بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

پایان‌نامه جهت اخذ مدرک کارشناسی‌ارشد (M.Sc.) رشته صنایع غذایی

بررسی خواص پروتئین هیدرولیز شده تهیه شده از ضایعات ماهی تون به روش شیمیایی

پژوهش و نگارش:
گولن دانش‌پورکر

استاد راهنما:
دکتر یحیی مقصودلو

اساتید مشاور:
دکتر علی معتمدزادگان
دکتر بهاره شعبانپور

۱۳۸۹

تعهدنامه پژوهشی

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان مبین بخشی از فعالیت‌های علمی- پژوهشی بوده و همچنین با استفاده از اعتبارات دانشگاه انجام می‌شود، بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه، دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به موارد ذیل متعهد می‌شوند:

۱) قبل از چاپ پایان نامه (رساله) خود، مراتب را قبلاً بطور کتبی به مدیریت تحصیلات تکمیلی دانشگاه اطلاع داده و کسب اجازه نمایند.
۲) در انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) در قالب مقاله، همایش، اختراع و اکتشاف و سایر موارد ذکر نام دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان الزامی است.
۳) انتشار نتایج پایان‌نامه (رساله) باید با اطلاع و کسب اجازه از استاد راهنما صورت گیرد.

اینجانب **گولن دانش‌پورکر** دانشجوی رشته **صنایع غذایی** مقطع **کارشناسی‌ارشد** تعهدات فوق و ضمانت اجرایی آن را قبول کرده و به آن ملتزم می‌شوم.

تقدیم به

همسر و پسرم عدنان

که بهترین دلیل برای حیاتم هستند.

و

پدر و مادرم که شکوه بی بدیل و ابدی زندگیم هستند.

و

برادر و خواهرم

که صمیمانه دوستشان دارم.

تقدیر و تشکر

سپاس خداوندی را که اگر لطف بی کرانش نبود تلاش و پویش بی معنا می شد. او که در تمام لحظه های سهل و سخت بود و چگونه بودن را به من آموخت. گذراندن مراحل اجرائی و تدوین این پایان نامه پس از الطاف الهی مدیون راهنمایی و همفکری بزرگوارانی است که بی تردید بدون همراهی آنان طی این طریق با مشکلات فراوان همراه بود لذا بر خود لازم می دانم مراتب سپاس خود را به کلیه کسانی که در مراحل مختلف این پژوهش مرا یاری نمودند، اعلام دارم.

تشکر صمیمانه خود را تقدیم **پدر و مادر** گرانقدر و بزرگوارم می کنم که وجودشان همواره مایه آرامش و نگاه گرمشان پشتیبان لحظه لحظه زندگی ام بوده است. آنان که اگر دلگرمی صداقتشان نبود، هرگز شکوه لحظه بالیدن به باور رفتن و رسیدن مهیا نمی شد.

از **همسر مهربانم** که با تمام وجود سختی ها همواره راه امیدواری را به من نشان داد و در این راه پشتیبانم بود با تمام وجود سپاسگزارم.

از استاد راهنمای محترم و بزرگوار **جناب آقای دکتر مقصود لو** که مسئولیت این پایان نامه را تقبل نمودند و در مراحل انجام آن مرا از راهنمایی های ارزشمند خود بهره مند ساختند، کمال تشکر و امتنان را دارم. نهایت سپاس قلبی خود را تقدیم حضور استاد مشاور محترم و ارجمند **جناب آقای دکتر معتمدزادگان** می دارم که با تقبل مشاورت پایان نامه و راهنمایی های ارزشمند خود مراتب ارتقاء آن را فراهم ساختند و در تمام لحظات تحقیق با صبر و حوصله همگام من بودند. از استاد مشاور فرزانه **خانم دکتر بهاره شعبان پور** که به من آموختند چگونه در سایه صبر و کوشش، بیاموزم آنگونه که باید آموخت و چگونه دشواری ها را به پشتوانه علم آموزی پشت سر بگذارم، سپاسگزارم. از ایشان که در مراحل انجام این تحقیق همواره از دقت نظر و رهنمودهای ارزنده شان بهره برده ام صمیمانه قدردانی می نمایم.

از اساتید گرانقدر **جناب آقای دکتر صادقی ماهونک** و **جناب آقای دکتر قربانی** به پاس قبول زحمت داوری و ارائه نقطه نظرات ارزشمندشان سپاسگزارم.

از مساعدت و لطف نماینده محترم تحصیلات تکمیلی **جناب آقای دکتر زینلی** نهایت سپاسگزاری را دارم.

از اساتید محترم گروه علوم و صنایع غذایی، مسئولین محترم آزمایشگاه های صنایع غذایی، مسئولین و دست اندرکاران دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گلستان، همچنین کادر محترم آزمایشگاه مرکزی کمال تشکر را دارم.

از **برادر، خواهر و پسر عزیزم** که همواره پشتیبان و مشوق من در مراحل مختلف زندگی بوده است، سپاسگزارم. همچنین از تمامی **دوستان** عزیزی که در مراحل مختلف تحقیق از هر گونه همکاری دریغ نورزیدند قدردانی می کنم.

چکیده

افزایش جمعیت جهان و به دنبال آن افزایش نیاز به مواد پروتئینی استفاده از مواد جانبی کارخانه‌های فرآوری مواد غذایی را مورد توجه قرار داده است. یکی از روش‌های بازیافت پروتئین، هیدرولیز قلیایی و اسیدی است. در این تحقیق امعاء و احشاء ماهی تون (*Thunnus albacares*) در دمای محیط با استفاده از هیدروکسید سدیم ۳ مولار هیدرولیز قلیایی و در دمای ۴۰°C با استفاده از اسیدکلریدریک ۲ مولار هیدرولیز اسیدی شد. میزان پروتئین محلول در هیدرولیز قلیایی و اسیدی بترتیب ۷۳/۵۳ mg/ml و ۱۰/۵٦ با درجه هیدرولیزی ۲۰/۰۷ و ۱۳/۹۲ و طول زنجیره پپتیدی ٤/۹۸ و ۷/۱۸ و نقطه ایزوالکتریک حدود ٦ و ۱۰ بدست آمد. حلالیت پروتئین هیدرولیز شده در دو نوع نمک کلرید سدیم و کلرید کلسیم با سه غلظت ۰/۵، ۱ و۲ مولار و ویسکوزیته آن با سه غلظت ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در سه دمای ۳۰، ٤۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که حلالیت پروتئین در دو نوع نمک اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). به‌طوری‌که حلالیت پروتئین اسیدی در کلرید کلسیم با غلظت ۰/۵ مولار بیشتر بود. ویسکوزیته پروتئین هیدرولیز شده اسیدی و قلیایی در سه دما با سه غلظت مختلف اختلاف معنی‌داری داشت ($p<۰/۰۵$). با افزایش دما میزان ویسکوزیته کاهش و با افزایش غلظت میزان ویسکوزیته افزایش می‌یافت. پروتئین در غلظت ۱۰ mg/ml و دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد کمترین و با غلظت ۳۰ mg/ml و در دمای ۱۰ درجه سانتی‌گراد بیشترین ویسکوزیته را داشت. ظرفیت امولسیون‌کنندگی محلول‌های پروتئینی هیدرولیز شده‌ی قلیایی و اسیدی در غلظت‌های پروتئینی ۰/۰۳، ۰/۰٦، ۰/۰۹، ۰/۱۲ و ۰/۱۵ درصد مورد بررسی قرار گرفت. مقایسه میانگین‌های ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین‌های قلیایی و اسیدی در غلظت‌های مختلف پروتئین نشان داد که میان ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده اسیدی و قلیایی اختلاف معنی‌دار بود ($p<۰/۰۵$). در غلظت‌های مختلفی از پروتئین، ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده ابتدا تا یک حد ماکزیمم افزایش و سپس کاهش یافت. رنگ نمونه‌های پروتئین هیدرولیزشده اسیدی و قلیایی مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. نتایج نشان داد که بین پارامترهای رنگ پروتئین هیدرولیزشده قلیایی و اسیدی اختلاف معنی‌داری وجود داشت ($p<۰/۰۵$). در الگوی الکتروفورز، پروتئین هیدرولیزشده قلیایی باندهای پپتیدی با وزن مولکولی ۷۰، ۵۰، ٤۰ و ۳۰ کیلودالتون و در پروتئین هیدرولیزشده اسیدی دو باند پپتیدی با وزن مولکولی ۱۵۰ و ۳۰ کیلودالتون مشاهده گردید. در این تحقیق مقایسه میانگین ساده در برخی صفات (راندمان، درجه هیدرولیزی، طول زنجیره پپتیدی) و فاکتوریل بدون اختلاط در قالب طرح کاملاً تصادفی برای صفات مختلف از جمله ویسکوزیته، ظرفیت امولسیون‌کنندگی، حلالیت در pH های مختلف انجام شد.

واژه‌های کلیدی: پروتئین هیدرولیزشده قلیایی و اسیدی، ماهی تون زردباله، حلالیت، ویسکوزیته

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه و کلیات

۱-۱ مقدمه ۲

۱-۲ کلیات ۳

۱-۲-۱ ارزش غذایی ماهی ۳

۱-۲-۲ تاریخچه پروتئین هیدرولیزشده ۳

۱-۲-۳ منابع پروتئینی مورد استفاده برای تولید پروتئین هیدرولیزشده ۳

۱-۲-٤ کاربردهای پروتئین هیدرولیزشده ٤

۱-۲-۵ خواص درمانی پروتئین هیدرولیزشده ٤

۱-۲-٦ روش‌های تولید پروتئین هیدرولیزشده ۵

۱-۲-٦-۱ روش‌های شیمیایی جهت هیدرولیز پروتئین ۵

۱-۲-٦-۲ روش‌های بیوشیمیایی جهت هیدرولیز پروتئین ٦

۱-۳ حلالیت پروتئین هیدرولیزشده ۷

۱-٤ خصوصیت امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیزشده ۸

۱-۵ بیان مسئله و اهمیت تحقیق ۸

۱-٦ اهداف ۹

۱-٦-۱ اهداف کلی ۹

۱-٦-۲ اهداف جزئی ۱۰

۱-۷ فرضیات ۱۰

فصل دوم: بررسی منابع

۲-۱ انواع واکنش‌های هیدرولیزی ۱۲

۲-۱-۱ پروتئین هیدرولیز شده تحت شرایط اسیدی و قلیایی ۱۲

۲-۱-۲ پروتئین هیدرولیز شده با استفاده از آنزیم ۱۳

۲-۲ تأثیر هیدرولیز بر روی خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده ۱٤

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۲-۲-۱ درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی ۱٤
۲-۲-۲ تأثیر هیدرولیز بر روی حلالیت پروتئین ۱۵
۲-۲-۳ تأثیر هیدرولیز بر روی ظرفیت امولسیون‌کنندگی پروتئین ۱٦
۲-۲-٤ تأثیر هیدرولیز بر روی ترکیب آمینواسیدهای پروتئین ۱٦
۲-۲-۵ تأثیر هیدرولیز بر روی ویسکوزیته پروتئین ۱۸
۲-۲-٦ تأثیر هیدرولیز بر وزن مولکولی پروتئین هیدرولیزشده ۱۸
۲-۲-۷ تأثیر هیدرولیز بر روی خاصیت آنتی‌اکسیدانی پروتئین ۱۹
۲-۳ استفاده از پروتئین هیدرولیزشده در محیط‌های کشت ۲۰

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱ مواد و تجهیزات مورد استفاده ۲۲
۳-۲ روش کار ۲۳
۳-۲-۱ تهیه ضایعات ماهی تون و آماده‌سازی نمونه ۲۳
۳-۲-۲ فرآیند استخراج پروتئین هیدرولیزشده به دو روش اسیدی و قلیایی از ضایعات ماهی تون ۲٤
۳-۳ اندازه‌گیری پروتئین به روش بیورت ۲۵
۳-٤ تعیین بازده استخراج ۲۵
۳-۵ SDS-PAGE و تخمین وزن مولکولی ۲٦
۳-۵-۱ تهیه ژل در قالب ۲٦
۳-۵-۲ آماده‌سازی نمونه و اجرای الکتروفورز ۲٦
۳-۵-۳ تخمین وزن مولکولی ۲۸
۳-٦ اندازه گیری میزان حلالیت نمونه‌های پروتئینی هیدرولیزشده در pHهای مختلف و تعیین نقطه ایزوالکتریک ۲۸
۳-۷ اندازه‌گیری درجه هیدرولیز ۲۹
۳-۸ اندازه‌گیری طول زنجیره پپتیدی ۲۹

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۳-۹ اندازه‌گیری ظرفیت و پایداری امولسیون ۳۰
۳-۱۰ اندازه‌گیری حلالیت در محلول‌های کلریدسدیم و کلرید کلسیم ۳۰
۳-۱۱ اندازه‌گیری ویسکوزیته ۳۱
۳-۱۲ رنگ ۳۲
۳-۱۳ طرح آزمایشی ۳۲

فصل چهارم: نتایج و بحث

٤-۱ ترکیبات امعا و احشا ماهی تون ۳٦
٤-۲ درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده ۳٦
٤-۳ pH، بازده استخراج و میزان پروتئین هیدرولیزشده ۳۷
٤-٤ حلالیت پروتئین هیدرولیزشده در pHهای مختلف و تعیین نقطه ایزوالکتریک پروتئین هیدرولیزشده ۳۸
٤-٥ حلالیت پروتئین هیدرولیزشده در نمک‌های کلریدسدیم و کلریدکلسیم با غلظت‌های مختلف ٤۱
٤-٦ پایداری و ظرفیت امولسیون، پروتئین هیدرولیز شده ٤۲
٤-۷ رنگ پروتئین هیدرولیز شده ٤٤
٤-۸ ویسکوزیته پروتئین هیدرولیز شده ٤٦
٤-۹ وزن مولکولی پروتئین هیدرولیز شده ٤۷

جمع‌بندی و پیشنهادات ٥۲

منابع ٥٥

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

۳-۱- فهرست مهمترین مواد شیمیایی مورد استفاده در آزمایش ۲۲
۳-۲- فهرست تجهیزات و دستگاه‌های مورد استفاده ۲۳
۳-۳- فرمولاسیون ژل پایین (جداکننده) SDS-PAGE (۱۲٪) ۲۷
۳-٤- فرمولاسیون ژل بالا (متراکم کننده) SDS-PAGE (۵٪) ۲۷
۳-۵- محلول‌های لازم جهت اجرای الکتروفورزورنگ آمیزی ژل ۲۸
٤-۱- تعیین ترکیبات مختلف امعا و احشا ماهی‌تون (براساس وزن خشک) ۳٦
٤-۲- درجه هیدرولیز و طول زنجیره پپتیدی پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی ۳۷
٤-۳- PH، بازده استخراج و میزان پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی ۳۸
٤-٤- مقایسه میانگین حلالیت پروتئین هیدرولیز شده اسیدی و قلیایی در pHهای مختلف ۳۸
٤-۵- مقایسه میانگین حلالیت پروتئین هیدرولیز شده اسیدی و قلیایی در نمک‌های کلریدسدیم و کلرید کلسیم با غلظت‌های مختلف ٤۱
٤-٦- میزان پایداری امولسیون پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی ٤۳
٤-۷- مقایسه میانگین ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هیدرولیزشده قلیایی و اسیدی در غلظت‌های مختلف پروتئین ٤۳
٤-۸- پارامترهای رنگ هانتر برای دو پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی ٤۵

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

۳-۱- شماتیک استخراج پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی از ضایعات ماهی‌تون ۲٤
۳-۲- منحنی استاندارد آلبومین سرم گاوی جهت تعیین میزان پروتئین به روش بیورت ۲۵
۳-۳- دستگاه هموژنایزر ۳۰
۳-٤- ویسکومتر بروکفیلد جهت اندازه‌گیری ویسکوزیته ۳۱
۳-۵- لاویباند جهت اندازه‌گیری رنگ ۳۲
٤-۱- روند تغییرات میزان حلالیت پروتئین هیدرولیز شده قلیایی در pHهای مختلف ۳۹
٤-۲- روند تغییرات میزان حلالیت پروتئین هیدرولیز شده اسیدی در pHهای مختلف ۳۹
٤-۳- روند تغییرات میزان حلالیت پروتئین هیدرولیز شده اسیدی و قلیایی در نمک‌های کلرید سدیم و کلرید سدیم با غلظت‌های مختلف ٤۲
٤-٤- روند تغییرات ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی در غلظت‌های مختلف پروتئین ٤۳
٤-۵- ویسکوزیته پروتئین هیدرولیز شده قلیایی با غلظت‌های ۳۰،۲۰،۱۰ mg/ml در دماهای مختلف ٤٦
٤-٦- ویسکوزیته پروتئین هیدرولیز شده اسیدی با غلظت‌های ۳۰،۲۰،۱۰ mg/ml در دماهای مختلف ٤۷
٤-۷- الگوی الکتروفورز نمونه‌های پروتئین هیدرولیز شده قلیایی و اسیدی حاصل از امعا و احشا ماهی‌تون (SDS-PAGE احیا شده) ٤۸
٤-۸- نمودار استاندارد وزن مولوکولی مارکر جهت آزمون SDS-PAGE ٤۹

فصل اول

مقدمه و کلیات

۱-۱- مقدمه

سیر رو به رشد جمعیت جهان و متعاقب آن افزایش نیازهای پروتئینی این جمعیت و کمبود مواد غذایی به‌خصوص پروتئین با کیفیت بالا، سبب گردیده است تا در دو دهه اخیر توجه خاصی به منابع خوراکی دریایی مبذول گردد و مطالعات بیشتری در زمینه آبزیان انجام گیرد. به هر حال وجود نیازهای تغذیه‌ای به خصوص در کشورهای در حال توسعه و امکان تامین قسمتی از آن از طریق منابع دریایی، ضرورت شناخت، توجه و بهره‌گیری بهینه از این منابع را به‌خوبی نشان می‌دهد (رضوی‌شیرازی، ۱۳۷۳).

میزان چشمگیری از فرآورده‌های جانبی غنی از پروتئین از کارخانه‌های فرآوری موادغذایی، بدون تلاش در بازیافت دور ریخته می‌شوند و آلودگی‌های زیست محیطی را به دنبال دارند بنابراین یافتن یک روش مناسب به‌عنوان جایگزینی برای دور ریختن این مواد، امری ضروری است. به‌طور کلی سالانه بیش از ۱۰۰ میلیون تن ماهی در دنیا صید می‌شود. احتمالاً بیش از ۵۰ درصد از بافت ماهیان، به‌صورت ضایعات غیرقابل مصرف در می‌آید و تنها ۵۰ درصد توسط انسان مصرف می‌شود (عباس‌زاده و همکاران، ۱۳۸۸). اولویت بسیاری از کشورها برای فیله‌های پوست‌گیری شده بدون استخوان و فراورده‌های تهیه شده از گوشت بدون استخوان باعث افزایش ضایعات در صنعت موادغذایی شده است (واسوا و همکاران، ۲۰۰۷). تحقیقات مختلفی جهت بررسی و امکان بکارگیری فراورده‌های جانبی ماهیان گوناگون انجام شده است که در نتیجه آنها بسیاری از ترکیب‌های با ارزش به ویژه پروتئین را می‌توان از فراورده‌های جانبی حاصل از فرآوری ماهی جداسازی کرد (روستاد، ۲۰۰۳). یکی از راه‌های مهم جهت بازیافت پروتئین‌ها، هیدرولیز فرآورده‌های جانبی است که امروزه به روش‌های متفاوتی نظیر هیدرولیز با آنزیم، هیدرولیز با قلیا، هیدرولیز با اسید و هیدرولیز حرارتی انجام می‌گیرد (فنتلاکیس و لاهم، ۱۹۹۸). حدودا ۱٤٪ از پروتئین حیوانی موردنیاز و ۵-٤٪ از کل پروتئین موردنیاز انسان از طریق فرآورده‌های دریایی تامین می‌گردد. پروتئین‌های ماهی حاوی آمینواسیدهای ضروری و با قابلیت هضم بسیار بالا می‌باشند (روستاد، ۲۰۰۳). از پروتئین هیدرولیز شده به‌عنوان تقویت‌کننده طعم در شیرینی‌جات، تثبیت‌کننده در نوشیدنی‌ها، مکمل پروتئینی در فرمولاسیون مواد غذایی (کریستنسن و راسکو، ۲۰۰۰) و همچنین به عنوان جایگزین پروتئین در غذاهای آلرژی‌زا استفاده می‌شود (محمود و کردل، ۲۰۰۰).

۱-۲- کلیات

۱-۲-۱- ارزش غذایی ماهی

ماهی یکی از مهمترین منابع پروتئینی حیوانی برای بسیاری از مردم دنیا است. از نظر تغذیه‌ای پروتئین‌های ماهی درجه هضم بالایی دارند. کیفیت پروتئین‌های آنها با توجه به اسیدهای آمینه ضروری آن از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است. ماهی غنی از پروتئین (۱۵ تا ۲۰ درصد)، فسفر، گوگرد، آهن (آهن کمتری نسبت به گوشت دارد)، مس و ید است، همچنین غنی از ویتامین‌های گروه B می‌باشد.

ماهی‌های چرب حاوی مقادیر قابل توجهی ویتامین‌های A و D هستند. ماهی تون جزء ماهیان چرب و از خانواده اسکومبریده[1] و از ماهی‌های دریایی می‌باشد. از مشخصات عمومی و مشترک آنها بدن دوکی شکل، بالچه‌های کوچک دمی، دو باله پشتی تیز و دندان‌های رشد کرده می‌باشد. این ماهی‌ها دارای جنس و گونه‌های متعددی می‌باشند. مهمترین گونه‌های ماهی‌های تون آب‌های جنوبی ایران که در تهیه کنسرو مورد استفاده قرار می‌گیرند به شرح زیر می‌باشند.

* تون دم‌دراز (Thunnus tonggol)
* تون مسقطی با شکم مخطط (Katsu wonus pelamis)
* تون زردباله (Thunnus albacares) (ستاری و همکاران، ۱۳۸۳).

ماهی تون حاوی مقدار قابل توجهی پروتئین می‌باشد که در قسمت‌های مختلف بدن از جمله گوشت، پوست، دم، باله، سر و... توزیع شده است. در مرحله آماده‌سازی ماهی برای کنسروسازی، انجماد و سایر روش‌های نگهداری و فرآوری، پوست، دم، باله، سر، امعا و احشا بعنوان ضایعات جدا می‌شوند که خود حاوی مقدار زیادی پروتئین می‌باشند. از این ضایعات می‌توان جهت تولید پروتئین هیدرولیزشده استفاده نمود.

۱-۲-۲- تاریخچه پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین‌های هیدرولیزشده به پروتئین‌هایی که بطور شیمیایی یا آنزیمی به پپتیدهایی با اندازه‌های مختلف شکسته می‌شوند گفته می‌شود. برای هیدرولیز پروتئین‌ها از روش‌های شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می‌شود (اسکاندربی، ۱۹۹٤).

1. Scombridae

فرآیند هیدرولیز پروتئین اولین بار در سال ۱۹٤۰ بر روی پروتئین‌های شیر و سبزیجات به‌علت کاربرد گسترده آن‌ها در صنعت غذا انجام شد. در سال‌های بعد از آن تحقیقات زیادی جهت یافتن و تولید منابع پروتئینی با ارزش تغذیه‌ای بالا و ارزان قیمت انجام گردید. این تلاش‌ها منجر به تولید کنسانتره پروتئین ماهی شد (رادها و همکاران، ۲۰۰۷). فعالیت‌ها در زمینه هیدرولیز پروتئین‌ها همچنان ادامه یافت. به‌طوری‌که در سال ۱۹٦۰ از پروتئین هیدرولیزشده بعنوان مکمل پروتئینی در مواد غذایی استفاده گردید (هیل و مرریت، ۱۹۹٤).

۱-۲-۳- منابع پروتئینی مورد استفاده برای تولید پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین‌های حیوانی و گیاهی هر دو به‌دلیل کیفیت تغذیه‌ای بالایی که دارند برای تولید پروتئین هیدرولیز شده استفاده می‌شوند. از جمله پروتئین‌هایی که جهت هیدرولیز استفاده شده‌اند می‌توان پروتئین شیر گاو، آب پنیر، سویا، برنج، نخود، آلبومین تخم مرغ، ژلاتین و ماهی را نام برد. معیارهای پروتئینی که جهت هیدرولیز شدن انتخاب می شود شامل کیفیت تغذیه‌ای پروتئین، میزان در دسترس بودن آن، قیمت، کیفیت ارگانولپتیکی و حلالیت آن است (محمود و کردل، ۲۰۰۰).

۱-۲-٤- کاربردهای پروتئین هیدرولیز شده

استفاده از پروتئین هیدرولیز شده به عنوان یک جزء در ترکیب مواد غذایی به سبب تأثیر آن در کاهش ضایعات مؤثر بوده است. این فاکتور باعث شده که ضایعات غیر مصرفی ماهی که دارای ارزش کمی برای مصرف هستند به تولیداتی با ارزش تبدیل شوند (روستاد ، ۲۰۰۳).

پروتئین هیدرولیز شده به‌عنوان تقویت‌کننده طعم در شیرینی‌جات، تثبیت‌کننده در نوشابه‌ها و به‌عنوان مکمل پروتئینی درصنایع غذایی استفاده می‌شود و از نظر کیفیت و ارزش غذایی بسیار بالا می‌باشد. علاوه بر صنعت غذا به‌عنوان منبع نیتروژن برای رشد میکروارگانیسم‌های مختلف استفاده شده است. ترکیب شیمیایی پروتئین هیدرولیز شده ماهی به آن اجازه داده که حتی از آن به عنوان کود هم استفاده شود که نتایج خوبی را نشان داده است. تاثیر این ماده بر روی رشد گیاهان بررسی شده است به طوری که نتایج نشان داده است که دو ماده‌ی پرولین و گلوتامات تاثیر بیشتری در رشد گیاهان داشته‌اند. این دو ماده را می‌توان در پروتئین هیدرولیز شده ماهی یافت. از دیگر کاربرد آن

می‌توان استفاده از آن در خوراک حیوانات را نام برد که به‌خاطر تعادل آمینواسیدی و محتوای پروتئینی بالای آن می‌تواند مطلوب باشد. از دیگر خصوصیات این ماده فعالیت آنتی‌اکسیدانی است که میزان تاثیر آنتی‌اکسیدانی، به ترکیب آمینواسیدی و سایز پپتیدهای آن بستگی دارد (دنگ و همکاران، ۲۰۰۸). پروتئین هیدرولیزشده در غذاهایی که در برخی افراد ایجاد آلرژی می‌کنند به‌عنوان جایگزین پروتئین آن ماده غذایی مورد استفاده قرار می‌گیرند و دارای مزایای زیر می‌باشند:

- به‌خاطر کوچک بودن پپتیدها بهتر قابل جذب هستند.
- واکنش‌های شیمیایی بین آنها ضعیف است.

پروتئین هیدرولیز شده کاربرد وسیعی در صنایع مختلف از قبیل داروسازی، غذای انسانی، غذای حیوانات و مواد آرایشی و بهداشتی دارد (بونووسولانو و همکاران، ۲۰۰۹). از پروتئین هیدرولیز شده در اصلاح بافت، افزایش حلالیت ماده غذایی در رنج وسیعی از pH و افزایش ظرفیت نگهداری آب و تقویت ارزش تغذیه‌ای ماده غذایی استفاده می‌شود (لین و همکاران، ۱۹۹۷). حتی از پروتئین هیدرولیز شده در تولید اسید لاکتیک هم استفاده شده است (گااو و همکاران، ۲۰۰٦).

۱-۲-۵- خواص درمانی پروتئین هیدرولیز شده

پروتئین‌های هیدرولیز شده در تولید پادتن نقش مهمی ایفا می‌کنند. همچنین باعث ایجاد ایمنی در بدن می‌شوند زیرا مولکول‌های پروتئین هیدرولیز شده در تولید آنتی‌بادی‌ها توانایی لازم را دارند. با توجه به گزارشات پی‌کت و همکاران (۲۰۰٦) پروتئین هیدرولیزشده ماهی بر روی سلول‌های سرطانی سینه تأثیرگذار بوده و مانع رشد آن سلول‌ها می‌شود. پپتیدهایی با وزن مولکولی ۷ کیلو دالتون تاثیر بیشتری بر روی سلول‌های سرطانی داشتند که آن‌ها را پپتیدهای ضدسرطان نام نهادند (پی‌کت و همکاران، ۲۰۰٦). همچنین پروتئین هیدرولیز شده در کنترل قند خون از طریق تأثیر بر میزان تولید انسولین در سلول‌های بتا پانکراس موثر می باشند (مانینن، ۲۰۰٤).

۱-۲-٦- روش‌های تولید پروتئین هیدرولیز شده

برای تولید پروتئین هیدرولیزشده از روش‌های مختلفی از جمله شیمیایی و بیولوژیکی استفاده می‌شود.

۱-۲-٦-۱- روش‌های شیمیایی جهت هیدرولیز پروتئین

هیدرولیز شیمیایی پروتئین‌ها بوسیله شکافتن باندهای پپتیدی با اسید یا باز انجام می‌شود. این روش در گذشته در صنایع کاربرد داشته زیرا نسبتاً ارزان قیمت بوده و درعین حال دارای محدودیت‌هایی است:

۱- موادغذایی با مواد شیمیایی مختلفی تماس پیدا می‌کند که روی خصوصیت ساختاری آن تأثیر می‌گذارد.

۲- پروتئین هیدرولیز شده با مواد شیمیایی قوی و حلال‌ها در دما و pH بالا تماس پیدا می‌کند به‌طوری‌که محصول تولیدی از نظر کیفیت تغذیه‌ای کاهش می‌یابد.

۳- هیدرولیز شیمیایی همچنین باعث تخریب شکل L آمینواسیدها و تشکیل فرم D آمینواسیدها می‌شود.

الف) هیدرولیز اسیدی:

بطور معمول هیدرولیز اسیدی پروتئین‌ها بیشتر از هیدرولیز تحت شرایط قلیایی استفاده می‌شود. اگرچه این فرآیند به سختی کنترل می گردد اما این روش هنوز هم ترجیح داده می‌شود. مصرف بیشتر این نوع پروتئین‌ها در ایالات متحده آمریکا گزارش شده است. تهیه این نوع پروتئین‌ها از منابع پروتئینی مانند سبزیجات ارزان‌تر می باشند. از پروتئین هیدرولیز شده اسیدی جهت تقویت طعم در گوشت‌ها، کراکرها و مخلوط سوپ‌های آماده استفاده می‌شود. در هیدرولیز اسیدی پروتئین ماهی از اسید کلریدریک یا در تعدادی از موارد اسید سولفوریک استفاده می‌شود. هیدرولیز اسیدی بر روی آمینواسید تریپتوفان تأثیر می‌گذارد که یک آمینواسید ضروری است. از ماده هیدرولیز شده به روش اسیدی در محیط کشت میکروبی هم استفاده می‌گردد (ارلو و همکاران، ۱۹۷۹).

ب) هیدرولیز قلیایی:

در واکنش‌های هیدرولیز قلیایی از هیدروکسید سدیم استفاده می‌شود. پروتئین هیدرولیز شده دارای ساختار ضعیفی است. هیدرولیز قلیایی تأثیر زیادی بر ارزش غذایی ماده هیدرولیز شده می‌گذارد. این مسئله باعث محدود شدن کاربرد آن در صنعت غذا برای بازیافت پروتئین شده است. در طی هیدرولیز قلیایی آمینواسید فرم L به نوع D تبدیل می‌شود که بوسیله بدن انسان قابل جذب نمی‌باشد (لاهل و بران، ۱۹۹٤).

۱-۲-٦-۲- روش‌های بیوشیمیایی جهت هیدرولیز پروتئین

هیدرولیز بیوشیمیایی که برای هیدرولیز پروتئین‌های ماهی یا دیگر مواد غذایی استفاده می‌شود بوسیله‌ی فعالیت آنزیم‌ها بر روی باندهای پپتیدی انجام می‌شود. آنزیم‌های مورد استفاده به‌منظور هیدرولیز بیوشیمیایی می‌توانند دارای منشا گیاهی مانند آنزیم پاپاین (شهیدی و همکاران، ۱۹۹۵) یا با منشا جانوری مانند پپسین، کیمو تریپسین و تریپسین (ویرا و همکاران، ۱۹۹۵) و یا با منشا میکروبی باشند که کاربرد آنزیم‌هایی با منشا میکروبی به‌علت پایداری بیشتر در pH و دماهای مختلف بسیار گسترده‌تر است (اویسی‌پور و قمی، ۱۳۸۸).

الف) هیدرولیز آنزیمی:

آنزیم‌ها کاتالیست‌های بیوشیمیایی هستند زیرا آنها واکنش‌های شیمیایی را بین مواد آلی در سلول‌ها سرعت هند. هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها یک فرآیند پیچیده است. پارامترهایی از قبیل pH، دما، زمان و نسبت آنزیم به نمونه بر روی این فرآیندها تاثیر گذارند که تأثیر این فاکتورها با توجه به نوع آنزیم متفاوتند و باعث تولید پروتئین هیدرولیز شده با خصوصیات مختلفی می‌شوند و با توجه به آن خصوصیات کاربرد پروتئین هیدرولیزشده متفاوت می‌شود (ریچاردسن و هیسلپ، ۱۹۸٤).

معایب روش هیدرولیز آنزیمی:

گران قیمت بودن آنزیم مورد استفاده

واکنش به سختی قابل کنترل هستند

بازده کم

نیاز به غیر فعال‌سازی آنزیم‌ها بوسیله‌ی pH یا فرآیند گرمایی در پایان واکنش

غیر قابل استفاده بودن آنزیم مورد استفاده در واکنش (کریستنسن و راسکو، ۲۰۰۰).

ب) هیدرولیز خود هضمی:

یک فرآیند خود هضمی به فعالیت آنزیم‌های هضمی در خود ماهی بستگی دارد (جام‌دار و هاریکومار، ۲۰۰۸). این هیدرولیز یک فرآیند ساده است. محصول نهایی از هیدرولیز خود هضمی به‌طور کلی یک مایع ویسکوز غنی از آمینواسیدهای آزاد و پپتیدهای کوچک است. از جمله آنزیم‌های هضمی می‌توان تریپسین و کیموتریپسین را نام برد (شهیدی و همکاران، ۱۹۹۵). فرآیند هیدرولیز خود هضمی توسط مخلوطی از آنزیم‌های گوارشی که محدوده فعالیت متفاوتی دارند انجام می‌گیرد. در

نتیجه این فرآیند پروتئین هیدرولیزشده تولیدی از پپتیدهایی با سایز مولکولی مختلف تشکیل شده‌اند (کریستنسن و راسکو، ۲۰۰۰).

۱-۳- حلالیت پروتئین هیدرولیز شده

حلالیت یک خصوصیت مهم پروتئین هیدرولیز شده است که بر روی دیگر خصوصیات آن از قبیل امولسیون‌کنندگی و کف‌کنندگی تأثیر می‌گذارد. می‌توان گفت که در کاربرد پروتئین هیدرولیز شده نقش مهمی را بازی می‌کند. فاکتور مهم موثر برروی میزان حلالیت پروتئین‌ها میزان آب‌گریزی آنها است (ویل‌دینگ و همکاران، ۱۹۸٤). میزان حلالیت پروتئین هیدرولیز شده بوسیله شاخص حلالیت نیتروژن (NSI)[1] سنجیده می‌شود. NSI به‌صورت میزان نیتروژن محلول به نیتروژن کل در نمونه محاسبه می‌شود (لیندر و همکاران، ۱۹۹٦). هیدرولیزی که در شرایط قلیایی بالا انجام شود کاهش در وزن مولکولی و افزایش در میزان حلالیت را نشان می دهد (کواگلیا و اربان، ۱۹۸۷).

پروتئین‌ها در محدوده وسیعی از pH و دما حلالیت بالایی دارند. هیدرولیز شدن میزان حلالیت را در نقطه ایزوالکتریک افزایش می‌دهد. از این خصوصیت در تولید نوشیدنی‌های میوه‌ای اسیدی استفاده می‌شود (محمود و کردل، ۲۰۰۰). پروتئین هیدرولیز شده با حلالیت بالا در تولید فرآورده‌های نانوایی همچنین به‌عنوان منبع نیتروژن در محیط کشت میکروبی بکار برده می‌شود (گیلدبرگ، ۱۹۹۳).

۱-٤- خصوصیت امولسیون‌کنندگی پروتئین هیدرولیز شده

امولسیون سیستم هتروژنی است که شامل دو مایع غیر قابل اختلاط می باشد و یکی از مایع‌ها در دیگری بصورت قطره‌هایی با قطر بالاتر از ۰/۱ میکرون پراکنده شده است.این سیستم ها پایداری کمی دارند و پایداری آنان را می‌توان توسط عوامل فعال سطحی و مواد دیگر افزایش داد در غذاها امولسیون‌ها معمولاً شمال دو فاز روغن و آب هستند. اگر آب فاز مداوم و روغن فاز پراکنده را تشکیل دهد امولسیون از نوع روغن در آب و برعکس اگر آب فاز پراکنده و روغن فاز پیوسته را تشکیل دهد امولسیون از نوع آب در روغن خواهد بود.

1. Nitrogen solubility index

پروتئین هیدرولیزشده جزء مواد فعال سطحی هستند و باعث ایجاد امولسیون روغن در آب می‌شوند. دارای گروه‌های هیدروفیلیک و هیدروفوبیک هستند و در آب محلولند. مقدار پروتئین و آمینواسیدها بر روی ظرفیت امولسیون‌کنندگی تأثیر گذارند. ظرفیت امولسیون‌کنندگی با افزایش محتوای پروتئینی در پروتئین هیدرولیز شده ماهی افزایش می یابد. ارتباطی بین پایداری امولسیون با مقدار پروتئین یافت نشده است. همچنین ظرفیت امولسیون کنندگی پروتئین هیدرولیز شده با افزایش درجه هیدرولیزی کاهش می‌یابد (کریستنسن، ۱۹۹۸). یک تحقیق نشان داد که پپتیدهای کوچک و آمینواسیدهای آزاد خصوصیت امولسیون کنندگی را در مقایسه با پپتیدهای بزرگتر کاهش می‌دهد (سلیزیت و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۵- بیان مسئله و اهمیت تحقیق

فرآورده‌های جانبی کارخانه‌های فرآوری مواد غذایی از جمله کارخانه‌های کنسروسازی بدون استفاده، دور ریخته می‌شوند و یا به‌عنوان خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرند. امروزه با توجه به افزایش نیاز غذایی بویژه نیاز به مواد پروتئینی در جهان استفاده از این ضایعات مورد توجه قرار گرفته است. یکی از این روش‌ها جهت بازیافت پروتئین، فرآیند هیدرولیز می‌باشد. در این تحقیق پروتئین موجود در امعا و احشا ماهی با استفاده از روش هیدرولیز بازیافت و مورد بررسی قرار گرفت.

۱-٦- اهداف

هدف از این تحقیق، بررسی خواص پروتئین هیدرولیز شده‌ی تهیه شده از ضایعات ماهی تون به دو روش قلیایی و اسیدی است و در مجموع اهداف این تحقیق به دو دسته اهداف کلی و جزئی تقسیم شده و به‌ترتیب زیر می‌باشند.

۱-٦-۱- اهداف کلی

- تولید ماده با ارزش تکنولوژیکی بالا و پر مصرف
- استفاده بهینه و جلوگیری از به هدر رفتن ضایعات صنایع شیلاتی و کمک به بهداشت و حفظ محیط زیست

نتایج این پژوهش می‌تواند در دانشگاه‌ها، مراکز پژوهشی، شیلات ایران، صنایع شیلاتی و سایر صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرد.