(مقاله پژوهشی)

مقایسه و ارزیابی‌خواص عملکردی، ترکیب اسیدهای‌آمینه و شاخص شیمیایی پروتئین‌های‌آبکافتی تولیدشده از منابع مختلف ضایعات (ماهی، مرغ و میگو) به روش آنزیمی

سهیل ریحانی پول[1*]، سکینه یگانه[2]

۱- دانش آموخته دکتری ، گروه فراوری محصولات شیلاتی، دانشکده شیلات و محیط زیست، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

۲- استاد، گروه شیلات، دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران.

تاریخ دریافت:۱۴۰۰/۰۵/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۶/۱۸

چکیده

از مواردی که نوع و حد کارائی پروتئین‌های آبکافتی را در صنایع غذایی (انسان و دام، طیور و آبزیان) مشخص می‌کند، درجه مطلوبیت خواص عملکردی، نوع و ترکیب اسیدهای آمینه است. هدف از پژوهش حاضر در مرحله اول تولید پروتئین آبکافتی از سه منبع شامل ضایعات ماهی (FPH)، مرغ (PPH) و میگو (SPH) و در مرحله دوم مقایسه خواص عملکردی، پروفیل اسیدهای آمینه و شاخص شیمیایی این سه نوع پروتئین بود. نتایج نشان داد که در بین این سه نوع پروتئین، بیشترین میزان حلالیت (۱/۱۸±۹۴/۲۶ درصد)، شاخص پایداری امولسیونی (۲/۲۴±۱۱۵/۴۲ دقیقه)، ظرفیت کف‌زایی (۳/۱۵±۱۸۲/۶۱ درصد) و پایداری کف (۱/۴۶±۱۳۴/۷۵ درصد) و ظرفیت نگهداری آب (۰/۲±۴/۸۷ میلی‌لیتر در گرم) به صورت معنی‌داری مربوط به SPH است ($p<۰/۰۵$). ضمن اینکه در زمینه شاخص فعالیت امولسیفایری و ظرفیت جذب روغن بین SPH و FPH اختلاف قابل ملاحظه‌ای ثبت نشد ($p>۰/۰۵$). در ادامه مشخص شد شاخص پایداری امولسیونی در PPH و FPH تقریبا یکسان است ($p>۰/۰۵$). نسبت اسیدهای‌آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه در SPH، PPH و FPH به ترتیب ۰/۵۴، ۰/۵۵ و ۰/۵۲ و همچنین نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای‌آمینه در این پروتئین‌ها ۰/۳۵، ۰/۳۴ و ۰/۴۱ گزارش شد. از مقایسه ترکیب اسیدهای‌آمینه این پروتئین‌ها با نیازهای ماهی کپور مشخص شد اسیدهای آمینه متیونین و فنیل‌آلانین در هر سه پروتئین محدود کننده هستند (شاخص شیمیایی کمتر از یک). از بین سه پروتئین تولیدشده فقط SPH به صورت کامل قادر به تامین نیازهای انسان بود و شاخص شیمیایی همه اسیدهای آمینه آن برای انسان بالاتر از یک گزارش شد.

واژه های کلیدی: آنزیم فلاورزایم، پروتئین‌های آبکافتی، خواص عملکردی، ترکیب اسیدهای آمینه.

* مسئول مکاتبات:Soheylreyhani@gmail.com

۱- مقدمه

تولید حجم‌زیادی ازضایعات در کشتارگاه‌های مرغ و مراکز فراوری آبزیان از یک سو و نیاز به غنی‌سازی مواد غذایی با پروتئین‌های ارزان‌قیمت از جمله عواملی هستند که نظر محققین‌صنعت غذا را به سوی ضایعات حاوی پروتئین جلب کرده است. با استفاده از تکنیک آبکافت (شیمیایی و بیوشیمایی) می‌توان از این ضایعات پپتیدهای زیست‌فعال استخراج کرد.این ترکیبات درموادغذایی به‌عنوان آنتیاکسیدان، امولسیفایر، کف‌زا (۴، ۵، ۱۷ و ۲۵) و در نوشیدنی‌ها به عنوان پایدارکننده و طعم‌دهنده کارائی دارند (۴۳). همچنین مواد غذایی‌مورد استفاده انسان، دام، طیورو آبزیان ر می‌توان بااین‌پروتئین‌هاغنی کرد.چراکه‌این‌پروتئین‌هابه‌دلیل کوتاه بود زنجیره پپتیدی قابلیت هضم بالایی دارند (۱). استفاده از این پروتئین‌هادرصنایع‌غذایی‌بااهداف‌آنتی‌اکسیدانی،امولسیفایری، کف‌زایی و... بستگی به مطلوبیت خواص آن‌ها دارد. عوامل مختلفی می‌توانند خواص این پروتئین‌ها را تحت تاثیر قرار دهند. نوع منبع پروتئینی، نوع آنزیم مورد استفاده (۴، ۵ و ۱۷)، نسبت آنزیم به سوبسترا، دما، زمان (۶ و۹) و سایر عوامل مربوط به شرایط واکنش آبکافت مانند pH از این دست‌عوامل‌هستند.علاوه‌برخواص‌عملکردی‌وآنتی‌اکسیدانی این پروتئین‌ها که کاربرد آن‌ها را در صنایع غذایی تعیین می‌کنند،عوامل‌دیگری مانند پروفیل اسیدهای آمینه (ارزیابی شاخص شیمیایی) نیز در این زمینه نقش دارند. در واقع بدن انسان، دام، طیور و آبزیان نیاز به یکسری آمینواسید با نسبت‌های مشخص (بر اساس پروتئین مرجع) دارد که باید مواد غذایی مختلف جهت مصرف از این نظر بررسی و ارزش‌گذاری‌شوند. در مطالعات مختلفی‌خواص‌پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از دو منبع مورد ارزیابی و مقایسه گرفتند و نتایج مختلفی‌گزارش شده است (۱۲، ۱۳ و ۴۶). اما تحقیق حاضرقصددارد‌به‌شکل‌جامع‌تری‌خواص عملکردی(حلالیت، شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی، شاخص فعالیت (ظرفیت) کف‌زایی و پایداری کف، ظرفیت جذب روغن و نگهداری آب) و شاخص شیمیایی سه نوع پروتئین آبکافتی تولیدشده از سه منبع مختلف شامل ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین کمان (سر، امعا و احشا)، مرغ (سر، امعا و احشا) و میگو (سر، پوسته و دم) را در ابتدا ارزیابی و سپس مقایسه کند تا فرضیه مبنی بر وجود اختلاف در خواص پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از منابع مختلف تائید و یا رد گردد. در صورت تائید این فرضیه، مشخص خواهد شد که کدام پروتئین‌درکدام‌خاصیت برتری و یا ضعف دارد. ضمن این‌که از طریق بررسی پروفیل اسیدهای آمینه پروتئین‌ها و متعاقبا ارزیابی شاخص‌های شیمیایی اسیدهای‌آمینه (مقادیر مورد نیاز بدن انسان و ماهی کپور بر اساس پروتئین‌های مرجع) معلوم می‌گردد که این پروتئین‌ها تا چه اندازه جهت غنی‌سازی غذاها کارائی دارند.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- سوبسترا و آنزیم

ضایعات‌مرغ(سر، امعا واحشا) و ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (سر، امعا و احشا) از بازار ماهی‌فروشان شهرستان ساری و ضایعات میگو (سر، پوسته، دم) از یکی از مراکز فراوری این آبزی در استان گلستان تهیه و در مجاورت زنجیره سرد به آزمایشگاه فراوری محصولات شیلاتی دانشگاه علوم کشاورزی ومنابع‌طبیعی‌ساری منتقل شد. آنزیم مورد استفاده در این پژوهش، آنزیم میکروبی فلاورزایم (میزان فعالیت: ۱/۵واحدآنسون‌به ازای یک میلی‌لیتر؛ منشا: *Aspergillus oryzae*) است که از نمایندگی شرکت نووزایم[1] دانمارک تهیه و تا زمان شروع آزمایش در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

۲-۲- تولید پروتئین آبکافتی

تولیدپروتئین‌آبکافتی در این تحقیق با استفاده از سه سوبسترا (ضایعات ماهی، مرغ و میگو) انجام شد. به منظور تولید این نوع پروتئین، ابتدا در ارلن۵۰۰ میلی‌لیتری ۱۰۰ گرم نمونه ضایعات قرار داده شد. سپس۲۰۰ میلی‌لیتر بافر فسفات با pH=۷/۴ به ارلن اضافه گردید. در مرحله بعد ارلن به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آبی با دمای ۸۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا آنزیم‌های داخلی بافت ضایعات غیرفعال شوند.

1- Novozyme

پس از سپری‌شدن این زمان به ارلن‌ها اجازه داده شد تا در دمای محیط خنک شوند. در مرحله بعد آنزیم فلاورزایم (به میزان ۳۰ واحد آنسون به ازای کیلوگرم) به محتویات ارلن اضافه شد. بلافاصله ارلن به انکوباتور شیکردار با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد (مناسب برای فعالیت آنزیم فلاورزایم) منتقل و یک ساعت در این شرایط انکوبه شد تا فرایند آبکافت پروتئین‌ها انجام شود. بعد از این زمان‌ها، به منظور قطع واکنش آبکافت، ارلن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. در این دما فلاورزایم غیرفعال شد. پس از این مدت و خنک‌شدن ارلن، محتویات ارلن در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور g ۸۰۰۰ سانتریفوژ و سوپرناتانت با استفاده از دستگاه فریز درایر (FD-10V; Iran) خشک شد (۲۰، ۳۵ و ۳۶). نتیجه فرایند آبکافت با سه سوبسترا، تولید سه نوع پروتئین بود (FPH^1، PPH^2 و SPH^3). تولید پروتئین آبکافتی برای هر منبع در سه تکرار انجام شد.

۲-۳- درجه آبکافت فرایند

برای محاسبه این شاخص، بعد از پایان فرایند آبکافت (یک ساعت)، محلول تری‌کلرواستیک‌اسید (TCA) ۲۰ درصد با نسبت برابر به مایع رویی (سوپرناتانت) افزوده شد و محلول حاصل با دور g۶۷۰۰ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰دقیقه‌سانتریفوژ گردید.سپس‌نیتروژن‌موجوددرسوپرناتانت جدید به روش بیورت (۲۷) سنجیده شد. درجه آبکافت فرایند از رابطه زیر محاسبه گردید (۲۲).

۱۰۰ × (نیتروژن کل نمونه/ نیتروژن موجود در محلول ۱۰ درصد تری کلرواستیک‌اسید) = درجه آبکافت (٪)

برای رسم منحنی استاندارد و به دست آوردن معادله دستگاه اسپکتروفتومترازسرم‌آلبومین‌گاوی‌به‌عنوان پروتئین استاندارد استفاده شد.

۲-٤-سنجش میزان پروتئین در سه سوبسترا و پودرهای آبکافتی حاصل

برای‌اندازه‌گیری‌پروتئین‌خام،۱ گرم نمونه و ۸ گرم کاتالیزور پروتئین(شامل۱۰۰گرم سولفات سدیم یا پتاسیم و۱۰گرم سولفات‌مس‌و۱گرم‌پودرسلنیوم)و۲۰میلی‌لیتراسید سولفوریک غلیظ‌را داخل بالن هضم کجلدال ریخته و بالن روی حرارت قرار داده شد. در انتها مایع بی‌رنگی در ته بالن ماند. عمل هضم زیر محوطه سرپوشیده مجهز به ونتیلاتور انجام شد. مرحله بعدی تقطیر ماده هضم‌شده بود که به بالن حاوی نمونه هضم، ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر و سود۵۰ درصد اضافه گردیدوروی‌حرارت‌قرارداده‌شد.سپس ۵۰میلی‌لیتراسیدبوریک و چند قطره معرف متیل رد را داخل یک ارلن ریخته و در زیر رفریژران محل تقطیر قرارداده شد؛ به طوری که انتهای لوله‌متصل‌به‌رفریژران در حدود ۲ میلی‌لیتر در محلول اسیدی غوطه‌ورگردد. میزان نیتروژن آزاد در ارلن جمع شده و وارد محلول اسیدی ۰/۱ نرمال شد. درمرحله بعد، این عمل آنقدر ادامه یافت تا هیچ گونه تغییر رنگی در لوله مشاهده نشد. در پایان محتوای ارلن توسط اسید سولفوریک ۰/۱ نرمال تیتر شد (۱۰ و ۲۳). میزان پروتئین خام از رابطه زیر به دست آمد.

۱۰۰۰ × گرم نمونه خشک / ۱۰۰ × ۱۴× نرمالیته اسید× حجم اسید مصرفی برای نمونه = درصد نیتروژن

(فاکتور پروتئین) ۶/۲۵ × درصد نیتروژن = درصد خام

۲-۵- بازیابی پروتئین

برای محاسبه بازیافت پروتئین از رابطه زیر استفاده شد.

[گرم سوبسترا×نیتروژن سوبسترا] / [گرم پروتئین×نیتروژن پروتئین] = بازیافت نیتروژنی (٪)

۲-٦- خواص عملکردی پروتئین‌های آبکافتی

۲-٦-۱- حلالیت

برای تعیین حلالیت، ۲۰۰ میلی‌گرم پروتئین آبکافتی با ۲۰ میلی‌لیترآب‌دیونیزه‌مخلوط شد. با استفاده از اسید ۰/۲ نرمال، pH محلول به ۶ رسانده شد. این مخلوط ۳۰ دقیقه در دمای اتاق‌هم‌زده وسپس۱۵ دقیقه با دور g۷۵۰۰ سانتریفوژ گردید. پروتئین محلول در سوپرناتانت از روش بیورت و پروتئین موجود در نمونه بعد از حل‌شدن آن در سود ۰/۵ نرمال تعیین شد (۳۹). حلالیت پروتئین‌های آبکافتی از رابطه زیر به دست آمد.

1- Fish Protein Hydrolyzed
2- Poultry Protein Hydrolyzed
3 - Shrimp Protein Hydrolyzed

۱۰۰× (پروتئین کل نمونه /میزان پروتئین محلول در سوپرناتانت) = حلالیت(٪)

۲-٦-۲-شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی

برای محاسبه این شاخص‌ها، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر روغن گیاهی به ۳۰ میلی‌لیتر محلول یک درصد پروتئین آبکافتی اضافه و مخلوط حاصل با هموژنایزر به مدت یک دقیقه با چرخش ۲۰۵۰۰ دور در دقیقه به صورت کامل هموژن شد و یک امولسیون‌به‌دست‌آمد.سپس‌به‌کمک‌سمپلرحجم ۵۰ میکرولیتر از ته ظرف حاوی امولسیون در دو زمان صفر و ۱۰ دقیقه بعد از هموژن‌کردن برداشته و با ۵ میلی‌لیتر محلول سدیم دوسیل‌سولفات۰/۱ درصد مخلوط شد. جذب این‌محلول‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر در طول موج ۵۰۰ نانومتر قرائت گردید. شاخص فعالیت امولسیفایری و پایداری امولسیونی با استفاده از روابط زیر محاسبه شدند (۳۷).

$$EAI\ (m^2/g) = 2\times 2.303\times A_{500}/0.25 \times \text{Protein weight (g)}$$

$$ESI\ (min) = A_{10} \times \Delta t / \Delta A$$

در روابط بالا، A_{500} جذب نمونه در زمان صفر، A_{10} جذب نمونه در زمان ۱۰ دقیقه، Δt برابر ۱۰ دقیقه و ΔA برابر اختلاف بین A_{500} و A_{10} است.

۲-٦-۳-شاخص فعالیت کف کنندگی و پایداری کف پروتئین‌های آبکافتی

۲۰ میلی‌لیتر محلول ۰/۵ درصد پروتئین آبکافتی با استفاده از هموژنایزر با سرعت ۱۳۵۰۰ دور در دقیقه در دمای اتاق به مدت دو دقیقه هموژن شد (هموژن همراه با ترکیب شدن با هوا). نمونه هم زده‌شده به سرعت به سیلندرهای مدرج ۳۰۰ میلی‌لیتری منتقل و حجم مخلوط پس از ۳۰ ثانیه قرائت شد (۴۱). ظرفیت کف‌کنندگی به صورت درصد بیان شده و از طریق رابطه زیر محاسبه گردید.

۱۰۰× [حجم نمونه قبل از هم‌زدن /(حجم نمونه قبل از هم‌زدن − حجم نمونه بعد از هم‌زدن)] = شاخص فعالیت کف‌کنندگی (٪)

نمونه‌ی هم زده شده، به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده و حجم نمونه یادداشت شد. شاخص پایداری کف به صورت درصد بیان شده و از فرمول زیر محاسبه می‌شود.

۱۰۰× [حجم نمونه قبل از هم‌زدن /(حجم نمونه قبل از هم‌زدن − حجم نمونه بعد از قرارگیری در دمای ۲۰)] = شاخص پایداری کف (٪)

۲-٦-٤- ظرفیت جذب روغن

۰/۵گرم پروتئین‌آبکافتی را در فالکون ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و ۱۰ میلی‌لیتر روغن ذرت به آن اضافه شد. مخلوط حاصل به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق انکوبه گردید و هر ۱۰ دقیقه، ۳۰ ثانیه هم زده شد و بعد از این مدت، ۲۵ دقیقه با دور ۲۰۰۰g سانتریفوژ و حجم سوپرناتانت‌وزن شد. جذب چربی به صورت میلی‌لیتر چربی در گرم پروتئین آبکافتی گزارش شد. چسبندگی روغن به لوله آزمایش از قبل حساب شد (۴۲).

۲-٦-۵- ظرفیت نگهداری آب

برای‌اندازه‌گیری این شاخص، ۰/۲ گرم نمونه پروتئینی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط و در دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه با دور ۱۸۰۰g سانتریفوژ و سوپرناتانت با خم‌کردن لوله آزمایش (زاویه ۴۵ درجه) به مدت ۱۰ دقیقه تخلیه شد. اختلاف حجم سوپرناتانت و حجم اولیه آب برابر است با ظرفیت نگهداری آب پروتئین آبکافتی. ظرفیت نگهداری آب به صورت میلی‌لیتر آب نگهداری‌شده در گرم پودر پروتئینی بیان می‌شود (۴۰).

۲-۷- سنجش پروفایل اسیدهای آمینه

در مرحله اول به منظور هیدرولیز نمونه‌ها برای بدست‌آوردن اسیدهای‌آمینه‌آزاد، ۰/۵گرم از نمونه به همراه ۰/۲۵میلی‌لیتر ازمحلول نورولوسین‌به لوله‌های هیدرولیز اضافه شدند. مقدار ۲۴ میلی‌لیتر اسیدهیدروکلریک ۶ نرمال به لوله‌های حاوی نمونه اضافه شد. لوله‌ها به مدت ۳۰ ثانیه مجاور گاز نیتروژن قرار گرفتند و بلافاصله درپوش آن‌ها گذاشته شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و سپس لوله‌های درپوش‌دار در آون با دمای ۱۱۲ تا ۱۱۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ تا ۲۴ ساعت برای هیدرولیز قرار داده شدند. پس از پایان عمل هیدورلیز، لوله‌ها در دمای محیط قرار گرفتند تا سرد شوند. نمونه‌های موجود به سیلندر ۵۰ سی‌سی منتقل و با آب دارای درجه خلوص ویژه HPLC به حجم ۴۰ میلی‌لیتر رسانده شدند. در انتها، مقدار ۵ میلی‌لیتر از محلول تهیه شده، صاف شد و با استفاده از آون متصل به پمپ خلاء به آرامی خشک گردید. در مرحله دوم جهت مشتق‌سازی، به هر لوله حاوی

نمونه، ۲۰ میکرولیتر از محلول مشتق‌سازی که حاوی ۱۰۰ میکرولیتر آب با درجه خلوص ویژه HPLC است،۱۰۰ میکرولیتر تری اتیل آمین،۷۰۰ میکرولیتر متانول و ۱۰۰ میکرولیتر فنیل ایزوتیوسیانات اضافه شد. لوله‌ها به آرامی ورتکس و به مدت ۲۰ دقیقه در جای ثابت (دمای اتاق) قرار داده شدند تا به خوبی واکنش مشتق‌سازی انجام شود. در انتهای آزمایش در این مرحله، نمونه‌ها و استاندارد در آون متصل به پمپ خلا به آرامی خشک شدند. برای قرائت با دستگاه، مقدار ۲۰۰ میکرولیتر رقیق‌کننده، به لوله حاوی استاندارد و لوله‌های حاوی نمونه افزوده و به‌آرامی ورتکس شدند. در مرحله بعد، لوله‌ها به مدت ۵ دقیقه در دور rpm ۵۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در انتها از مایع رویی (سوپرناتانت) لوله‌ها به مقدار ۲۰ میکرولیتر جدا و به دستگاه HPLC با مشخصات جدول ۱ تزریق شد (۳۱).

جدول ۱-: مشخصات دستگاه HPLC جهت آنالیز کمی و کیفی اسیدهای آمینه

اجزا و مشخصات	جزئیات و مدل
نام دستگاه	HPLC (Cecil)
پمپ	Cecil: Seri 200
دتکتور	Knauer
ستون	C18 (15cm × 4.6 mm) –Phenomenex
طول موج مورد استفاده	238 nm
سرعت عبور حلال	1 ml/min
ترکیب حلال	Acetate buffer + Hexansulfonate + CU acetate
روش آنالیز	Isocratic
نرم افزار مورد استفاده	CHRUMuLan

۲-۸- شاخص شیمیایی پروتئین‌های آبکافتی

شاخص‌شیمیایی‌عبارتندازنسبت آمینواسید نمونه به آمینواسید پروتئین مرجع. در این تحقیق آمینواسیدهای مورد نیاز بدن انسان (۱۸) و ماهی کپور (۳۴) به عنوان پروتئین‌های مرجع انتخاب شدند.

۲-۹- تجزیه و تحلیل آماری

تحقیق حاضر در قالب طرح کاملا تصادفی با سه تیمار (ضایعات مرغ، ماهی و میگو) و هر کدام با سه تکرار اجرا و پس از بررسی نرمال بودن داده‌ها با آزمون شاپیروویلک۱، داده‌ها از طریق آزمون آنالیز واریانس یکطرفه (One-Way ANOVA) آنالیز شدند و معنی‌داری تفاوت بین میانگین‌ها توسط‌آزمون دانکن‌درسطح اطمینان ۹۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. به منظور آنالیز آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۲ استفاده گردید.

1-Shapiro-Wilk Test

۳- نتایج

۳-۱- بررسی فرایند آبکافت

جدول۲مقادیرپروتئین‌سوبسترا(ضایعات سه منبع) و پودرهای آبکافتی‌را نشان می‌دهد. در این جدول درجه آبکافت فرایند و بازیابی پروتئین نیز ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، سه سوبسترا از ۱۴/۵ تا ۱۵ درصد پروتئین داشتند که بعد از آبکافت تبدیل به پودری محتوی بالای ۷۹ درصد پروتئین شدند. سه پودر تولیدشده از نظر میزان پروتئین و درجه آبکافت اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$). با توجه به برابری تقریبی میزان پروتئین سه سوبسترا ویکسان-بودن شرایط فرایند آبکافت برای آن‌ها (نوع آنزیم، دما، زمان،pH،نسبت آنزیم به سوبسترا و ...)، تولید پروتئین‌هایی با درجه‌آبکافت برابر قابل توجیه‌است.تحت شرایط تعریف-شده در این تحقیق، آنزیم فلاورزایم توانست پروتئین‌هایی با درجه آبکافت حدود ۱۰ درصد تولید کند.

جدول ۲- مقادیر پروتئین در پودرهای آبکافتی، درجه آبکافت و بازیابی پروتئین

سوبسترا و پودرهای آبکافتی	پروتئین (٪)	درجه آبکافت (٪)	بازیابی پروتئین (٪)
ضایعات ماهی	۱٤/۳٥±۰/۲۳		
ضایعات مرغ	۱٥/۰۳±۰/٤۱		
ضایعات میگو	۱٤/٥۹±۰/۷٦		
FPH	۸۰/۲۷±۱/٤۸[a]	۱۰/٥۳±۰/٦۷[a]	۸۲/٤٥±۲/۰٥[a]
PPH	۷۹/۸٦±۱/۱۹[a]	۱۰/۳٤±۱/۲٦[a]	۸۱/۷۳±۱/٥۸[a]
SPH	۷۹/۳٥±۰/۸٤[a]	۱۰/۸۲±۱/٥٥[a]	۸۱/۸۱±۰/۹٤[a]

میزان بازیافت پروتئین که به عنوان شاخصی از مطلوبیت فرایند آبکافت پروتئین‌ها مطرح است نیز در طی سه فرایند آبکافت‌تقریبا یکسان ($p>۰/۰۵$) و بالای ۸۱ درصد گزارش شد. این میزان در مقایسه با سایر پژوهش‌ها قابل توجه است. اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) طی ۹۰ دقیقه آبکافت ضایعات ماهی تن زردباله[1] با آنزیم فلاورزایم به پودری با ۶۲/۴۳ درصد بازیافت نیتروژنی دست یافتند (۲). درصد بازیافت نیتروژنی در پودر تولیدشده طی سه ساعت آبکافت ضایعات ماهی قزل‌آلا با آنزیم فلاورزایم، ۵۵/۶۴ درصد گزارش شد (۴).

۳-۲- خواص عملکردی پروتئین‌های آبکافتی

جدول۳ خواص عملکردی پروتئین‌های تولیدشده از سه منبع‌رادر۶=pH نشان می‌دهد. مطابق جدول حلالیت پروتئین‌های‌آبکافتی‌از ۷۲ تا ۹۵ درصد متغیر و بیشترین مقدار(۱/۱۸±۹۴/۲۶درصد)مربوط‌به‌SPH است ($p<۰/۰۵$). ضمن اینکه FPH (۱/۷۹±۸۶/۹۱ درصد) حلالیت بیشتری نسبت به PPH (۰/۹۹±۷۲/۶۴ درصد) دارد ($p<۰/۰۵$). پروتئین آبکافتی تولید شده از ضایعات ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان با آنزیم فلاورزایم در pH=۶ حلالیتی معادل ۹۵/۲۰ درصد داشت که بیشتر از حلالیت FPH در تحقیق حاضر است (۴). در تحقیق Taheri و همکاران (۲۰۱۳)، از آبکافت ضایعات مرغ پودری تولید شد که در pH=۶ حدود ۸۵ درصد حلالیت داشت که بیشتر از حلالیت PPH در تحقیق حاضر می‌باشد (۴۶).

مطابق جدول ۳، کمترین شاخص فعالیت امولسیفایری در PPH (۱/۵۴±۴۱/۷۷ مترمربع بر گرم) ثبت شد ($p<۰/۰۵$). SPH(۲/۷۳±۵۸/۳۶مترمربع‌برگرم) و FPH (۲/۸۶±۵۹/۱۱ متر مربع برگرم) در این زمینه اختلاف قابل ملاحظه‌ای ارائه نکردند ($p>۰/۰۵$). در شاخص پایداری امولسیونی بیشترین میزان‌مربوط‌به‌SPH (۲/۲۴±۱۱۵/۴۲ دقیقه) بود ($p<۰/۰۵$). اماPPH(۲/۳۱±۸۶/۹۴ دقیقه) و FPH (۳/۲±۸۸/۳۱ دقیقه) از نظر این شاخص اختلاف معنی‌داری نداشتند ($p>۰/۰۵$). شاخص‌فعالیت‌امولسیفایری و پایداری امولسیونی در پروتئین آبکافتی‌تولیدشده‌ازماهی‌کاتلا[2]با استفاده از آنزیم فلاورزایم به ترتیب ۱۸/۲۸ متر مربع بر گرم و ۱۴/۳۲ دقیقه گزارش شده که بسیار کمتر از این شاخص‌ها در هر سه پروتئین (تحقیق حاضر) می‌باشد (۱۷). پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات مرغ در pH=۶ داری شاخص فعالیت امولسیفایری (حدود) ۱۵ متر مربع بر گرم و شاخص پایداری امولسیونی (حدود) ۲۵ دقیقه بود که این مقادیر نیز نسبت به این شاخص‌ها در SPH، PPH و FPH کمتراست (۴۶). پروتئین آبکافتی مطلوب از نظر شاخص‌های امولسیفایری، پروتئینی است که بتواند یک لایه کاملا متراکم بهم‌پیوسته در سطح مشترک بوجود آورد، به این صورت که گروههای قطبی (آمینواسیدها) با فاز آبی و زنجیره‌های هیدروکربن (گروه غیر قطبی) با فاز روغن برهمکنش نمایند (۳). عوامل مختلفی از جمله ویژگی‌های شیمیایی و فیزیکی مولکول پروتئین، توالی و ترکیب آمینواسیدها و ویژگی آمفیفیلیک

1 - *Thunnus albacares*

2- *Catla catla*

در مولکول پروتئین، سرعت هموژن‌کردن مخلوط، منبع پروتئین، دما، نوع روغن مصرفی برای آزمایش و محتوی آب مخلوط، ویژگی‌های امولسیونی پروتئین‌های آبکافتی را تحت‌تاثیرقرارمی‌دهند.pH از طریق تاثیری که روی حلالیت و سطوح هیدروفوبی مولکول پروتئین دارد، می‌تواند در این زمینه موثر باشد (۲۶، ۲۸ و ۳۸). یکی از فاکتورهای مهم که می‌تواند در میزان ویژگی امولسیفایری پروتئین آبکافتی تاثیرگذارباشد، وزن مولکولی پپتیدهای تولید شده طی آبکافت با هر آنزیم است (۳۲). پپتیدهایی با وزن مولکولی کم،خواص‌آمفیفیلیک کافی برای ارائه ویژگی امولسیفایری مناسب را ندارند(۱۴). ویژگی‌های امولسیفایری پروتئین آبکافتی با کنترل دقیق حد آبکافت، بهبود می‌یابد. چرا که آبکافت گسترده به شدت ویژگی امولسیفایری را کاهش می‌دهد (۲۹). اگرچه پپتیدهای کوچک بسیار پایدارند و سریعا منتشر شده و به سطح مشترک جذب می‌شوند اما اثر کمتری در کاهش کشش سطحی بین سطوح مشترک دارند. زیرا آن‌ها مانند مولکول‌های پروتئین با وزن مولکولی بالا نمی‌توانند خم شوند و تغییر جهت دهند (۴۷). به نظر می‌رسد حلالیت نقش مهمی در این ویژگی دارد چرا که حرکت و جذب‌شدن سریع به سطح مشترک یک شاخص است (۱۴). همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، ظرفیت کف‌زایی هر سه پروتئین تولیدشده در تحقیق حاضر با هم اختلاف معنی‌داری داشت و بیشترین میزان این ظرفیت درSPH(۳/۱۵±۱۸۲/۶۱درصد) ثبت شد ($p<0/05$). FPH (۴/۶۲±۱۲۹/۹۵ درصد) و PPH (۱/۳۷±۹۸/۱۱ درصد) به ترتیب دررتبه‌های بعدی قرار گرفتند. شاخص پایداری کف این سه پروتئین تقریبا نتایج مشابهی داشت؛ به گونه‌ای که هرسه‌پروتئین‌از نظر شاخص مذکور اختلاف معنی‌دار داشتند و بیشترین شاخص پایداری کف مربوط به SPH (۱/۴۶±۱۳۴/۷۵درصد)بود($p<0/05$).FPH (۲/۵۳±۹۱/۳۵ درصد) و PPH (۰/۴۸±۵۹/۱۴ درصد) به ترتیب در رتبه-های بعدی جای گرفتند. پروتئین آبکافتی تهیه‌شده از سر و بازوی ماهی مرکب[1] با استفاده از آنزیم آلکالاز توانست حدود۱۵درصدکف تولید کند (۷) که در مقابل این ظرفیت در سه پروتئین تحقیق حاضر ناچیز است. پروتئینی‌که از ضایعات مرغ با آنزیم آلکالاز تولید شده ظرفیت کف‌زایی و پایداری‌کف حدود ۱۰۰ درصدی در pH=۶ داشت (۴۶). پروتئینی دارای قدرت کف‌زایی بالاست که بتواند سریعتر به سطح مشترک آب و هوا مهاجرت کند و در نتیجه‌ی کاهش‌کشش سطحی، ساختارش از حالت پیچ و تاب خارج (باز) شودو مجددا بازآرایی‌شود. در روند جذب (مهاجرت) پروتئین به سطح مشترک آب – هوا، عواملی مانند اندازه، ساختار و گروه‌های آبگریز مولکول پروتئینی، منبع پروتئین و روش آبکافت دخیل هستند (۳۰ و ۴۶). یکی از مواردی که در پایداری کف موثر است، پروفیل آمینواسید پروتئین آبکافتی است. وجود دو آمینواسید هیدروکسی پرولین و هیدروکسی‌لایزین در پروتئین‌های آبکافتی موجب افزایش شمار پیوندهای هیدروژنی و متعاقب تراکم بار پروتئین می‌شود. به این طریق این دو آمینواسید کف را پایدار می‌کنند (۱۹). بنابراین در پروتئین آبکافتی که غلظت این دو اسیدآمینه بالاست، پایداری کف مطلوبی انتظار می‌رود. به طور کلی ویژگی‌های کف‌زایی و پایداری کف غالبا تحت تاثیر ساختار پپتید، ترکیب آمینواسید، بار شبکه و مولکول پروتئین و همچنین پراکنش این بار هستند.مطابق جدول ۳، کمترین ظرفیت جذب روغن در بین سه پروتئین آبکافتی در PPH (۰/۲۱±۳/۷۹ میلی‌لیتر در گرم) ثبت شد. این ظرفیت در SPH (۰/۸۸±۵/۲۶ میلی‌لیتر در گرم) و FPH(۰/۳۲±۵/۱۵ میلی‌لیتر در گرم) تقریبا برابر ($p>0/05$) و بیشتر از PPH بود ($p<0/05$). پروتئینی که از آبکافت پروتئین‌های سر و اندرونه ماهی ساردین با استفاده از آنزیم آلکالاز در سه درجه آبکافت ۶/۶۲، ۹/۳۱ و ۱۰/۱۶ درصد تولید شد، به ترتیب ظرفیت جذب روغنی معادل ۰/۹۱۱، ۲/۱۹ و ۱/۵۲ میلی‌لیتر در گرم داشت (۴۵). پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از فیله ماهی[2] که با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم تولید شده بودند، به ترتیب دارای ظرفیت جذب روغن ۴/۵ و ۵/۵ گرم روغن در گرم پروتئین

1- *Sepia pharaonis*

2- *Prionotus punctatus*

بودند(۱۶). ظرفیت جذب روغن پروتئین آبکافتی تولیدشده از پوست ماهی کپور علفخوار[1] با استفاده از آلکالاز در سه درجه آبکافت، ۲/۴ تا ۳/۶ میلی‌لیتر در گرم اندازه‌گیری شد (۴۸). از جمله عوامل موثر در ظرفیت جذب روغن پروتئین‌ها، می‌توان به سطوح هیدروفوب (آبگریز) پروتئین‌های آبکافتی (۲۵)، چگالی توده‌ای پروتئین (۲۴)، درجه‌آبکافت (۴۵) و اختصاصات آنزیم- سوبسترا (۲۱) اشاره کرد. یکی دیگر از عوامل تاثیرگذار در ظرفیت جذب روغن پروتئین‌های آبکافتی، ترکیب آمینواسیدی آن‌هاست. بدین ترتیب که هر چه غلظت اسیدآمینه‌های هیدروکسی-پرولین، آسپارتیک‌اسید، گلوتامیک‌اسید، لایزین و آرژینین در یک پروتئین آبکافتی بیشتر باشد، آن پروتئین احتمالا میلی‌لیتر روغن بیشتری جذب خواهد کرد (۴۴). همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، هر سه پروتئین از نظر ظرفیت نگهداری آب اختلاف قابل ملاحظه‌ای با یکدیگر داشتند و بیشترین میزان این ظرفیت در SPH (۰/۲±۴/۸۷ میلی‌لیتر در گرم) ثبت شد ($p<0/05$). FPH (۰/۰۰±۳/۷۱ میلی‌لیتر در گرم) و PPH (۰/۱۲±۲/۲۴ میلی‌لیتر در گرم) به ترتیب‌در رتبه‌های بعدی قرار گرفتند. دو پروتئین آبکافتی که از سوبسترای فیله ماهی[2] با استفاده از آنزیم‌های آلکالاز و فلاورزایم تولید شدند، به ترتیب ظرفیت نگهداری آب ۲/۴ و ۳/۷ گرم آب بر گرم پروتئین را ارائه کردند (۱۶). پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی قزل‌آلا و مرغ با آنزیم آلکالاز به ترتیب ظرفیت نگهداری آب معادل ۵/۱ و ۲/۸ میلی‌لیتردرگرم ارائه کردند (۴۶). عوامل مختلفی بر ظرفیت نگهداری آب پروتئین‌های آبکافتی موثرند. این عوامل عبارتند از تعداد و نسبت گروه‌های قطبی و غیرقطبی (آمینواسیدهای آبدوست و آبگریز) و ترکیب (پروفیل) آمینواسید پروتئین‌های آبکافتی. به گونه‌ای که هر چه تعداد (غلظت) گروه‌های قطبی مانند COOH (کربوکسیل) و NH_2 (آمین) در یک پروتئین بیشتر باشد، آن‌پروتئین‌قابلیت نگهداری مقدار بیشتری از آب را داراست (۲۵). وجود دو اسیدآمینه گلوتامیک‌اسید و آسپارتیک‌اسید در یک پروتئین آبکافتی، به جذب و نگهداری آب بیشتری کمک می‌کند. بنابراین هرچه غلظت این دو اسیدآمینه در یک پروتئین بیشتر باشد، ظرفیت نگهداری آب آن پروتئین احتمالا بالاتر است (۱۵).

1-*Ctenopharyngodon idella*

2- *Prionotus punctatus*

جدول ۳- خواص عملکردی پروتئین‌های آبکافتی

خواص عملکردی (کارکردی)	SPH	PPH	FPH
حلالیت (درصد)	۹٤/۲٦±۱/۱۸[a]	۷۲/٦٤±۰/۹۹[c]	۸٦/۹۱±۱/۷۹[b]
شاخص فعالیت امولسیفایری (متر مربع بر گرم)	۵۸/۳٦±۲/۷۳[a]	٤۱/۷۷±۱/۵٤[b]	۵۹/۱۱±۲/۸٦[a]
شاخص پایداری امولسیونی (دقیقه)	۱۱۵/٤۲±۲/۲٤[a]	۸٦/۹٤±۲/۳۱[b]	۸۸/۳۱±۳/۲[b]
شاخص ظرفیت کف‌زایی (درصد)	۱۸۲/٦۱±۳/۱۵[a]	۹۸/۱۱±۱/۳۷[c]	۱۲۹/۹۵±٤/٦۲[b]
شاخص پایداری کف (درصد)	۱۳٤/۷۵±۱/٤٦[a]	۵۹/۱٤±۰/٤۸[c]	۹۱/۳۵±۲/۵۳[b]
ظرفیت جذب روغن (میلی‌لیتر در گرم)	۵/۲٦±۰/۸۸[a]	۳/۷۹±۰/۲۱[b]	۵/۱۵±۰/۳۲[a]
ظرفیت نگهداری آب (میلی‌لیتر در گرم)	٤/۸۷±۰/۲[a]	۲/۲٤±۰/۱۲[c]	۳/۷۱±۰/۰۰[b]

*حروف متفاوت در هر ردیف نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌های آن ردیف است ($p<۰/۰۵$).

۳-۳- پروفیل اسیدهای آمینه در پروتئین‌های آبکافتی

جدول ۴ پروفیل اسیدهای آمینه را در سه پروتئین آبکافتی تولیدشده از سه منبع نشان می‌دهد. مطابق این جدول میزان اسیدهای آمینه ضروری در SPH، PPH و FPH به ترتیب ۴۶/۸۲، ۴۰/۷۲ و ۴۷/۸۷ (گرم در ۱۰۰ گرم) گزارش شده است. یکی از نسبت‌های مهم در پروتئین‌ها، نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه است که بنابر اعلام سازمان جهانی بهداشت و سازمان خواربار و کشاورزی برای انسان نباید کمتر از ۰/۴ باشد (۱۸). در هر سه پروتئین تولیدشده در تحقیق حاضر این مقدار بالاتر ۰/۵۲ است که نشان‌دهنده استانداردبودن این پروتئین‌ها برای تامین نیازهای غذایی انسان است. در تحقیق اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹) نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه در سه پروتئین‌آبکافتی تولیدشده از امعا و احشا ماهی تن زردباله با آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم به ترتیب ۰/۵۵۴، ۰/۵۵۳ و ۰/۵۴۳ بوده است که تقریبا مشابه نتایج تحقیق حاضر می‌باشد (۲). نسبت اسیدهای آمینه ضروری به‌کل‌اسیدهای‌آمینه درپروتئین‌آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو (سر) با استفاده از آنزیم آلکالاز (۸)، ۰/۵۴ گزارش شد که با تحقیق حاضر همخوانی دارد. در پژوهشی که ضایعات ماهی خاویاری باآنزیم آلکالاز آبکافت شد، نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه ۰/۵۵ محاسبه گردید (۳۵). نسبت اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه در پروتئین آبکافتی تولیدشده از سر میگو به روش اتولیز (آنزیم‌های داخلی، زمان یک ساعت)، ۰/۴۸ گزارش شد (۱۱) که کمتر از این نسبت در SPH (تحقیق حاضر) است. گلوتامیک‌اسید، گلایسین، آلانین و آسپارتیک‌اسید از جمله اسیدهای آمینه طعم زا هستند که در پروتئین‌های تولیدشده‌مقادیربالاییدارند.SPHوFPHاز نظر گلوتامیک اسید و آسپارتیک‌اسید از PPH غنی‌تر هستند. در عوض PPH حاوی مقادیر بیشتری از گلایسین وآلانین نسبت به SPH و FPH است. اما در کل، مجموع اسیدهای آمینه طعم‌زا درFPH(۳۷/۴۹درصد) بیشتراز SPH (۳۰/۵۶ درصد) و PPH(۲۵/۴درصد) می‌باشد. نسبت اسیدهای‌آمینه‌طعم‌زا به کل‌اسیدهای‌آمینه در SPH، PPH و FPH به ترتیب ۰/۳۵، ۰/۳۴و۰/۴۱ محاسبه شد. این نسبت در سه پروتئین تولیدشده ازضایعات‌ماهی تن زردباله با آنزیم‌های آلکالاز، پروتامکس و فلاورزایم به ترتیب ۰/۳۶، ۰/۳۵ و ۰/۳۷ گزارش شد (۲). نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای آمینه در پروتئینی که از آبکافت سر میگو با آنزیم آلکالاز تولید شد (۸)، ۰/۳۴ گزارش شد که مشابه نتیجه پژوهش حاضر می‌باشد. پروتئینی که از ضایعات ماهی خاویاری با استفاده از آلکالاز تولید شد، نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای‌آمینه‌د آن ۰/۳۶ محاسبه شد (۳۵). نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای آمینه در پروتئینی که به روش آبکافت اتولیز (زمان یک ساعت) از سر میگو تولید شد، ۰/۳۷ گزارش گردید (۱۱). نسبت مهم دیگر در بحث پرفیل اسیدهای آمینه، نسبت اسیدهای آمینه ضروری به اسیدهای آمینه غیرضروری است که در هر سه پروتئین تحقیق حاضر این میزان بالای یک گزارش شد. در سایر پژوهش‌هایی که

پیرامون‌آنالیز اسیدهای آمینه پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی و میگو انجام شد نیز چنین نتیجه‌ای گزارش شد (۲، ۸ و ۳۵). البته در برخی از تحقیقات نسبت اسیدهای آمینه ضروری به غیرضروری در پروتئین‌های آبکافتی کمتر از یک هم گزارش شده است (۱۱). یکی از اسیدهای‌آمینه مهم که نقش آن در کاهش سمیت مواد، نقل و انتقال انرژی (۱۱) و پیشگیری از بیماری‌های عروقی ثابت شده است (۳۳)، آرژینین می‌باشد.این اسیدآمینه در پروتئین‌های پژوهش حاضر بویژه درPPH به میزان قابل توجهی‌وجوددارد‌که‌به‌افزایش‌ارزش‌غذایی‌این‌پروتئیها‌کمک می‌کند.در سایر پژوهش‌هایی که به مطالعه ترکیب اسیدهای آمینه در پروتئین‌های آبکافتی پرداختند، آرژینین در ترکیب اسیدهای آمینه ثبت شده است (۱۱، ۳۵ و ۴۶).

جدول٤- پروفیل اسیدهای آمینه پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده از سه منبع ضایعات

اسیدهای آمینه	گرم در ۱۰۰ گرم نمونه		
	SPH	PPH	FPH
هیستیدین	۱۲/۲۳	۱/٤٦	۹/۸۱
ایزولوسین	۷/۵۷	۳/۱۸	۵/٦۷
لوسین	٤/۳۹	۵/۳۱	٦/۵۲
لایزین	۳/۲۵	٦/۸۹	۲/۳۸
متیونین	۱/۹۱	۰/۹۷	۱/۰۱
فنیل‌آلانین	۲/۱۱	۲/۹۲	٤/۸۲
ترئونین	۵/۵٦	۷/۵۱	۵/۲۹
آرژینین	۳/٤۸	۵/۸۵	۲/۰٦
والین	٦/۳۲	٦/٦۳	۱۰/۳۱
آسپارتیک‌اسید	۹/۳۸	۱/۱۹	۱٤/۷۵
گلایسین	۳/۷۹	۱۵/۳٤	۵/۱۱
آلانین	۲/۵٦	۵/۰۸	۱/۱۵
سرین	٤/۲۲	۲/۹٦	۵/۲٤
تیروزین	۳/۹٤	٤/۸٦	۱/٦٦
گلوتامیک‌اسید	۱٤/۸۳	۳/۷۹	۱٦/٤۸
اسیدهای آمینه طعم‌زا	۳۰/۵٦	۲۵/٤	۳۷/٤۹
اسیدهای آمینه ضروری	٤٦/۸۲	٤۰/۷۲	٤۷/۸۷
اسیدهای آمینه غیرضروری	۳۸/۷۲	۳۳/۲۲	٤۳/۳۹
اسیدهای آمینه ضروری به کل	۰/۵٤	۰/۵۵	۰/۵۲
اسیدهای آمینه ضروری/ غیرضروری	۱/۲	۱/۲۲	۱/۱
اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای آمینه	۰/۳۵	۰/۳٤	۰/٤۱

۳-٤- شاخص شیمیایی پروتئین‌ها

جدول۵شاخص‌شیمیایی‌اسیدهای‌آمینه سه پروتئین تولیدشده در تحقیق حاضررا نشان می‌دهد. شاخص شیمیایی یکی از شاخص‌های سنجش ارزش غذایی پروتئین‌هاست که نسبت آمینواسیدهای‌ضروری یک پروتئین را در برابر یک پروتئین مرجع ارزیابی می‌کند. در این تحقیق ترکیب اسیدهای آمینه ضروری سه پروتئین تولیدشده جهت امکان‌سنجی برآوردن نیازهای ماهی کپور و انسان (پروتئین‌های مرجع) ارزیابی

شدند. مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه در SPH، PPH و FPH با نیازهای‌ماهی کپورنشان‌داد که‌اسیدهای آمینه متیونین و فنیل‌آلانین در هر سه پروتئین، اسیدآمینه لایزین در SPH و FPHواسیدآمینه‌هیستیدین‌در PPH محدودکننده محسوب می‌شوند (شاخص شیمیایی کمترازیک). سایر اسیدهای آمینه در این سه پروتئین قادر به تامین نیازهای ماهی کپور هستند و شاخص شیمیایی آن‌ها بالاتر از یک ثبت شده است.

جدول ۵- شاخص شیمیایی آمینواسیدهای ضروری پروتئین‌های آبکافتی

آمینواسیدهای ضروری	پروتئین مرجع الف (گرم در ۱۰۰ گرم)	شاخص شیمیایی			پروتئین مرجع ب (گرم در ۱۰۰ گرم)	شاخص شیمیایی		
		SPH	PPH	FPH		SPH	PPH	FPH
هیستیدین	۲/۱	۵/۸۲	۰/۶۹	٤/٦٧	۱/٦	۷/٦٤	۰/۹۱	٦/۱۲
ایزولوسین	۲/۵	۳/۰۲	۱/۲۷	۲/۲٦	۱/۳	۵/۸۲	۲/٤٤	٤/۳٦
لوسین	۳/۳	۱/۳۳	۱/٦	۱/۹۷	۱/۹	۲/۳۱	۲/۷۹	۳/٤۳
لایزین	۵/۷	۰/۵۷	۱/۲	۰/٤۱	۱/٦	۲/۰۳	٤/۳۰	۱/٤۸
متیونین	۳/۱	۰/٦۱	۰/۳۱	۰/۳۲	۱/۷	۱/۱۲	۰/۵۷	۰/۵۹
فنیل‌آلانین	٦/۵	۰/۳۲	۰/٤٤	۰/۷٤				
ترئونین	۳/۹	۱/٤۲	۱/۹۲	۱/۳۵	۰/۹	٦/۱۷	۸/۳٤	۵/۸۷
آرژینین	۱/۳	۲/٦۷	٤/۵	۱/۵۸				
والین	۳/٦	۱/۷۵	۱/۸٤	۲/۸٦	۱/۳	٤/۸٦	۵/۱	۷/۹۳

*پروتئین مرجع الف: بر اساس نیاز ماهی کپور به اسیدهای آمینه (NRC, 1993)

*پروتئین مرجع ب: بر اساس نیاز انسان به اسیدهای آمینه (FAO/WHO, 1990)

مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه در این سه پروتئین با نیازهای انسان نشان داد که اسیدآمینه‌هیستیدین درPPH و اسیدآمینه متیونین‌درPPH و FPH محدودکننده هستند. به این معنی‌که شاخص شیمیایی برای آن‌ها کمتر ازیک محاسبه شده است. همچنین‌مشخص‌شدSPH فاقد اسیدهای آمینه محدودکننده درمقابل نیازهای انسان است و شاخص شیمیایی برای تمام اسیدهای‌آمینه آن بالاتر از یک محاسبه شد. با توجه به تعداد اسیدهای آمینه محدودکننده در این سه پروتئین برای ماهی کپور و انسان به نظر می‌رسد این سه پروتئین برای تامین نیاز انسان کارائی بالاتری دارند (تعداد کمتر اسیدهای آمینه محدودکننده). در پژوهش اویسی‌پور و همکاران (۱۳۸۹)، مقایسه ترکیب اسیدهای‌آمینه سه پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات ماهی تن زردباله با نیازهای ماهی کپور نشان داد که آمینواسیدهای‌لایزین، متیونین و فنیل‌آلانین محدودکننده هستند (۲) که این نتیجه در تحقیق حاضر نیز ثبت شد. در تحقیق مذکور شاخص شیمیایی اسیدآمینه متیونین در مقابل نیازهای انسان کمتر از یک محاسبه شد (۲) که مطابق نتیجه پژوهش پیش‌رو می‌باشد. در تحقیقی دیگر که امعا و احشا ماهی‌خاویاری‌باآنزیم‌آلکالازآبکافت شد، پروتئین تولیدشده در مقایسه با نیارهای ماهی کپور از نظر اسیدهای آمینه هیستیدین،فنیل‌آلانین‌وترئونین‌غنای لازم را نداشته و شاخص شیمیایی‌این‌اسیدهای‌آمینه کمتر از یک محاسبه شد. اما همین پروتئین قادر به تامین نیازهای انسان بود و شاخص شیمیایی همه اسیدهای آمینه آن در مقابل نیازهای انسان بالاتر از یک گزارش شد (۳۵). مقایسه ترکیب اسیدهای آمینه پروتئین تولیدشده از ضایعات میگو با استفاده از آنزیم آلکالاز (۸) با نیازهای ماهی کپور نشان داد که اسیدهای آمینه هیستیدین، متیونین، فنیل‌آلانین و ترئونین دارای شاخص شیمیایی کمتر از یک هستند. اما همین پروتئین قادر به تامین نیازهای انسان می‌باشد (شاخص شیمیایی برای همه اسیدهای آمینه بیشتر از یک).

٤- نتیجه‌گیری

پروتئین‌های آبکافتی تولیدشده‌ازسه منبع ضایعاتی ماهی قزل-آلا، مرغ‌ومیگو از نظر خواص عملکردی و شاخص شیمیایی (پروفیل اسیدهای آمینه) متفاوت هستند. به صورت کلی و برایند، پروتئین آبکافتی تولیدشده از ضایعات میگو (SPH) از نظر خواص عملکردی نسبت به پروتئین‌های تولیدشده از ضایعات مرغ و ماهی در سطح بالاتر و مطلوب‌تری قرار داشت. اگرچه مقادیر برخی از خواص عملکردی در SPH و FPHاختلاف‌قابل‌ملاحظه‌ای‌نداشتند. سه پروتئین تولیدشده ازسه‌منبع‌ازنظرنسبت‌اسیدهای آمینه ضروری به کل اسیدهای آمینه تقریبا مقادیر برابری ارائه کردند. میزان آمینواسیدهای طعم‌زاوهمچنین‌نسبت اسیدهای آمینه طعم‌زا به کل اسیدهای آمینه در FPH بیشتر از SPH و PPH بود. هر سه پروتئین تولیدشده در تحقیق حاضر در مقایسه با نیازهای ماهی کپور دارای ۳ اسیدآمینه‌محدودکننده بودند. همچنین PPH دارای دو و FPH داری یک اسیدآمینه محدودکننده جهت تامین نیازهای انسان بود. اما SPH به طور کامل قادر به تامین نیاز انسان بود و شاخص شیمیایی برای همه اسیدهای آمینه آن بیشتر از یک محاسبه شد (فاقد اسیدآمینه محدود کننده).

٥- منابع

۱. اویسی پور، م. و قمی، م. ر. ۱۳۸۷. بیوتکنولوژی در تولید فراورده‌های دریایی. انتشارات دانشگاه آزاد اسلامی واحد تنکابن. ۱۰٤- ۳۷.

۲. اویسی‌پور، م.، عابدیان کناری، ع .، معتمدزادگان، ع . و نظری، ر. ۱۳۸۹. بررسی خواص پروتئین‌های هیدرولیز شده امعاء و احشاء ماهی تون زردباله (*Thunnus albacares*) با استفاده از آنزیم های تجاری. *نشریه پژوهش های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد ٦، شماره ۱، ۷٦-٦۸.

۳. رضوی شیرازی، ح . ۱۳۸۰. تکنولوژی فراورده‌های دریایی، علم فراوری (۲). انتشارات نقش مهر.چاپ دوم، ۹۱-۱٤.

٤. ریحانی‌پول، س.، جعفرپور، ع. و صفری، ر. ۱۳۹٥. خواص کارکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی تولیدشده از اندرونه ماهی قزل‌آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از روش آنزیمی. *علوم و فنون شیلات*، دوره ٥، شماره ٤، ۲۸-۱۳.

٥. ریحانی پول، س.، جعفرپور، ع. و صفری، ر. ۱۳۹۷. بررسی پروفیل اسیدچرب روغن، خواص عملکردی و آنتی‌اکسیدانی پروتئین حاصله از آبکافت آنزیمی اندرونه ماهی قزل-آلای رنگین‌کمان (*Oncorhynchus mykiss*) با استفاده از آنزیم‌های پروتامکس و نئوتراز. *نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران*، جلد۱٤،شماره۱، ۱۷٦-۱٦۲.

٦. شعبانپور، ب.، کردجزی، م. و نظری، خ. ۱۳۹٤. بهینه‌سازی شرایط هیدرولیز آنزیمی پروتئین ضایعات سر سینه میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) با استفاده از روش پاسخ سطح. *بهره‌برداری و پرورش آبزیان*، دوره ٤، شماره ۳، ٥۰-۲۹.

۷. علی‌عسگری‌رنانی، ک.، جعفرپور، ع .، یگانه، س. و صفری، ر. ۱۳۹۳. پایان نامه کارشناسی ارشد. دانشکده علوم دامی و شیلات، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری.

۸. طاهری، ع.، جلالی‌نژاد، س. و انوار، ا. ۱۳۹۱. خواص ضدفشار خون و ضداکسیدان پنج نوع پروتئین آبکافتی حاصل از ضایعات میگوی سفید هندی (*Penaeus indicus*). *پاتولوژی مقایسه‌ای*، دوره۹، شماره ۱، ٦۰۸-٥۹۹.

۹. یگانه، س.، اسماعیلی، م. و احمدی، ح. ۱۳۹۹. تاثیر زمان آبکافت بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین آبکافتی حاصل از سر ماهی کپور معمولی (*Cyprinus carpio*). *مجله علمی شیلات ایران*، دوره ۲۹، شماره ٦، ٤۲-۲۹.

10. AOAC .2005. Official method of Analysis. 17th Edition, Association of Officiating Analytical Chemists, Washington DC.
11. 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*(1): 176-183.
12. Centenaro, G. S., Centenaro, M. S. and Hernandez, C. P. 2011. Antioxidant activity of protein hydrolysates of fish and chicken bones. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 3(4): 280-288
13. Centenaro, G. S., Salas-Mellado, M., Pires, C., Batista, I., Nunes, M. L., and Prentice, C. 2014. Fractionation of protein hydrolysates of fish and chicken using membrane ultrafiltration: investigation of antioxidant activity. *Applied biochemistry and biotechnology*, 172(6): 2877-2893.
14. Chobert, J. M., Bertrand-Harb, C., and Nicolas, M. G. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymically by trypsin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(5): 883-892.
15. Deeslie, W. D., and Cheryan, M. 1988. Functional properties of soy protein hydrolyzates from a continuous ultrafiltration reactor. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 36(1): 26-31.
16. Dos Santos, S. D. A., Martins, V. G., Salas-Mellado, M., and Prentice, C. 2011. Evaluation of functional properties in protein hydrolysates from bluewing searobin (*Prionotus punctatus*) obtained with different microbial enzymes. *Food and bioprocess technology*, 4(8): 1399-1406.
17. Elavarasan, K., Naveen Kumar, V., and Shamasundar, B. A. 2014. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Catla catla*) as influenced by the nature of enzyme. *Journal of Food Processing and Preservation*, 38(3): 1207-1214.
18. 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: 116–29.
19. Giménez, B., Gómez-Estaca, J., Alemán, A., Gómez-Guillén, M. C., and Montero, M. P. 2009. Physico-chemical and film forming properties of giant squid (*Dosidicus gigas*) gelatin. *Food Hydrocolloids*, 23(3): 585-592.
20. 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, 19: 489-498.
21. Haque, Z. U. 1993. Influence of milk peptides in determining the functionality of milk proteins: a review. *Journal of dairy science*, 76(1): 311-320.
22. Hoyle, N. T., and Merritt, J. O. H. N. 1994. Quality of fish protein hydrolysates from herring (*Clupea harengus*). Journal of Food Science, 59(1): 76-79.
23. Iranian National Standard No. 924, 1993. Measurement of total protein in meat and its products. Iran Institute of Standards and Industrial Research.
24. Kinsella, J.E. 1976. Functional properties of proteins in food: A survey,Crit. Rev. *Food Sci. Nutr*. 8: 219–280**.**
25. 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(4): 1317-1327.
26. Kristinsson, H. G., and Rasco, B. A. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Critical reviews in food science and nutrition*, 40(1): 43-81.
27. Layne, E. 1957. [73] Spectrophotometric and turbidimetric

methods for measuring proteins. *Methods in enzymology*, 3: 447-454.
28. Linder, M., Fanni, J., and Parmentier, M. 1996. Functional properties of veal bone hydrolysates. *Journal of Food Science*, 61(4): 712-716
29. Mahmoud, M. I. 1994. Physicochemical and functional properties of protein hydrosylates in nutritional products. *Food Technology*, 48(10), 89-95.
30. Martin, A. H., Grolle, K., Bos, M. A., Stuart, M. A. C., and van Vliet, T. 2002. Network forming properties of various proteins adsorbed at the air/water interface in relation to foam stability. *Journal of Colloid and Interface Science*, 254(1): 175-183.
31. Moore, J. 2004. Amino acid analysis of hydrolysates (feed, fxal, etc), Michign State University, Department of Animal Sciences, Nathalie Trottiers Laboratory.
32. Mutilangi, W. A. M., Panyam, D., and Kilara, A. 1996. Functional properties of hydrolysates from proteolysis of heat-denatured whey protein isolate. *Journal of Food Science*, 61(2): 270-275.
33. Niittynen, L., Nurminen, M. L., Korpela, R., and Vapaatalo, H. 1999. Role of arginine, taurine 4 and homocysteine in cardiovascular diseases. *Annals of Medicine*, *31*(5): 318-326.
34. NRC. 1993. National Research Council. National Academy of Sciences, Nutrient Requirements of Fish. p. 124. Washington, USA
35. 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 from Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) viscera. *Food Chemistry*, *115*(1), 238-242.
36. Ovissipour, M., Safari, R., Motamedzadegan, A., and Shabanpour, B. 2012. Chemical and biochemical hydrolysis of Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) visceral protein. *Food and Bioprocess Technology*, *5*(2): 460-465.
37. Pearce, K. N., and Kinsella, J. E. 1978. Emulsifying properties of proteins: evaluation of a turbidimetric technique. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 26(3): 716-723.
38. Rahali, V., Chobert, J. M., Haertle, T. and Gueguen, J. 2000. Emulsification of chemical and enzymatic hydrolysates of β-lactoglobulin: characterization of the peptides adsorbed at the interface. *Food/Nahrung*, 44(2): 89-95.
39. Robinson, H. W., and Hogden, C. G. 1940. The biuret reaction in the determination of serum proteins. 1. A study of the conditions necessary for the production of a stable color which bears a quantitative relationship to the protein concentration. *Journal of Biological Chemistry*, 135: 707-725.
40. Rodríguez-Ambriz, S. L., Martinez-Ayala, A. L., Millán, F., and Davila-Ortiz, G. 2005. Composition and functional properties of Lupinus campestris protein isolates. *Plant Foods for Human Nutrition*, 60(3): 99-107.
41. Sathe, S. K., and Salunkhe, D. K. 1981. Functional properties of the Great Northern bean (*Phaseolus vulgaris L.*) proteins: Emulsion, foaming, viscosity, and gelation properties. *Journal of Food Science*, 46(1): 71-81.
42. Shahidi, F., Han, X. Q., and Synowiecki, J. 1995. Production and characteristics of protein hydrolysates from capelin (*Mallotus villosus*). *Food chemistry*, 53(3): 285-293.
43. Skanderby, M. 1994. Protein hydrolysates: their functionality and applications. *Food Science and Technology International*, 10, 141.
44. Šližytė, R., Mozuraitytė, R., Martínez-Alvarez, O., Falch, E., Fouchereau-Peron, M., and Rustad, T. 2009. Functional, bioactive and antioxidative properties of hydrolysates obtained from cod (*Gadus morhua*) backbones. *Process Biochemistry*, 44(6): 668-677.

45. Souissi, N., Bougatef, A., Triki-Ellouz, Y. and Nasri, M. 2007. Biochemical and functional properties of sardinella (*Sardinella aurita*) by-product hydrolysates. *Food Technology and Biotechnology*, 45(2): 187.
46. Taheri, A., Anvar, S. A. A., Ahari, H., and Fogliano, V. 2013. Comparison the functional properties of protein hydrolysates from poultry by-products and rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) viscera. *Iranian journal of fisheries sciences*, 12(1): 154-169.
47. Turgeon, S. L., Gauthier, S. F., and Paquin, P. 1991. Interfacial and emulsifying properties of whey peptide fractions obtained with a two-step ultrafiltration process. *Journal of Agricultural and Food chemistry*, 39(4): 673-676.
48. Wasswa, J., Tang, J., Gu, X. H. and 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.

(Original Research Paper)

Comparison and Evaluation of Functional Properties, Amino Acid Profiles and Chemical Index of Hydrolyzed Proteins Produced from Different Sources of Waste (Fish, Chicken and Shrimp) by Enzymatic Method

Soheyl Reyhani Poul[1]*, Sakineh Yeganeh[2]

1-Ph.D Graduated of Processing of Fishery Products, Faculty of Fisheries and Environment, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2-Professor, Department of Fisheries, Faculty of Animal Science and Fisheries, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran.

Received: 25/07/2021 Accepted:09/09/2021

Abstract

One of the things that determines the type and limit of efficiency of hydrolyzed proteins in the food industry (humans and livestock, poultry and aquatic animals) is the degree of desirability of functional properties and the type and composition of amino acids. The aim of the present study was to produce hydrolyzed protein from three sources including fish (FPH), poultry (PPH) and shrimp (SPH) waste in the first stage and to compare the functional properties, amino acid profiles and chemical index of these three types of proteins in the second stage. The results showed that among these three types of proteins, the highest solubility (94.26±1.18%), emulsion stability index (115.42±2.24 min), foaming capacity (182.61±3.15) and foam stability (134.75±1.46%) and water holding capacity (4.87±0.2 ml/g) were significantly related to SPH ($p<0.05$). In addition, no significant difference was recorded between SPH and FPH in terms of emulsifying activity index and oil absorption capacity ($p>0.05$). It was further found that the emulsion stability index in PPH and FPH are almost the same ($p>0.05$). The ratio of essential amino acids to total amino acids in SPH, PPH and FPH are 0.54, 0.55 and 0.52, respectively, and the ratio of flavorful amino acids to total amino acids in these proteins is 0.35, 0.34 and 0.41 was reported. Comparing the amino acids of these proteins with the needs of carp, it was found that the amino acids methionine and phenylalanine are limiter in all three proteins (chemical index<1). From among the three proteins produced, only SPH was fully able to meet human needs, and the chemical index of all its amino acids for humans was reported to be higher than one.

Keywords: Flavourzyme Enzyme, Hydrolyzed Proteins, Functional Properties, Amino Acids Composition

*Corresponding Author Soheylreyhani@gmail.com