز کامل شد. سپس با استفاده از فنیل ایزو تیوسیانات (PITC) عمل مشتق‌سازی اسیدهای آمینه انجام شد. میزان اسیدهای‌آمینه‌کل‌با استفاده از دستگاه HPLC مدل Smart line(آلمان) با استفاده ازستون C18 با آشکارساز فلورسنت (RF-530) (واقع درمرکز رشد واحدهای فناوری طبرستان) انجام شد (۶).

۲-٦ -شاخص شیمیای پروتئین

شاخص شیمیایی پروتئین‌های هیدرولیز شده بر طبق روش Ovissipour و همکاران (۲۰۱۲) به طور خلاصه بر طبق فرمول(۳) محاسبه‌گردید (۱۴). براساس این روش، اسیدهای آمینه‌ای مورد بررسی قرار گرفتند که احتمال کمبود آنها در اکثر رژیم‌های غذایی انسان بیشتر است.

فرمول ۳:

۱۰۰ × اسید آمینه ضروری در پروتئین استاندارد / اسید آمینه ضروری در پروتئین نمونه = شاخص شیمیایی

۲-۷- بررسی فعالیت ضد میکروبی

میکروارگانیسم‌های مورد استفاده در این تحقیق عبارتند از: *اشریشیاکلی* PTCC:۱۳۹۹ و *استافیلوکوکوس اورئوس* PTCC:۱۱۱۲که‌از مرکز تحقیقات و پژوهش علمی صنعتی ایران تهیه شد. جهت ارزیابی فعالیت ضد میکروبی، ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش ها، تلقیح از کشت ذخیره به محیط‌کشت‌شیب‌دارمولرهینتون‌آگارانجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر، پس از رشد باکتری بر سطح شیب‌دار آگار تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۲۵ نانومتراندازه‌گیری شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت استاندارد ۰/۵ مک فارلند، توسط محلول رینگر رقیق گردید. در این حالت تعداد سویه های میکروبی جهت‌ارزیابی‌آزمون های ضد میکروبی برابر با $۱۰^{۸}$ CFU× ۱/۵ بود. جهت تهیه دیسک‌های مورد آزمایش، هر دیسک با ۱۵ µL از پپتید ها با غلظت‌های مختلف (۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) اشباع شد. در این آزمایشات از محیط‌کشت مولر هیلتون آگار حاوی سوسپانسیون میکروبی استفاده گردید. بعد از عمل دیسک گذاری محیط کشت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. بعد از طی این مدت زمان قطر هاله‌های تشکیل شده در اطراف دیسک ها، به وسیله خط کش اندازه گیری شد (۴).

۲-۸- تجزیه و تحلیل آماری

طرح‌آماری مورد استفاده دراین‌پژوهش طرح‌کاملاً تصادفی و شامل سه تکرار برای هر تیمار بوده است (در ارتباط با آزمون‌های پروتئین هیدرولیزشده تنها متغییر مورد بررسی، زمان هیدرولیز بود، زمان‌های مختلف هیدرولیز به‌طور جداگانه با ۳ تکرار انجام شد). آنالیز آماری تیمارها توسط جدول آنالیز واریانس (ANOVA) با استفاده ازنرم افزار (SPSS version 18) صورت گرفت. برای بیان تفاوت معنی‌داری میانگین‌ها از آزمون دانکن درسطح ۰/۰۵ استفاده شد و نمودارها با نرم افزار Microsoft Excel ترسیم شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- درجه هیدرولیز

درجه هیدرولیز به عنوان یک پارامتر ناظر بر میزان هیدرولیز پروتئین مورد استفاده قرار می‌گیرد، این فاکتور بیشتر به عنوان‌یک شاخص جهت مقایسه میان پروتئین‌های هیدرولیز شده‌ی مختلف کاربرد دارد. از طرفی درجه هیدرولیز یکی از مهمترین‌فاکتورهای بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده است که میزان شکسته شدن پیوندهای پپتیدی را بیان می‌کند و بایدکنترل‌گردد (۲۱). نتایج این تحقیق نشان‌دهنده

این نکته است که کارایی هیدرولیز آنزیمی بسته به شرایط فرآیند، نوع‌آنزیم و زمان هیدرولیز متفاوت است. به‌طوری که با افزایش زمان هیدرولیز مقادیر درجه هیدرولیز (جدول ۱) به طورمعنی‌داری افزایش یافت ($p<۰/۰۵$). بر اساس نتایج به‌دست‌آمده ازاثرزمان بر هیدرولیز پروتئین، با افزایش زمان‌واکنش، هیدرولیزآنزیمی با یک فازسریع‌آغازمی‌شود ودراین‌مرحله‌تعداد بسیارزیادی‌از پیوندهای پپتیدی شکسته می‌شود.افزایش زمان فرآیند موجب طولانی‌تر شدن فعالیت آنزیم و اثر آن بر سوبسترا می‌گردد.همچنین درجه هیدرولیز توسط آلکالاز بیشتر از فلاورزایم بوده است($p<۰/۰۵$).این نتایج با نتایج سایر محققین هم‌خوانی دارد، آنها نیز اعلام نمودند که درجه هیدرولیز پروتیئن هیدرولیز شده توسط آنزیم آلکالاز بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود (۱۱، ۲۱، ۲۴).

جدول۱- مقادیر درجه هیدرولیز پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

زمان هیدرولیز	آنزیم	
	فلاورزایم	آلکالاز
۱۰	۱۷/۷۲±۰/۷۲^{Bc}	۲۲/۳۹±۱/۳٤^{Ac}
۲۰	۲٤/۲۸±۰/۷۰^{Bb}	۳۰/۰۸±۱/۰۵^{Ab}
۳۰	۳۰/٤۰±۰/۵۳^{Ba}	۳۸/۷۰±۰/۷۵^{Aa}

[۱]همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

[۲]اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

[۳] اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۲- بررسی مقادیر بازیافت پروتئینی

مقادیر پروتئین ابتدایی در ماهی طلال ۱۹/۲۲٪ بوده است. نتایج مربوط به بازیافت پروتئینی (جدول ۲) و درجه هیدرولیز در مطالعه حاضر باهم، هم خوانی دارد. به طوریکه با افزایش درجه هیدرولیز، میزان بازیافت پروتئینی نیز به طور معنی داری افزایش پیدا می کند ($p<۰/۰۵$). به طوری که بازیافت پروتئینی توسط آلکالاز بیشتر از سایر تیمارها بوده است و توسط آنزیم فلاورزایم کمتر از سایر تیمارها بود.آنزیم‌آلکالازیک‌آنزیم‌پروتئاز قلیایی Endoproteinase می‌باشد که دارای منشاء میکروبی بوده و به همین جهت، خواص مناسب پروتئازی را از خود نشان می‌دهد (۲۰). نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است، آنها نیز گزارش نمودند با افزایش زمان هیدرولیز، مقادیر بازیافت پروتئینی‌افزایش‌یافت‌وهمچنین‌آنزیم‌آلکالاز آنزیم موثرتری نسبت به سایر آنزیم ها بود (۱۱، ۲۱).

جدول۲- مقادیر بازیافت پروتئینی، پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم‌های مختلف

زمان هیدرولیز	آنزیم	
	فلاورزایم	آلکالاز
۱۰	٤٤/۲۹±۱/۰۹^{Bc}	٦۰/٤۳±۰/۵۵^{Ac}
۲۰	٦٤/۵۸±۱/۰۰^{Bb}	۷۰/۳۸±۱/٤٤^{Ab}
۳۰	۸۳/۳۰±۰/۳۳^{Ba}	۸۹/۸۸±۱/۱٦^{Aa}

[۱]همه اعداد بر حسب درصد بیان شده است (میانگین ± انحراف از معیار)

[۲]اعداد در یک ردیف با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(A, B)

[۳] اعداد در یک ستون با حروف متفاوت اختلاف معنی دار دارند.(a, b, c,..)

۳-۳-ترکیب اسیدآمینه

مطالعه‌ترکیب‌اسیدهای‌آمینه‌موادمغذی‌مانندپروتئین‌هیدرولیز شده برای درک ارزش غذایی، خواص عملکردی و خواص آنتی‌اکسیدانی‌آن‌هاضروری است. خواصی بیواکتیو پروتئین و پپتید هیدرولیز شده به شدت تحت تأثیر پروفایل اسید آمینه‌می‌باشد. درمجموع بیشترین مقادیر اسید آمینه ضروری (جدول۳) برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم لایزین به ترتیب ۷/۹۹، ۷/۱۹درصد و آرژنین ۷/۵۵ و ۸/۲۱درصد بوده است، بیشترین مقادیر اسیدآمینه غیر ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم‌گلوتامیک اسید ۱۲/۵۵، ۱۱/۷۹درصد و پس از آن اسید آمینه آسپارتیک اسید به ترتیب ۷/۹۹، ۶/۹۸درصد بوده است. گلوتامات فراوانترین اسیدهای آمینه متابولیزه در بدن است، علاوه بر مقادیر بالای اسید گلوتامیک موجود در ماهی تازه در اثر از بین بردن اسید آمینه گلوتامین به اسید گلوتامیک تبدیل می‌شود (۱۶). نتایج مشابهی توسط Nurjanah و همکاران (۲۰۱۵) در ارتباط با ماهی طلال هندی گزارش شد، آن ها نیز گزارش نمودند، بیشترین اسید آمینه ضروری برای آنزیم آلکالاز و فلاورزایم لایزین ۶/۲۹درصد، اسید آمینه غیر ضروری را گلوتامیک اسید ۱۰/۸۸درصد و پس از آن اسید آمینه آسپارتیک اسید ۶/۹۷درصدگزارش نمودند (۱۲). با توجه به FAO/WHO (1990) نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه‌ها نباید کمتراز ۴۰درصد باشد و همچنین میزان اسید آمینه ضروری به غیرضروری نباید کمتر از ۰/۶ باشد. با توجه به نتایج پروتئین‌هیدرولیزشده از ترکیب اسید آمینه مناسبی برخوردار است. نسبت اسید آمینه ضروری به غیر ضروری آلکالاز و فلاورزایم به ترتیب برابر با ۱/۰۲ و ۱/۱۲ است و میزان اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه موجود به ترتیب برابر با ۵۰/۴۶و۵۲/۹۵ است (۵). مقادیر ترئونین، والین، ایزولوسین، لوسین، تیروزین، هیستیدین و لایزین در هر دو پروتئین‌هیدرولیزشده‌نیز بالاتر از توصیه های FAO/WHO (1990) در مورد پروتئین های حیوانی یافت شد (۵). (جدول ۲)، نشان می دهد که پروتئین‌های ماهی طلال از کیفیت غذایی بالایی برخوردار هستند و ممکن است به عنوان یک منبع پروتئین در رژیم غذایی انسان مورد استفاده قرار گیرند. اسیدهای آمینه، رادیکال های آزاد را با اهدای پروتون خنثی می‌کنند، رادیکال های آزاد محلول در چربی (رادیکال های پراکسیل) که در سراسر اکسیداسیون اسیدهای چرب اشباع نشده تولید می‌شوند. توسط اسیدهای آمینه آبگریز مانند لوسین، والین، آلانین و پرولین خنثی می‌شوند (۱۷). بنابراین، می‌توان ادعا کرد که پروتئین‌های هیدرولیز شده به دلیل وجود اسیدهای آمینه مختلف ممکن است اثرات مهاری بر روی چندین نوع رادیکال آزاد داشته باشند.

جدول۳-ترکیب اسید آمینه موجود در پروتئین هیدرولیز شده

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	آلکالاز	فلاورزایم	FAO/ WHO, 1990
هیستدین[1]	۳/۵۵	۳/۲۹	
ایزو لوسین[1]	٤/۰۵	۵/۰۵	۲/۸۰
لوسین[1]	۷/۳۵	٦/۹۹	٦/٦۰
لیزین[1]	۷/۹۹	۷/۱۹	۵/۸۰
متیونین[1]	۳/۱۵	۳/۰۵	
فنیل آلانین[1]	٤/۲۵	٤/۱۵	٦/۳۰
تروئنین[1]	۳/۹۵	٤/۱۵	۳/٤
والین[1]	۵/۲۵	۵/٤۵	۳/۵
آرژنین[1]	۷/۵۵	۸/۲۱	
آسپارتیک اسید	۷/۹۹	٦/۹۸	
پرولین	۵/۲۹	٤/۹۹	
سرین	٤/۵۹	٤/٦۹	
آلانین	٤/۹۸	٤/۲۵	
سیستئین	۰/۹۵	۰/۹۹	
گلوتامیک اسید	۱۲/۵۵	۱۱/۷۹	
تیروزین	۳/۵۵	۳/۲۸	۱/۱
گلایسین	۵/۹۹	۵/۲۵	
نسبت اسید آمینه ضروری به کل اسید آمینه	۵۰/٤٦	۵۲/۹۵	
نسبت اسید آمینه ضروری به اسید آمینه غیرضروری	۱/۰۲	۱/۱۲	
میزان اسید آمینه کل	۹۲/۹۸	۸۹/۷۵	

[1]اسیدآمینه ضروری

۳-٤-شاخص های شیمیایی

نتایج مربوط به شاخص شیمیایی نشان داد (جدول ۴)، همه پروتئین‌های هیدرولیز شده نیازهای یک انسان بالغ را برطرف می‌کند اما اسیدهای آمینه لایزین و متیونین محدود کننده محسوب شدند. این در حالی است که نتایج مربوط به پروتئین های هیدرولیز شده در مقایسه با نیازهای ماهی‌کپور ذراکثر اسیدهای آمینه محدودیت نشان دادند. Nemati و همکاران (۲۰۱۲) اعلام نمودند همه پروتئین های هیدرولیز شده نیازهای‌یک انسان بالغ را برطرف می‌کند. این در حالی است که نتایج مربوط به پروتئین های هیدرولیز شده در مقایسه با نیازهای‌ماهی‌کپورنشان می‌دهد که اسید آمینه های متیونین، لایزین، فنیل‌آلانین و تروئنین، اسید آمینه محدود کننده محسوب می‌شوند و مهمترین‌اسیدآمینه محدود کننده در تحقیق آنها اسید آمینه فنیل آلانین بود (۱۱).

جدول ٤- شاخص های شیمیایی در پروتئین‌های هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم آلکالاز و فلاورزایم

اسید آمینه (گرم در ۱۰۰ گرم نمونه)	پروتئین مرجع[1]	آلکالاز	فلاورزایم	پروتئین مرجع[2]	آلکالاز	فلاورزایم
هیستدین	۱/٦	۲/۲۱	۲/۰٥	۱/۲	۲/۹٥	۲/۷٤
ایزو لوسین	۱/۳	۳/۱۱	۳/۸۸	۲/٥	۱/٦۲	۲/۰۲
لوسین	۱/۹	۳/۸٦	۳/٦۷	۳/۳	۲/۲۲	۲/۱۱
لیزین	۱/٦	٤/۹۹	٤/۹۳	٥/۷	۱/٤۰	۱/۲٦
متیونین	۱/۷	۱/۸۲	۱/۷۹	۳/۱	۱/۰۱	۰/۹۸
فنیل آلانین	–	–	–	٦/٥	۰/٦٥	۰/٦۳
تروئنین	۰/۹	٤/۳۸	٤/٦۱	۳/۹	۱/۰۱	۱/۰٦
آرژنین	–	–	–	۱/۳۱	٥/۷٦	٦/۲٦
والین	۱/۳	٤/۰۳	٤/۱۹	۳/٦	۱/٤٥	۱/٥۱

[1] پروتئین مرجع، بر اساس نیاز انسان به اسیدهای آمینه (FAO/WHO,1990)

[2] پروتئین مرجع، بر اساس نیاز ماهی کپور به اسیدهای آمینه (NRC, 1993)

۳-٥- بررسی خاصیت ضد میکروبی

بی‌تردید صنایع غذایی یکی از مهم‌ترین صنایع موجود در ایران و جهان است که تولید محصولات غذایی با رویکرد افزایش ایمنی و ارزش غذایی برای حفظ سلامت جامعه یکی از راهبردهای مهم این صنایع می باشد که علاوه بر رفع گرسنگی باعث افزایش عمر و ارتقاء سلامت می شود. در سال‌های اخیر مطالعات فراوانی پیرامون استفاده از نگهدارنده های طبیعی در صنایع غذایی صورت گرفته است از جمله این ترکیبات ضدمیکروبی، پروتئین‌های هیدرولیز شده می‌باشد (۲۴). با توجه به نتایج (جدول ۵ و جدول ۶) با خاصیت ضد باکتریایی آنزیم آلکلاز بالاتر از آنزیم فلاورزایم بود و با افزایش زمان هیدرولیز فعالیت ضد میکروبی افزایش یافت. درجه هیدرولیز، میزان باندهای پپتیدی شکسته شده در یک سوبسترای پروتئینی توسط عامل پروتئولیتیک را نشان می‌دهد. فعالیت بیولوژیکی پپتیدهای‌آزاد شده از پروتئین‌ها به سوبسترای پروتئینی، ویژه‌گزینی‌آنزیم هیدرولیزکننده، ساختار مولکولی و اندازه پپتیدها و شرایط هیدرولیز بستگی دارد که اغلب این فاکتورها خود تابع‌درجه هیدرولیزاند (۱۰). با توجه به نتایج باکتری‌گرم‌مثبت*استافیلوکوکوس اورئوس* مقاومت پایینتری را دارا بود. گزارشات متعدد بیان نموده‌اند که باکتری‌های گرم مثبت نسبت به باکتری‌های گرم منفی در برابر ترکیبات‌ضدباکتریایی‌حساس‌ترهستند و این حساسیت بالای باکتری‌های‌گرم مثبت به دلیل عدم وجود دیواره سلولی لیپوپلی ساکاریدی است که این دیواره در باکتری‌های گرم منفی ممکن است از ورود ترکیبات فعال به غشای سیتوپلاسمی‌جلوگیری به عمل آورد (۲). اولین مانع برای پپتیدهای‌ضدمیکروبی‌در ارتباط با باکتری‌گرم منفی، غشای لیپو پلی‌ساکارید می‌باشد، پس از زوال این غشا، فعالیت پپتید به توانایی‌آن در تعامل با غشای سیتوپلاسمی بستگی دارد. توالی اسیدهای آمینه و غلظت پپتید و همچنین ترکیب غشا باکتری ها، بر مکانیسم ضد میکروبی تأثیر می‌گذارد

(۲). Da Rocha،(۲۰۱۸) نیزاعلام نمودند پروتئین هیدرولیز شده ماهی شوریده اطلسی (*Umbrina canosai*) دارای فعالیت ضد میکروبی می‌باشد و فعالیت ضد میکروبی علیه باکتری‌گرم مثبت بالاتر بوده(۲) و همچنین فعالیت ضد میکروبی‌توسط‌آنزیم‌آلکالازبالانر از پروتامکس بود.عواملی مانندآبگریزی،pH قدرت‌یونی، درجه حرارت، سورفکتانت ها، منشاء پپتید، ترکیبات اسیدآمینه، بار پپتید، اندازه و ساختار ثانویه پپتید میتوانند فعالیت ضد میکروبی را تحت تاثیر قرار دهند (۱۸).

جدول۵-قطر هاله عدم رشد پروتئین هیدرولیز شده برای باکتری *استافیلوکوکوس اروئوس*

زمان هیدرولیز	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	++	-
۲۰	+++	++
۳۰	+++	+++

+++>18 mm ،++=13-18 mm ،+=7-13 mm ،-<7mm

جدول٦- قطر هاله عدم رشد پروتئین هیدرولیز شده برای باکتری *اشرشیاکلی*

زمان هیدرولیز	آلکالاز	فلاورزایم
۱۰	-	-
۲۰	++	-
۳۰	+++	++

+++>18 mm ،++=13-18 mm ،+=7-13 mm ،-<7mm

٤- نتیجه‌گیری

پپتیدهای‌زیست فعال، پپتیدهایی‌هستند که به صورت ابتدایی غیرفعال بوده ولی در هنگام هضم‌گوارشی توسط آنزیم‌های مربوطه هیدرولیزشده و اثرات زیادی از جمله: ضد فشار خون، ضد انعقاد خون، ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی در بدن ایجاد می‌کنند. هدف از مطالعه حاضر، استفاده بهینه از ضایعات ماهی طلال در جهت تولید فرآورده با ارزش افزوده بوده است و نتایج مربوط به مطالعه حاضر نشان داد نشان داد پروتئین هیدرولیز شده ضایعات ماهی طلال توسط آنزیم‌آلکالاز وزمان‌هیدرولیز ۳۰دقیقه، دارای بیشترین مقادیر دجه هیدرولیز و بازیافت پروتئینی و خاصیت ضد میکروبی رادارابوده‌است، بنابراین می‌توان ازاین پروتئین‌های هیدرولیز شده در صنایع‌غذایی و دارویی به عنوان ضدمیکروب طبیعی استفاده نمود.

٥- منابع

1. AOAC. 2005. Official Method of Analgsis (17th ed). Washington, DC: Association of Official Analytical chemists.
2. Da Rocha, M., Ailén Alemán, A., Carlos Prentice, E. 2018. Effects of agar films incorporated with fish protein hydrolysate or clove essential oil on flounder (*Paralichthys orbignyanus*) fillets shelf-life. *Food hydrocolloids*, 81:351-363.
3. Destoumieux-Garzo´n, D., Rosa, R. D., Schmitt, P., Barreto, C., Vidal-Dupiol, J., Mitta, G,. Gueguen, Y,.

11. Nemati, M., Javadian, S. R., Ovissipour, M., Keshavarz, M. 2012. A study on the properties of alosa (*Alosa caspia*) by-products protein hydrolysates using commercial enzymes. *World Applied Sciences Journal,* 18 (7): 950-956.
12. Nurjanah, N., Nurilmala, M., Hidayat, F., Gia Ginanjar, M. 2015. Amino Acid and Taurine Changes of Indian Mackarel Due to Frying Process. I*nternational Journal of Chemical and Biomolecular Science*, 1(3): 163-166.
13. Ovissipour, M., Rasco, B., Shiroodi, S. G., Modanlow, M., Gholami, S., Nemati, M. 2013. Antioxidant activity of protein hydrolysates from whole anchovy sprat (*Clupeonella engrauliformis)* prepared using endogenous enzymes and commercial proteases. *Food Sci Agric*, 93: 1718–1726.
14. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., Shabanpour, B. 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, 5 (2): 460-465.
15. Pihlanto-Leppala, A. 2000. Bioactive peptides derived from bovine whey proteins: opioid and ace-inhibitory peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 10: 347–356.
16. Purwaningsih, S., Salamah, E., Apriyana, G.P. 2013. Profil protein dan asam amino keong ipong-ipong (Fasciolaria salmo) pada pengolahan yang berbeda. *Jurnal Gizi dan Pangan* , 8(1): 77- 82.
17. Rabiei, S., Rezaei, M., Asgharzade, S., Nikoo, M., Rafieian-Kopaei, M. 2019. Antioxidant and cytotoxic properties of protein hydrolysates obtained from enzymatic hydrolysis of Klunzinger's mullet (*Liza klunzingeri*) muscle. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 55: 1-10.
18. Ramos-Villarroel, A.Y., Soliva-Fortuny, R. and Martın-Belloso, O. 2011. Natural antimicrobials for food processing. *Animal Science Reviews* , 20:15-29.
19. Sathisha, H., Lingaraju, K., Sham, P. 2011. Evaluation of Antioxidant Bache`re, E. 2016. Antimicrobial peptides in marine invertebrate health and disease Philosophical Transactions of the Royal Society B. *Biological Sciences*, 37: 1- 11.
4. FaikAhmet, A,. Sema, H. A., Sengul, A. K., Jiri, G., Katerina, V., Jitka Ulrichova, M .2008. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. *Food Chemistry*, 107: 19-25.
5. 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.
6. Hamzeh, A., Rezaei, M., Khodabandeh, S. 2018. Antiproliferative and antioxidative activities of cuttlefish (*Sepia pharaonis*) protein hydrolysates as affected by degree of hydrolysis. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 12: 721–727.
7. Hazavehei ha, Y., Sharifan, A. 2020. Extraction and Purification of Bioactive Peptides from Tilapia (*Oreochromis*) Waste. *Journal of Biosafety*, 13(3) :49-60.
8. Jakubczyk, A., Karaś, M., Rybczyńska-Tkaczyk, K., Zielińska, E., Zieliński, D. 2020. Current Trends of Bioactive Peptides-New Sources and Therapeutic Effect. *Foods*, 9(7): 846-859.
9. Mian, R., Rezaei, M., Mortazavi, M. S. 2016. Effects ozonized ice on the chemical and microbial quality of Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) muscle during short term storage. *Fisheries Science and Technology*, 4(4) :109-120.
10. Moayedi, A.,Nikpayam, M.,Khomeiri, M., AmiriAghdaei, S.2017.- Antibacterial activity of protein hydrolysates obtained from enzymatic digestion of soy protein isolate on some food indicator bacteria.- *JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY IN FOOD INDUSTRY*, 3:22-31.

Activity of Medicinal Plant Extracts Produced for Commercial Purpose. *E-Journal of Chemistry*, 8(2): 882-88.

20. Sinthusamran, S., Idowu, A.T., Benjakul, S. 2020. Effect of proteases and alcohols used for debittering on characteristics and antioxidative activity of protein hydrolysate from salmon frames. *J Food Sci Technol* ,57: 473–483 .
21. Varedesara, M.S., Ariaii, P., Hesari, J. 2021. The effect of grape seed protein hydrolysate on the properties of stirred yogurt and viability of Lactobacillus casei in it. *Food Sci Nutr*, 9:2180–2190.
22. Wang, X., Yu, H., Xing, R., Li, P. 2017. Characterization, Preparation, and Purification of Marine Bioactive Peptides. *BioMed Research International* ,17: 1-16.
23. Yada, R.Y.2017. Plant proteases for bioactive peptides release: A review. *Food Sci. Nutr*, 83: 2147–2163.
24. Yaghoubzadeh, Z., Peyravii Ghadikolaii, F., Kaboosi, H., Safari, R., Fattahi, E. 2020. Antioxidant Activity and Anticancer Effect of Bioactive Peptides from Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Skin Hydrolysate. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 26: 625–632.
25. Yang, Y., Tang, Y., Liu, Y., Wang, H. 2016. Roe Protein Hydrolysates of Giant Grouper (*Epinephelus lanceolatus*) Inhibit Cell Proliferation of Oral Cancer Cells Involving Apoptosis and Oxidative Stress. *BioMed Research International*, 15: 1-12.

(Original Research Paper)

Investigation of Antimicrobial Activity and Properties of Hydrolyzed Indian Mackerel Waste Proteins Using Commercial Enzymes

Komail Hasani[1], Peiman Ariayi[2]*, Mohammad Ahmadi[3]

1-PhD student of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
2-Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.
3-Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Ayatollah Amoli Branch, Islamic Azad University, Amol, Iran.

Received: 17/10/2021 Accepted:04/01/2022

Abstract

In this study, Indian mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) waste protein hydrolysate was produced using two enzymes, alcalase and flavourzyme, at different times of hydrolysis (10, 20 and 30 minutes) and then its antimicrobial properties against Gram-positive *Escherichia coli* and Gram-negative *Staphylococcus aurous* were examined. The results showed that the highest values of nitrogen recovery (89.88%) and degree of hydrolysis (38.70%) were observed by alcalase enzyme during 30 minutes of hydrolysis ($P < 0.05$). The composition of amino acids also showed that the proteins hydrolyzed with both enzymes have a relatively similar composition. The highest levels of essential amino acids for alcalase and flavourzyme were lysine 7.99%, 7.19% and arginine 7.55% and 8.21%, respectively. The highest levels of non- essential amino acids were glutamic acid 12.55%, 11.79% and then aspartic amino acid were 7.99% and 6.98%, respectively. The chemical index showed that both hydrolyzed proteins could well meet an adult human need for most amino acids. The highest antimicrobial activity was observed in the hydrolyzed protein produced by alcalase ($P < 0.05$). *Staphylococcus aureus* had lower resistance to *Escherichia coli*. Overall, it seems that Indian mackerel waste protein hydrolysate can be used as protein supplements in food and in diet formulas as a natural antimicrobial.

Keywords: Indian Mackerel, Enzymatic hydrolysis, Nutritional Value, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aurous*

*Corresponding Author:: p.aryaye@yahoo.com