

آماده انتشار

بررسی کارایی آنزیم استخراجی از باکتری باسیلوس سالسوس به عنوان جایگزین آلکالاز در هیدرولیز پروتئین

ضایعات میگو

شیمای خلعتبری^۱، مریم حسنی^{۲*}، مرتضی خوشوقت علی آبادی^۳

۱. دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران. رایانامه:

shima.khalatbari@yahoo.com

۲. نویسنده مسئول، استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران. رایانامه:

, mhasani@iaui.ac.ir mhasani81@yahoo.com

۳. استاد گروه مهندسی شیمی، واحد شاهرود، دانشگاه آزاد اسلامی، شاهرود، ایران. رایانامه: mkhaliabadi@gmail.com

Doi: 10.22069/japu.2025.23325.1929

تاریخ دریافت: 1403-11-26

تاریخ ویرایش: 1404-01-12

تاریخ پذیرش: 1404-02-07

چکیده

سابقه و هدف: پروتئین‌های هیدرولیز شده بدست آمده از محصولات جانبی شیلات، به دلیل داشتن پپتیدهای زیست فعال، دارای عملکردهای فیزیولوژیک متعددی هستند و به جهت داشتن خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی سلامتی انسان را ارتقا داده و از بروز بیماری‌های مزمن جلوگیری می‌کنند.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، ضایعات میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) پس از آماده‌سازی و فریزدرای شدن، با استفاده از آنزیم آلکالاز و آنزیم استخراجی از باکتری *Bacillus salusus* تحت شرایط مختلف دما، pH و زمان، هیدرولیز شدند. ویژگی‌های عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده از جمله درجه هیدرولیز، فعالیت و پایداری امولسیون و ظرفیت کف‌کنندگی مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج بدست آمده حاکی از پایین تر بودن توانایی آلکالاز در انجام هیدرولیز پروتئین، نسبت به آنزیم بدست آمده از باکتری سالسوس بود. نتایج نشان داد با گذشت زمان هیدرولیز، درجه هیدرولیز افزایش می‌یابد و بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین (۴۳/۸۰ درصد) مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم حاصل از باکتری در زمان ۳ ساعت و بالاترین مقدار (۳۹/۶۷ درصد) توسط آنزیم آلکالاز، در زمان ۵ ساعت بود. همچنین مشخص شد که نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری در طی زمان، تشکیل کف بیشتری نسبت به نمونه‌های هیدرولیز شده توسط آلکالاز داشتند. بالاترین میزان کف‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری باسیلوس و غلظت ۲ درصد پروتئین مشاهده شد. پایداری کف تولید شده در طول زمان در هر دو تیمار کاهش یافت و روند کاهش پایداری در تیمار هیدرولیز شده با آلکالاز کندتر بود. همچنین مشخص شد که نمونه‌های حاصل از هر دو آنزیم در غلظت ۰/۵ درصد بالاترین میزان پایداری امولسیون را نشان دادند.

نتیجه گیری: بررسی اخیر نشان می‌دهد آنزیم استخراجی از باکتری باسیلوس سالسوس می‌تواند به‌عنوان جایگزینی جدید، به‌صرفه و کارآمد برای آنزیم آلکالاز مورد استفاده قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: ضایعات میگو، هیدرولیز پروتئین، آلکالاز، باسیلوس سالسوس، پایداری کف

منابع دریایی به دلیل دارا بودن ویتامین‌های A و D و همچنین اسیدهای چرب ضروری چند غیر اشباع (به ویژه امگا ۳ نظیر^۱ DHA و^۲ EPA و امگا ۶) یکی از بهترین منابع غذایی و دارویی به شمار می‌رود (۱). ساختار اسید چرب این روغن و خواص دارویی آن در کاهش فشار خون، افزایش قدرت حافظه، تقویت سیستم ایمنی، جلوگیری از آلزایمر و شب کوری، درمان انواع سرطان و بیماری‌های قلبی، پوستی و چشم موثر می‌باشد. با وجود این مزایا، عمل آوری آبزیان با تولید ضایعاتی همچون پوست، سر، امعاء و احشا، اسکلت داخلی و ... همراه می‌باشد. در حالی‌که این محصولات جانبی یک منبع غنی از پروتئین و اسیدهای چرب غیر اشباع، همچنین ویتامین‌ها و مواد معدنی می‌باشند (۲). از این‌رو، تکنیک‌های فراوری ضایعات آبزیان می‌بایست به گونه‌ای باشد تا ضایعات را به محصولاتی با ارزش افزوده تبدیل کند. میگو یکی از سخت‌پوستان اصلی پرورشی در ایران است که ضایعات قابل توجهی را پس از فراوری، به جای می‌گذارد (۳). پپتیدهای ضد میکروبی جدا شده از منابع دریایی می‌توانند به عنوان مواد تشکیل دهنده در فرمولاسیون مواد غذایی برای ارتقاء

سطح سلامت مصرف کننده و بهبود عمر مفید محصولات غذایی و به صورت آنتی‌بیوتیک‌های طبیعی در صنعت دارو استفاده شود (۴).

برای جداسازی پپتیدها از پروتئین‌ها (هیدرولیز) از روش‌های مختلفی شامل تخمیر میکروبی، هیدرولیز شیمیایی متشکل از هیدرولیز اسیدی، قلیایی و هیدرولیز آنزیمی استفاده می‌شود. تخمیر میکروبی در زمینه هیدرولیز پروتئین‌ها کمتر موفقیت آمیز بوده است (۵، ۶)، هیدرولیز اسیدی باعث تخریب تریپتوفان شده و بعد از خنثی سازی کلرید سدیم تولید می‌شود. هیدرولیز با مواد قلیایی هم تولید اسید آمینه لیزین و آلانین می‌کند، که می‌تواند اثرات سمی به دنبال داشته باشد. در بین روش‌های مختلف، هیدرولیز آنزیمی به عنوان روش موثر در این زمینه شناخته شده است. زیرا هیدرولیز با آنزیم‌های درونی به عنوان روش سنتی هیدرولیز پروتئین‌ها شناخته می‌شود و از آنجایی‌که در این روش عوامل مختلفی همچون زمان (فصل صید)، تغذیه و عوامل محیطی موثر می‌باشند، کنترل شرایط هیدرولیز دشوار است. از این‌رو پپتیدهایی که بدست می‌آیند ممکن است حاوی خواص مورد نظر نباشند. اما هیدرولیز با افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (مثل کنترل دما، pH و ...) می‌-

¹ Docosahexaenoic acid

² Eicosapentaenoic acid

تواند زمینه را برای تولید پپتیدهایی با خواص زیست فعال متفاوت فراهم کند (۷). هیدرولیز با افزودن آنزیم در شرایط کنترل شده (کنترل دما، pH و ...) می‌تواند زمینه را برای تولید پپتیدهایی با خواص زیست فعال متفاوت فراهم کند و نکته‌ای که باید در این روش در نظر داشت این است که آنزیم‌هایی که بدین منظور استفاده می‌شوند، باید حداقل یک ویژگی داشته باشند و آن هم قابلیت استفاده در صنایع غذایی است و اگر آنزیم از منابع میکروبی بدست می‌آید، میکروارگانیسم تولید کننده آنزیم نباید بیماری‌زا باشد (۸). به طور کلی، آنزیم‌هایی با منشاء میکروبی نسبت به سایر آنزیم‌ها، دارای مزایای بیشتری هستند که از آن جمله می‌توان به پایداری بیشتر در برابر حرارت، pH و خصوصیات مناسب پروتئولیتیکی اشاره نمود (۹). اثر آنزیم در خصوصیات کاربردی پپتید مهم است زیرا تاثیر زیادی بر روی ساین مولکول‌ها و هیدروفوبیتی هیدرولیز شده‌ها دارد، بنابراین پپتیدهای به دست آمده پروفایل مولکولی متفاوت و سطح انرژی متفاوت دارند و بسته به آنزیم به کار برده شده این تنوع با خصوصیات کاربردی ارتباط دارد (۱۰). همچنین پروتئازهای میکروبی به علت رشد سریع میکروب‌ها، در مدت زمان نسبتاً کوتاهی با روش‌های تخمیری تولید می‌شوند. به همین دلیل است که نسبت به انواع حیوانی و

گیاهی ارجحیت داشته و اکثر پروتئازهای موجود منشأ میکروبی دارند (۱۱). پروتئین هیدرولیزه از آبزیان در طیف وسیعی از pH های مختلف دارای حلالیت مناسبی می‌باشد و معمولاً حرارت زیادی را بدون ایجاد رسوب تحمل می‌کند. به علاوه سبب بهبود خواص بافت، امولسیون کنندگی، کف کنندگی، ظرفیت نگهداری آب و پایداری فرآورده‌های غذایی می‌گردند (۱۲). همچنین پروتئین‌های هیدرولیزه ویژگی‌های عملکردی را نشان می‌دهند و هر ویژگی عملکردی به ترکیب، توالی اسید آمینه و اندازه پروتئین هیدرولیز شده بستگی دارد (۷). اغلب پپتیدهای آنتی اکسیدانی که تاکنون شناسایی شده‌اند کوتاه زنجیر و حاوی آمینواسیدهای هیدروفوب در توالی خود می‌باشند. آن‌ها به طور قابل ملاحظه‌ای به تخلیه رادیکال‌های آزاد کمک می‌کنند، زیرا زنجیره‌های جانبی فنولی آن‌ها به عنوان اهداکنندگان الکترونی قوی عمل می‌کنند و بدین گونه امکان خاتمه واکنش زنجیره‌ای رادیکال آزاد را فراهم می‌آورند (۱۳). گونه‌های باسیلوس و جنس‌های مرتبط با باسیلوس اغلب به عنوان منابع مهم پروتئازهای خارج سلول تعریف می‌شوند. بیشتر این آنزیم‌ها از میکروارگانیسم‌های هالوفیلیک به دست آمده است (۱۴). آنزیم آلکالاز نیز در میان سایر آنزیم‌ها، قابلیت بسیار بالایی در هضم منابع

پروتئینی از خود نشان داده است (۱۵). آلكالاز پروتئاز میکروبی قلیایی است که از باکتری باسیلوس لیکنی-فورمیس^۱ تولید می‌شود (۱۶). اما بدلیل هزینه بر بودن تهیه آلكالاز و کمبود این آنزیم بدلیل تحریم‌ها محدودیت‌هایی در زمینه استفاده از این آنزیم ایجاد شده‌است. لذا تحقیق حاضر با هدف استخراج آنزیم از باکتری باسیلوس سالسوس و مقایسه درجه هیدرولیز و خصوصیات عملکردی پروتئین‌های هیدرولیز شده حاصل از آن با آنزیم آلكالاز تجاری انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

میگوی ببری سبز (*Penaeus semisulcatus*) از بندر بوشهر در فصل تابستان خریداری شد. آنزیم آلكالاز (فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس از شرکت سیگما آلدریج (آمریکا) خریداری شد. باکتری باسیلوس سالسوس^۲ (A24- Strain anaumber: IBRC-M10,078) از آزمایشگاه میکروبیولوژی دانشگاه تربیت مدرس تهران تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد نیاز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. برای تهیه و آماده سازی تمام محلول‌ها، از آب دیونیزه استفاده شد.

تهیه پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو

ضایعات فریز شده میگو، در دمای اتاق یخ‌گشایی شده و با چرخ گوشت، کاملاً هموژن گردید. به دلیل وجود مقدار زیادی آب در نمونه و به دلیل شکسته شدن آسانتر دیواره سلولی نمونه‌ها، نمونه‌های چرخ شده به مدت ۲۴ ساعت فریز درای شدند. جهت هیدرولیز پروتئین‌های موجود در ضایعات میگو از آنزیم آلكالاز و آنزیم پروتئاز استخراج شده از باکتری باسیلوس سالسوس استفاده شد. به ۰/۱ گرم از آنزیم آلكالاز، ۱۰ سی‌سی بافر فسفات (pH=۸/۵) اضافه گردید. با توجه به این نکته که بهترین عملکرد آنزیم آلكالاز در pH=۸/۵ و بهترین دمای مورد نظر بین ۵۰ تا ۶۰ درجه سلسیوس است، جهت بررسی شرایط بهینه عملکرد آنزیم از این محدوده دمایی و pH مورد نظر استفاده شد (۱۷). برای رسیدن به مقدار مناسب آنزیم آلكالاز چندین ارلن شیشه‌ای با حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر تهیه شد. ۲۰ گرم از امعا و احشای فریزدرای شده حاصل از میگو، در داخل هر ارلن ریخته شد. ۶۰ میلی‌لیتر آب مقطر با نسبت وزنی:حجمی ۳:۱ (نمونه فریزدرای شده : آب مقطر) نیز به آن اضافه گردید. مخلوط در ابتدا به منظور حذف اثر آنزیم‌های داخلی امعا و احشای میگو، در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب و بر روی استیرر قرار داده شد. سپس

¹ *Bacillus licheniformis*

² *Bacillus salsus*

pH مخلوط با استفاده از محلول سود ۱ نرمال به ۸/۵ رسانده شد. به منظور تعیین مقدار مناسب آنزیم آلکالاز در هیدرولیز آنزیمی، در این مرحله مقادیر متفاوتی از آنزیم آلکالاز (۰/۵، ۱، ۱/۵ و ۲ میلی لیتر) به هر نمونه اضافه شد (۱۸). نمونه‌ها در شیکر انکوباتور (دمای ۵۰ درجه سلسیوس و با دور ثابت rpm ۲۰۰ و به مدت ۳ ساعت) قرار داده شدند. سپس جهت قطع واکنش آنزیمی، نمونه‌ها مجدداً به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۹۰ درجه سلسیوس در حمام آب قرار داده شدند. سپس نمونه‌ها داخل فالكون با حجم ۵۰ میلی لیتر ریخته شدند و با استفاده از سانتریفیوژ یخچالدار (مدل Hermle Labrotechnik GmbH z206a ساخت آلمان) در دمای ۴ درجه سلسیوس با rpm ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و مایع رویی آن جمع-آوری گردید. ۳۰۰ میکرولیتر از هر نمونه داخل میکروتیوب ریخته شد و برای مشاهده چگونگی شکست پروتئین اولیه به پپتیدهای کوچکتر بر روی ژل الکتروفورز قرار داده شد. در مرحله بعد برای تعیین دمای مناسب برای انجام واکنش هیدرولیز، نمونه‌ها با بهترین دوز آنزیم به دست آمده در مرحله قبل، در دماهای ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۵۵ و ۶۰ درجه سلسیوس مجدداً اجرا شدند و سپس برای تعیین بهترین شکست مجدداً بر روی ژل الکتروفورز قرار داده شد (۱۹).

در مرحله آخر نیز برای تعیین مدت زمان لازم برای شکست پروتئین، نمونه‌ها در بهترین مقدار آنزیم و دمای مناسب به دست آمده در مراحل قبلی در زمان‌های مختلف صفر، ۱، ۳ و ۵ ساعت مجدداً اجرا شدند. به دلیل هزینه بر بودن آنزیم آلکالاز و همچنین به دلیل کمبود آنزیم اصلی و تحریم‌های موجود، از روشی جدید و ارزان که می‌تواند جایگزین مناسبی برای این آنزیم باشد، استفاده گردید. برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها از آنزیم استخراجی از باکتری باسیلوس سالسوس (۲۰) که به روش رسوب‌دهی با سولفات آمونیوم ۳۵ درصد در مرحله اول و سولفات آمونیوم ۷۵ درصد در مرحله دوم تخلیص شده است، استفاده گردید (۲۱). ابتدا ۲۰ گرم از امعا و احشای فریز درای شده حاصل از میگو، در داخل ارلن ریخته شد. ۶۰ میلی لیتر بافر فسفات تهیه شده با pH= ۸ با نسبت وزنی: حجمی ۳:۱ (نمونه فریزدرای شده : بافر فسفات) نیز به آن اضافه شد. مخلوط در ابتدا به منظور حذف اثر آنزیم-های داخلی امعا و احشای میگو، در دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب و بر روی استیرر قرار داده شد. نمونه‌ها به مدت ۳ ساعت بر روی حمام آب و در دمای ۴۰ درجه سلسیوس بر روی استیرر قرار داده شدند. پس از این مدت نمونه‌ها با دور rpm ۳۰۰۰ به مدت

۲۰ دقیقه سانتریفیوژ (مدل Hermle Labrotechnic

GmbH z206a، ساخت آلمان) شده و محلول رویی

جمع‌آوری شد. سپس ۲ میلی‌لیتر از آنزیم تخلیص شده

درون محلول ریخته شد و در زمان‌های ۳، ۱ و ۵ ساعت پس

از شروع واکنش، ۳۰۰ میکرولیتر نمونه از ظرف واکنش

برداشته و در میکروتیوپ ریخته شد تا جهت بررسی

هیدرولیز بر روی ژل الکتروفورز برده شود (۱۴).

اندازه‌گیری درجه هیدرولیزاسیون

میزان درجه هیدرولیزاسیون ^۱(DH) در نمونه با تری‌کلرو

استیک اسید ^۲(TCA) ۱۰ درصد حجمی-حجمی طبق

روش اویسی پور و همکاران (۲۰۱۳) انجام گرفت. مبنای

این روش اندازه‌گیری درصد نسبت پروتئین‌های محلول در

تری‌کلرو استیک اسید ۱۰ درصد به کل پروتئین‌های

موجود در نمونه می‌باشد. برای این منظور در ساعات صفر،

۳، ۱ و ۵ ساعت، ۷۵۰ میکرولیتر از فاز محلول حاوی

پروتئین و ۷۵۰ میکرولیتر از تری‌کلرواستیک اسید ۲۰

درصد با سمپلر برداشته شد و در ماکروتیوپ ریخته و

پس از هم زدن به مدت ۵ دقیقه، با دور ۵۰۰۰ rpm و

زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در واقع طی این عمل

پروتئین‌های شکسته شده از پروتئین‌های سالم جدا می-

شوند. سپس مقدار پروتئین در فاز محلول به روش بیورت

اندازه‌گیری گردید. میزان درجه هیدرولیز از طریق فرمول

زیر محاسبه شد (۲۲).

$$DH\% = \frac{10\% \text{ TCA-soluble N in sample}}{\text{Total N in sample}} \times 100$$

رابطه ۱

اندازه‌گیری پروتئین محلول کل

برای تعیین غلظت پروتئین محلول از روش بیورت استفاده

شد. پس از سانتریفیوژ، از مایع رویی برای اندازه‌گیری

استفاده شد. آلومین سرم گاوی به عنوان پروتئین استاندارد

استفاده گردید. جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۴۰ نانومتر با

استفاده از اسپکتروفتومتر UV/vis خوانده شد (۲۳).

فعالیت امولسیون‌کنندگی (EAI)^۳ و شاخص پایداری

امولسیون (ESI)^۴

ویژگی‌های امولسیفیه‌کنندگی پروتئین‌های هیدرولیز شده

برطبق روش تیلانسیلاکول و همکاران (۲۰۰۷) تعیین

گردید. ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر روغن آفتابگردان با ۳۰ میلی‌لیتر

پروتئین هیدرولیز شده با غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۵، ۱ و

۲ درصد مخلوط شد. مخلوط با استفاده از هموژنایزر با

سرعت ۲۰۰۰۰ rpm به مدت ۱ دقیقه هموژن گردید.

سپس، ۵۰ میکرولیتر نمونه امولسیون در دو زمان ۰ و ۱۰

³ Emulsion Activity Index

⁴ Emulsion Stability Index

¹ Degree of Hydrolysis

² Trichloroacetic Acid

دقیقه با ۵ میلی‌لیتر سدیم دودسیل سولفات (SDS) ۰/۱ درصد مخلوط شد. جذب محلول رقیق شده در ۵۰۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر خوانده شد. مقدار جذب در زمان اولیه (A_0) و ۱۰ دقیقه پس از تشکیل امولسیون (A_{10}) برای محاسبه فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) و شاخص پایداری امولسیون (ESI) با استفاده از روابط زیر محاسبه می‌شوند (۲۴).

$$(\text{غلظت پروتئین} \times ۰/۲۵) / (\text{میزان جذب} \times$$

$$۲/۳۰۳) = \text{ظرفیت امولسیون کنندگی}$$

$$(\text{تغییرات جذب}) / (\text{تغییرات زمان}) \times \text{میزان جذب در زمان}$$

$$\text{صفر} = \text{پایداری امولسیون}$$

$$\text{میزان جذب در زمان صفر} - \text{میزان جذب در زمان ۱۰}$$

$$\text{دقیقه} = \text{تغییرات جذب}$$

$$۱۰ \text{ دقیقه} = \text{تغییرات زمان}$$

ظرفیت کف کنندگی (FC)^۱ و پایداری کف کنندگی

(FS)^۲ پروتئین هیدرولیز شده

ظرفیت و پایداری کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده

برطبق روش تیلانسیلاکول و همکاران (۲۰۰۷) تعیین

گردید. ۲۰ میلی‌لیتر از محلول پروتئین هیدرولیز شده با

غلظت‌های مختلف ۰/۱، ۰/۵، ۱ و ۲ درصد تهیه شد و با

سرعت ۱۶۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه با هدف ورود هوا

به درون محلول در دمای محیط هموژن گردید. نمونه زده شده به سرعت به استوانه مدرج منتقل شد و ظرفیت کف کنندگی پروتئین هیدرولیز شده (%) در غلظت‌های مختلف تعیین گردید و همچنین برای تعیین پایداری کف کنندگی (%) با غلظت ۲ درصد پروتئین هیدرولیز شده در زمان‌های ۰، ۲، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۶۰ دقیقه حجم کل کف تولیدی اندازه‌گیری شد. ظرفیت کف کنندگی (FC) بر طبق معادله زیر محاسبه گردید (۲۴).

رابطه ۳-۴

$$FC (\%) = [(A - B) / B] \times 100$$

A حجم کف پس از زدن (میلی‌لیتر) و B حجم اولیه قبل از

زدن (میلی‌لیتر) می‌باشد.

نمونه‌های زده شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای ۱۰

دقیقه نگهداری گردید و سپس حجم کف خوانده شد.

پایداری کف (FS) با معادله زیر محاسبه گردید:

رابطه ۳-۵

$$FS (\%) = [(A - B) / B] \times 100$$

A حجم کف پس از نگهداری (میلی‌لیتر) و B حجم کف

اولیه (میلی‌لیتر) می‌باشد.

نمونه‌های زده شده در دمای ۲۵ درجه سلسیوس برای

زمان‌های مورد نظر نگهداری گردید و سپس حجم کف

خوانده شد.

¹ Foaming Capacity

² Foaming Stability

تجزیه و تحلیل آماری

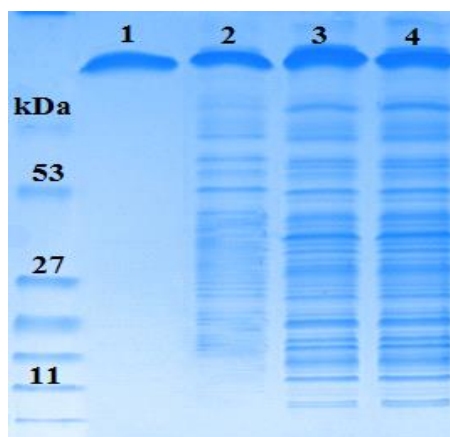
جهت بررسی حاضر برای هر یک از تیمارها، سه تکرار در نظر گرفته شد. جهت بررسی اختلاف بین داده‌های حاصله، از تجزیه واریانس یک طرفه (One-way ANOVA) و همچنین جهت تعیین وجود تفاوت معنی‌دار بین مقادیر میانگین تیمارهای مختلف از آزمون دانکن در سطح (0/05) و $P \leq$ استفاده شد. همه تجزیه و تحلیل داده‌ها با نرم افزار SPSS نسخه ۲۶ و نمودارهای موجود با Microsoft Excel نسخه ۲۰۲۱ انجام پذیرفت.

نتایج و بحث

بررسی تجزیه پروتئین

برای هیدرولیز آنزیمی پروتئین‌ها، از آنزیم آلکالاز (فعالیت ۲/۴ واحد آنسون بر گرم) گرفته شده از باکتری باسیلوس لیکنی‌فورمیس استفاده شد و برای تعیین شرایط هیدرولیز و

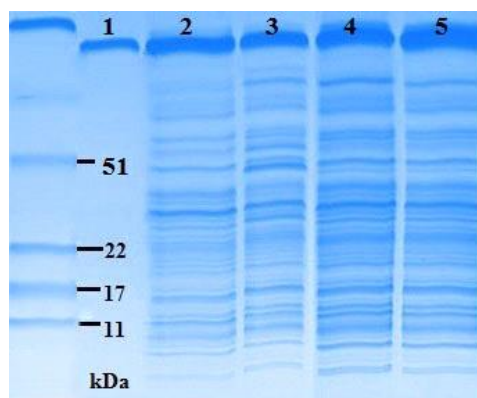
مشاهده چگونگی شکست پروتئین اولیه به پپتیدهای کوچکتر، نمونه‌های تهیه شده بر روی ژل الکتروفورز قرار داده شدند. همانطور که در باندها مشخص است (شکل ۱)، هنگامی که از ۲ میلی‌لیتر آنزیم استفاده شد (ستون ۴)، بیشترین شکست پروتئین اولیه به پپتیدهای کوچکتر مشاهده شده است. با توجه به شکل‌های (۲ و ۳) بیشترین شکست پروتئین توسط آنزیم در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و زمان ۵ ساعت (ستون ۴) صورت گرفته است که موید نتایج بدست آمده از بررسی درجه هیدرولیز در بازه زمانی ۵ ساعت می‌باشد. پس از انجام الکتروفورز، مشخص شد که هیدرولیز بهینه زمانی حاصل شد که از آنزیم به مقدار ۲ میلی‌لیتر و دمای ۵۵ درجه سلسیوس و مدت زمانی ۵ ساعت استفاده گردید.



شکل ۱- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو با استفاده از غلظت‌های مختلف آنزیم آلکالاز (ستون ۱: ۰/۵ میلی‌لیتر

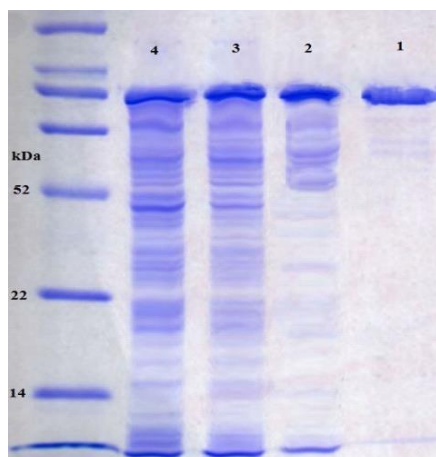
آنزیم، ستون ۲: ۱ میلی‌لیتر آنزیم، ستون ۳: ۱/۵ میلی‌لیتر آنزیم و ستون ۴: ۲ میلی‌لیتر آنزیم) در دمای ۵۰ درجه سلسیوس و زمان ۳ ساعت.

Figure 1- SDS-PAGE profiles of hydrolyzed protein from shrimp waste using different concentrations of Alcalase enzyme (Column 1: 0.5 mL enzyme, Column 2: 1 mL enzyme, Column 3: 1.5 mL enzyme, and Column 4: 2 mL enzyme) at 50°C for 3 hours.



شکل ۲- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو توسط آلكالاز در دماهای مختلف (ستون ۱: ۳۰ درجه سلسیوس، ستون ۲: ۴۰ درجه سلسیوس، ستون ۳: ۵۰ درجه سلسیوس، ستون ۴: ۵۵ درجه سلسیوس و ستون ۵: ۶۰ درجه سلسیوس) با غلظت ۲ میلی‌لیتر آنزیم و زمان ۳ ساعت.

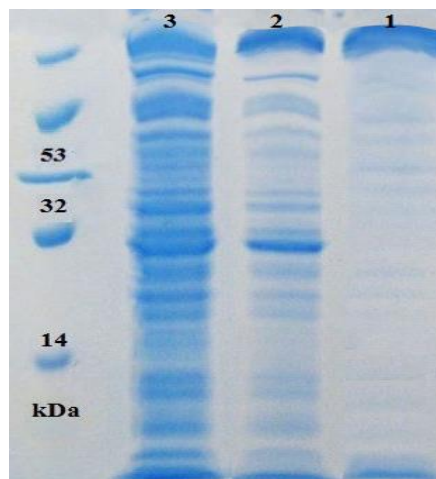
Figure 2- SDS-PAGE profiles of hydrolyzed protein from shrimp waste by Alcalase at different temperatures (Column 1: 30°C, Column 2: 40°C, Column 3: 50°C, Column 4: 55°C, and Column 5: 60°C) with an enzyme concentration of 2 mL and a reaction time of 3 hours.



شکل ۳- پروفایل‌های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو توسط آلكالاز در زمان‌های مختلف (ستون ۱: صفر، ستون ۲: ۱ ساعت، ستون ۳: ۳ ساعت و ستون ۴: ۵ ساعت) با غلظت ۲ میلی‌لیتر آنزیم و دمای ۵۵ درجه سلسیوس.

Figure 3- SDS-PAGE profiles of hydrolyzed protein from shrimp waste by Alcalase at different times (Column 1: 0 hours, Column 2: 1 hour, Column 3: 3 hours, and Column 4: 5 hours) with an enzyme concentration of 2 mL and a temperature of 55°C.

شکل (۴) هیدرولیز پروتئین در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و با استفاده از ۲ میلی لیتر آنزیم در مدت زمان های ۱، ۳ و ۵ ساعت را نشان می دهد.



شکل ۴ - پروفایل های SDS-PAGE پروتئین هیدرولیز شده از ضایعات میگو توسط آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس در شرایط رسوبدهی با سولفات آمونیوم در زمان های مختلف (ستون ۱: ۱ ساعت پس از هیدرولیز ، ستون ۲: ۳ ساعت پس از هیدرولیز و ستون ۳: ۵ ساعت پس از هیدرولیز) در دمای ۵۵ درجه سلسیوس و غلظت ۲ میلی لیتر آنزیم.

Figure 4- SDS-PAGE profiles of hydrolyzed protein from shrimp waste by the enzyme from *Bacillus salsus* under ammonium sulfate precipitation conditions at different times (Column 1: 1 hour after hydrolysis, Column 2: 3 hours after hydrolysis, and Column 3: 5 hours after hydrolysis) at a temperature of 55°C and an enzyme concentration of 2 mL.

هیدرولیز وابسته است. پارامترهای مختلفی مانند دما، pH، زمان هیدرولیز، مقدار آنزیم و نسبت آن به سویسترا و نیز درجه هیدرولیز از جمله عوامل تاثیر گذار بر خصوصیات پروتئین هیدرولیز شده می باشند (۲۵). درجه هیدرولیز به علت تحت تاثیر قرار دادن طول زنجیره پپتیدی، فعالیت ضد اکسیدانی، پروتئین هیدرولیز شده را به طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار می دهد (۱۶).

درجه هیدرولیز و مقادیر پروتئین مستخرج از ضایعات میگو توسط آنزیم آلکالاز و پروتئاز باکتری باسیلوس سالسوس

میزان درجه هیدرولیز (DH%) بیانگر میزان شکافتن پیوند-های پپتیدی طی زمان هیدرولیز می باشد و برای مقایسه میان پروتئین های هیدرولیز شده استفاده می شود. خواص زیستی پروتئین هیدرولیز شده به سویسترای پروتئینی، ویژگی آنزیم مورد استفاده در هیدرولیز، شرایط هیدرولیز و درجه

با توجه به نتایج مطالعه حاضر درجه هیدرولیز بعد از ۳ ساعت از فرآیند بطور معنی داری افزایش یافت. بطوری که بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین ($43/80$ درصد) در این مطالعه مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس بعد از گذشت ۳ ساعت از عمل هیدرولیز به دست آمد. میزان درجه هیدرولیز در نمونه های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری سالسوس بعد از زمان ۳ ساعت اندکی کاهش یافت، اگرچه در بازه های زمانی ۳ تا ۵ ساعت، تفاوت معنی داری بین مقدار این شاخص در نمونه های هیدرولیز شده با آنزیم مورد تحقیق مشاهده نشد. با توجه به نتایج بدست آمده می توان فرض نمود که این امر احتمالاً به علت محدودیت سوبسترای در دسترس برای عمل هیدرولیز بود. یافته های مطالعات پیشین نیز در تایید نتایج بدست آمده گزارش نمودند که میزان درجه هیدرولیز با طولانی شدن زمان واکنش کاهش و سپس ثابت می ماند. آن ها علت این امر را کاهش غلظت پیوندهای پپتیدی قابل دسترس برای آنزیم بخاطر عدم وجود سوبسترای لازم جهت هیدرولیز و مهار آنزیم و غیر فعال شدن آن بیان کردند (۲۶).

هرپندی و همکاران (۲۰۱۳) بالاتر بودن درجه هیدرولیز در ساعات ابتدایی هیدرولیز و یا ثابت ماندن درجه هیدرولیز را

به گسستگی سریع پیوندهای پپتیدی مستعد در ابتدای زمان هیدرولیز نسبت دادند. در ادامه عمل هیدرولیز به سبب وجود بیشتر پیوندهای پپتیدی مقاوم در برابر آنزیم، این روند در آن مشهود است (۲۷). از سوی دیگر، پپتید های حاصله نیز می توانند با پروتئین هایی که هنوز تحت هیدرولیز قرار نگرفته اند، برای اتصال آنزیم به جایگاه سوبسترا رقابت کرده و در ادامه باعث کاهش درجه هیدرولیز شوند (۱۶).

نتایج این تحقیق نشان دهنده این نکته است که کارایی هیدرولیز آنزیمی با توجه به شرایط متفاوت فرآیند، نوع آنزیم مورد استفاده و زمان عمل هیدرولیز متغیر است. به طور مثال، افزایش زمان فرآیند هیدرولیز سبب فعالیت بیشتر آنزیم و افزایش اثر آن بر سوبسترا می گردد (۲۸). همانطور که مشاهده می گردد میزان درجه هیدرولیز در تیمارهای تحت هیدرولیز آنزیمی توسط آلکالاز و آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس بعد از گذشت ۵ ساعت به ترتیب به ($39/67 \pm 3/06$) و ($43/56 \pm 2/74$) درصد رسیدند. که با نتایج حاصل از تعیین درجه هیدرولیز پروتئین هیدرولیز شده ماهی تن ($47/52$ درصد) و ژلاتین استخراج شده از پوست ماهی توسط آنزیم آلکالاز پس از ۴ ساعت ($46/8$ درصد) مشابه بود (۳۰، ۲۹). اثر زمان عمل هیدرولیز با

آنزیم‌های پاپائین و پرتامکس بر میزان درجه هیدرولیز و نیز خصوصیات آنتی‌اکسیدانی پروتئین‌های هیدرولیز شده از ماهی تیان توسط محققین مورد مطالعه قرارگرفت و مشخص شد که با افزایش زمان هیدرولیز از ۲ به ۴ و سپس ۶ ساعت، درجه هیدرولیز نمونه‌ها به ترتیب از ۱۸ به ۲۳ و ۲۸ درصد افزایش یافت. پروتئین هیدرولیز شده ماهی تیان با پاپائین به مدت ۲ ساعت تحت تیمار پپسین و سپس به مدت ۲ ساعت تحت اثر پانکراتین قرار گرفتند. نتایج نشان دادند که افزایش ۲ ساعت هیدرولیز با آنزیم پپسین تنها ۱ درصد درجه هیدرولیز را افزایش داد. در حالی که استفاده از آنزیم پانکراتین باعث افزایش درجه هیدرولیز از ۳۷ به ۴۷ درصد گردید. محققان علت اختلاف در عملکرد دو آنزیم را در کارایی پانکراتین در شکست پپتیدها به پپتیدهای کوچکتر و حتی تولید اسیدهای آمینه آزاد گزارش نمودند (۳۱). میزان بازیافت پروتئینی یک شاخص مهم در هیدرولیزاسیون می‌باشد که بیانگر توانایی جداسازی پروتئین‌ها از سوپسترا و محلول شدن آن‌ها در فاز مایع می‌باشد که به شرایط هیدرولیز، ویژگی‌های ماده مورد هیدرولیز و فعالیت آنزیمی بستگی خواهد داشت (۲۶). نتایج تحقیق حاکی از ارتباط مستقیم بین مقادیر پروتئین حاصل و درجه هیدرولیز و افزایش پروتئین بدست آمده با

افزایش درجه هیدرولیز بود. آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس نسبت به آلکالاز از فعالیت پروتئولیتیکی بالاتری برخوردار بوده و پروتئین هیدرولیز شده حاصل از این آنزیم دارای محتوای پروتئینی بیشتری می‌باشد. با استفاده از آنزیم مستخرج از باکتری باسیلوس سالسوس قدرت هیدرولیز افزایش یافته و با در نظر گرفتن زمان یکسان برای دو آنزیم مورد تحقیق، مقدار بیشتری از پروتئین‌های باند شده با سایر ترکیبات تحت تأثیر فرآیند هیدرولیز قرار گرفته و در نتیجه مقادیر پروتئین نهایی نیز بیشتر بود. می‌توان گزارش نمود با بالاتر بودن میزان پروتئین نهایی، نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم مستخرج از گونه باکتری باسیلوس سالسوس از ارزش غذایی بالایی برخوردار بوده و قابلیت بکارگیری به عنوان مکمل‌های پروتئینی را خواهند داشت (۱۹). با بررسی درجه هیدرولیز و بازیابی پروتئین از ضایعات میگو پس از ۹۰ دقیقه هیدرولیز آنزیمی مشاهده کردند که در ضایعات میگو هیدرولیز شده با آلکالاز متوسط بازیابی پروتئین در محدوده ۵۹ تا ۶۰ درصد بود که به طور قابل توجهی ($p \leq 0/05$) مقادیر بیشتری نسبت به آنزیم‌های نوتراز، پرتامکس و فلاورزایم نشان داد. در این بررسی، هیدرولیز پروتئین ضایعات میگو توسط آنزیم آلکالاز و پروتئاز باکتری باسیلوس سالسوس صورت گرفت

که نتایج مطالعات، حاکی از افزایش پیوسته درجه هیدرولیز در طول زمان فرآیند هیدرولیز بود. بالاترین درجه هیدرولیز پروتئین با ۴۳/۸۰ درصد در این مطالعه مربوط به نمونه هیدرولیز شده با آنزیم حاصل از باکتری باسیلوس سالسوس و در زمان ۳ ساعت به دست آمد. اگرچه در بازه‌های زمانی ۳ تا ۵ ساعت، تفاوت معنی‌داری بین مقدار این شاخص در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم مورد تحقیق مشاهده نشد.

نتایج حاصل از بررسی عمل هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز نشان داد که با گذشت زمان درجه هیدرولیز به طور پیوسته افزایش می‌یابد و در زمان ۵ ساعت از انجام فرایند به بالاترین مقدار (۳۹/۶۷ درصد) رسید که حاکی از پائین‌تر بودن توانایی آلکالاز در انجام هیدرولیز پروتئین نسبت به آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس بود.

جدول ۱- میزان درجه هیدرولیز و پروتئین محلول کل طی هیدرولیز توسط آنزیم استخراج شده از باسیلوس سالسوس.

Table 1- Degree of hydrolysis and total soluble protein content during hydrolysis by the enzyme extracted from *Bacillus salsus*.

زمان (ساعت)	درجه هیدرولیز (%)	پروتئین محلول کل (میکروگرم بر میلی‌لیتر)
Time (h)	Degree of Hydrolysis (%)	Total Soluble Protein ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
0	2.32 ± 0.15^c	12.64 ± 0.54^c
1	23.50 ± 0.70^b	51.94 ± 0.54^b
3	43.80 ± 3.65^a	67.15 ± 1.08^a
5333	43.56 ± 2.74^a	65.82 ± 1.25^a

مقادیر در جدول نشان دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

حروف کوچک غیر مشابه در جدول نشان دهنده معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین تیمارها می‌باشد.

The values in the table represent the mean $\pm$ standard deviation.

Non-identical lowercase letters in the table indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

با توجه به جدول ۱، با افزایش زمان هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز و آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس، میزان درجه هیدرولیز و پروتئین محلول کل افزایش می‌یابد و تفاوت بین مقادیر آن‌ها (بجز تیمار تحت آنزیم باکتری در فاصله زمانی ۳ تا ۵ ساعت) در بازه‌های زمانی مورد آزمایش

معنی‌دار ($p \leq 0.05$) می‌باشد. پروتئین محلول کل در نمونه-
 های تحت آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس با $1/25 \pm$ میکروگرم بر میلی‌لیتر) را نشان داد (جدول ۲).
 ۶۵/۸۲ میکروگرم بر میلی‌لیتر نسبت به نمونه هیدرولیز شده

جدول ۲- میزان درجه هیدرولیز و پروتئین محلول کل طی هیدرولیز توسط آنزیم آلکالاز.

Table 2- Degree of hydrolysis and total soluble protein content during hydrolysis by alcalase enzyme.

پروتئین محلول کل (میکروگرم بر میلی‌لیتر)	درجه هیدرولیز (%)	زمان (ساعت)
Total Soluble Protein ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Degree of Hydrolysis (%)	Time (h)
8.34 ± 0.50^d	1.02 ± 0.17^d	0
22.33 ± 2.52^c	22.67 ± 1.15^c	1
31 ± 1.73^b	31.67 ± 2.08^b	3
37.67 ± 3.06^a	39.67 ± 3.06^a	5

مقادیر در جدول نشان دهنده میانگین $\pm$ انحراف معیار می‌باشد.

حروف کوچک غیر مشابه در جدول نشان دهنده معنی‌داری ($p \leq 0.05$) بین تیمارها می‌باشد.

The values in the table represent the mean $\pm$ standard deviation.

Non-identical lowercase letters in the table indicate significant differences between treatments ($p \leq 0.05$).

شاخص فعالیت امولسیون (EAI) و شاخص

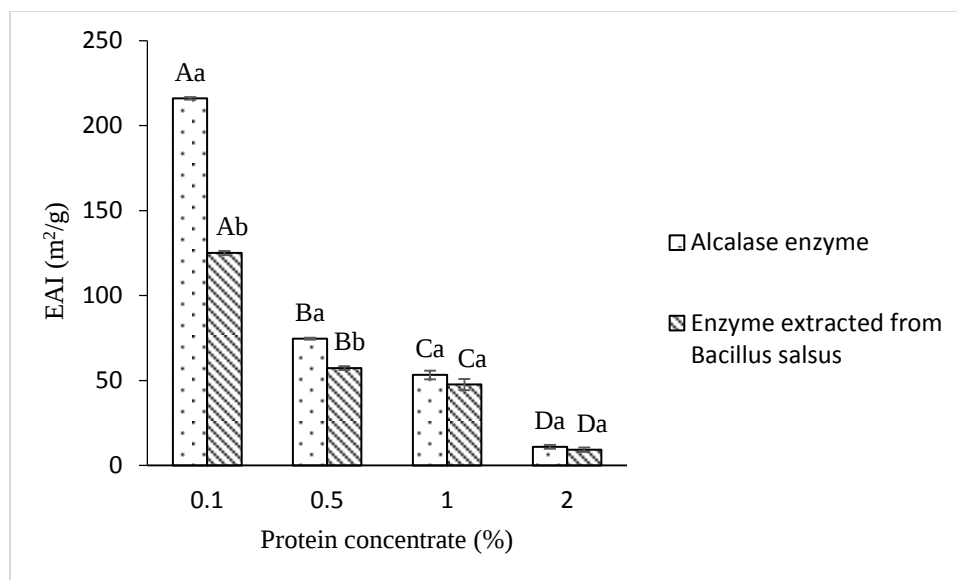
پایداری امولسیون (ESI)

خواص امولسیون کنندگی پروتئین هیدرولیز شده بیان کردند. با توجه به یافته‌ها می‌توان دریافت بالا بودن امولسیون کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده با آلکالاز می‌تواند به دلیل ویژگی‌های پپتیدهای تولید شده باشد. پادیاال- دومینگوئز و همکاران (۲۰۲۰) دریافتند که خواص امولسیون کنندگی هیدرولیزها بیشتر تحت خصوصیات آمفی‌فیلیک پپتیدها قرار می‌گیرد. آنها گزارش کردند که پپتیدهای بزرگ و بالاتر از ۲ کیلو دالتون، خواص امولسیون

با توجه به نتایج تحقیق حاضر مشاهده شد که نمونه‌های تولیدی با هر دو نوع آنزیم در غلظت‌های پایین توانایی بیشتری در تشکیل امولسیون و فعالیت امولسیون کنندگی داشتند. طبق نتایج نمونه‌های تولیدی هر دو آنزیم آلکالاز و آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس در غلظت ۰/۵ درصد بالاترین میزان پایداری امولسیون را نشان دادند. برخی محققان رابطه مستقیمی بین طول زنجیره پپتید و

کنندگی هیدرولیزها را به دلیل توانایی آنها در باز شدن در سطح مشترک روغن/آب بهبود می‌بخشد. علاوه بر این، آن‌ها به احتمال زیاد دارای خصوصیات آبگریز و آبدوست می‌باشند که به ترتیب با قطرات روغن و فاز آبی تعامل دارند (۳۲). غلظت و نوع آنزیم در میزان هر دو شاخص تاثیر معنی‌دار داشتند ($p \leq 0.05$). با افزایش غلظت از ۰/۱ به ۲ درصد میزان EAI کاهش یافت. پروتئین‌ها به طور معمول به دلیل خاصیت آمفی‌فیلیک بودنشان که به آن‌ها اجازه شرکت در اتصالات و پایداری قطرات روغن را از طریق دافعه الکترواستاتیک می‌دهد، به عنوان امولسیفایر مورد استفاده قرار می‌گیرند (۳۳). خواص امولسیون‌ی ترکیبات هیدرولیز شده از ۰/۱۴۴ تا ۱۳۰ درصد است که به عوامل مختلفی مانند اندازه مولکولی، توالی اسیدآمینه، نوع آنزیم، pH و درجه هیدرولیز بستگی دارد. به طوری که با کاهش مقدار درجه هیدرولیز خاصیت امولسیون‌ی بهتر می‌شود. به طور کلی با افزایش اندازه پروتئین ارتباط فیلم‌های اطراف قطرات امولسیون ضعیف می‌شود و در نتیجه آن ثبات امولسیون‌ی هم کاهش می‌یابد (۳۲). آن‌ها مشاهده کردند خواص امولسیون‌کنندگی تحت تاثیر نوع آنزیم است. پپتیدهای با وزن مولکولی بالاتر یا پپتیدهای آبگریز در پایداری امولسیون نقش دارند و به راحتی از سطح جدا

نمی‌شوند و هیدرولیز بیشتر نمونه سبب کاهش خواص امولسیون‌کنندگی می‌گردد. از سوی دیگر مطالعات بیشتر بر روی توالی اسید آمینه در سطح مشترک حدواسط روغن و آب نشان داده که ویژگی آمفی‌فیلیک بیشتر از اندازه پپتیدها و انعطاف پذیری ساختار پروتئین بر ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی تاثیر دارند. میزان شاخص ESI تحت تاثیر تغییر غلظت بود و با افزایش غلظت از ۰/۵ درصد میزان پایداری امولسیون کاهش یافت. احتمالاً لایه نازک پروتئینی سبب پایداری ذرات روغن می‌شود و افزایش غلظت پروتئین از حد مشخصی سبب تداخل در قرارگرفتن پروتئین در واحد سطح می‌گردد. بالا بودن پایداری امولسیون در غلظت‌های پایین‌تر در نمونه‌های هیدرولیز شده به هر دو=گ روش می‌تواند به دلیل ویژگی‌های پپتیدهای تولیدی باشد. احتمالاً پپتیدهای با خواص آمفی‌فیلیک در غلظت‌های پایین برای مهاجرت در سطوح آب و روغن موفق‌تر بوده و در نتیجه ESI بیشتر بود. این نتیجه همسو با نتایج سایر محققان است که جدا از اندازه پپتید، ویژگی‌های آبگریزی یا آبدوستی را در سطوح بین ذرات در امولسیون موثر می‌دانند. مطالعات پیشین گزارش کردند که هر چقدر میزان درجه هیدرولیز بالاتر باشد پایداری امولسیون بالاتر است (۳۴،۳۳).

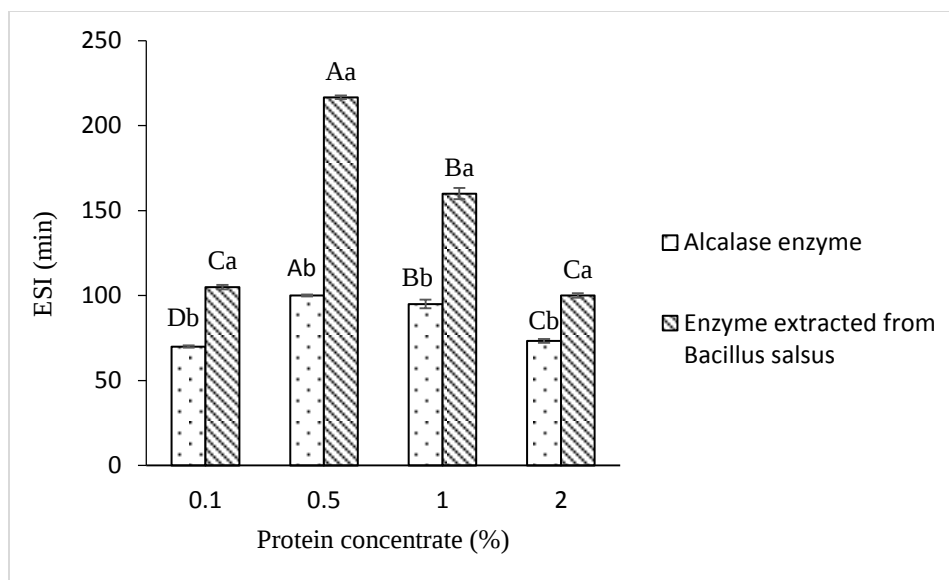


شکل ۵- فعالیت امولسیون کنندگی (EAI) پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو تولید شده با آنزیم آلكالاز و آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

Figure 5- Emulsion activity index (EAI) of hydrolyzed protein shrimp waste produced using alcalase and the enzyme derived from *Bacillus subtilis*.

حروف بزرگ غیر مشابه معنی داری ($p \leq 0.05$) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیر مشابه معنی داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between treatments at different concentrations; non-identical lowercase letters denote significant differences between treatments within each concentration.



شکل ۶- پایداری امولسیون (ESI) پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو تولید شده با آنزیم آلكالاز و آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

Figure 6- Emulsion stability index (ESI) of hydrolyzed protein shrimp waste produced using alcalase and the enzyme derived from *Bacillus salsus*.

حروف بزرگ غیر مشابه معنی داری ($p \leq 0.05$) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیر مشابه معنی داری را در بین تیمارها در هر غلظت نشان می‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between treatments at different concentrations, non-identical lowercase letters denote significant differences between treatments within each concentration.

میزان کف‌کنندگی و پایداری کف‌کنندگی پروتئین

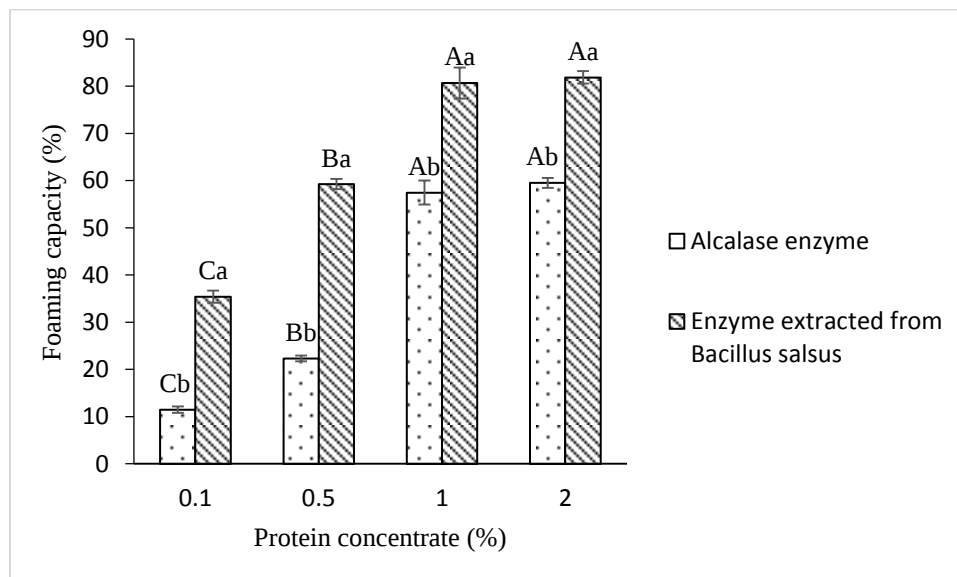
هیدرولیز شده

توانایی تشکیل کف و پایداری کف پروتئین هیدرولیز شده با دو آنزیم آلكالاز و پروتئاز بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس در شکل‌های ۷ و ۸ نشان داده شده است. طبق نتایج، نوع آنزیم مورد استفاده و گذشت زمان بر ویژگی‌های کف ایجاد شده تأثیرگذار می‌باشد. خاصیت کف‌کنندگی

پروتئین هیدرولیز شده در تحقیق حاضر از حدود ۱۱/۴۵ تا ۵۹/۵۱ درصد در نمونه هیدرولیز شده با آلكالاز و از ۳۵/۴۱ تا ۸۱/۸۶ درصد در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس متغیر است. بطوری‌که با افزایش غلظت پروتئین میزان کف‌کنندگی در هر دو تیمار افزایش یافت. مقدار بهینه کف‌کنندگی حدود ۲۰ تا ۱۴۰

درصد گزارش شده است (۱۶). بالاترین میزان کف‌کنندگی در نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری باسیلوس و غلظت ۲ درصد پروتئین مشاهده شد. طبق نتایج بدست آمده در شکل‌های ۷ و ۸ نمونه هیدرولیز شده با آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس خاصیت کف‌کنندگی قوی‌تری نسبت به نمونه تیمار شده با آلکالاز داشته که می‌تواند مرتبط با افزایش حلالیت پروتئین و بالاتر بودن درجه هیدرولیز نمونه باشد که منجر به بهبود تولید کف و نفوذ سریعتر آن به فواصل بین هوا و آب شده است (۳۵). همچنین نتایج نشان داد پایداری کف تولید شده در طول زمان در هر دو تیمار کاهش یافت و روند کاهش پایداری در تیمار هیدرولیز شده با آلکالاز کندتر بود. نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز در طی زمان پایداری کف بیشتری نسبت به نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس داشتند. علیرغم اینکه نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس تشکیل کف بالاتری نسبت به آلکالاز داشتند. طبق نتایج بدست آمده، نمونه‌های تولید شده با آلکالاز دارای درجه هیدرولیز پایین‌تری نسبت به نمونه‌های هیدرولیز شده با آنزیم باکتری باسیلوس سالسوس داشتند و همچنین دارای پپتیدهای بزرگتر بود. این یافته‌ها همسو با

نتایج اینتراسیریسوات و همکاران (۲۰۱۲) بود. آن‌ها دریافتند پپتیدهای با زنجیره بلندتر در هیدرولیز می‌تواند فیلم‌های انعطاف‌پذیر، ضخیم‌تر و قوی‌تری در اطراف حباب‌های هوا را تشکیل داده و از پایداری کف بالاتری برخوردار باشد (۳۶). مطالعه دیگری نشان داد که نمونه‌های با درجه هیدرولیز پایین‌تر، زنجیره‌هایی با طول بیشتر داشت و در نتیجه کف پایداری بیشتری داشت. چراکه پپتیدهای کوتاه‌تر، توانایی کمتری برای تشکیل شبکه‌های پروتئینی قوی در سطح کف دارند (۳۷). از دیدگاه آن‌ها پروتئین در این سیستم باید بتواند به سرعت در سطح بین هوا-آب حرکت کرده، باز شده و مجدداً در سطح چیده شود. به طور کلی، تشکیل کف و ویژگی‌های امولسیون پروتئین هیدرولیز شده نسبت به پروتئین اولیه تغییر می‌کند. از سوی دیگر پپتیدهای تولیدی در هیدرولیز ممکن است دارای اندازه مختلف و پپتیدهایی با بارهای مختلف باشند. ظرفیت بالای کف می‌تواند در صنعت مواد غذایی برای کاربردهای مختلف مفید باشد. محققان پیشین دریافتند کاهش پایداری کف در طول زمان عمدتاً به دلیل کاهش وزن مولکولی پپتیدها، کاهش ویسکوزیته، کاهش حلالیت، تغییرات در ترکیب و برهم‌کنش‌های بین مولکولی پروتئین‌های هیدرولیز شده رخ می‌دهد. شدت و شرایط هیدرولیز توسط آنزیم‌های



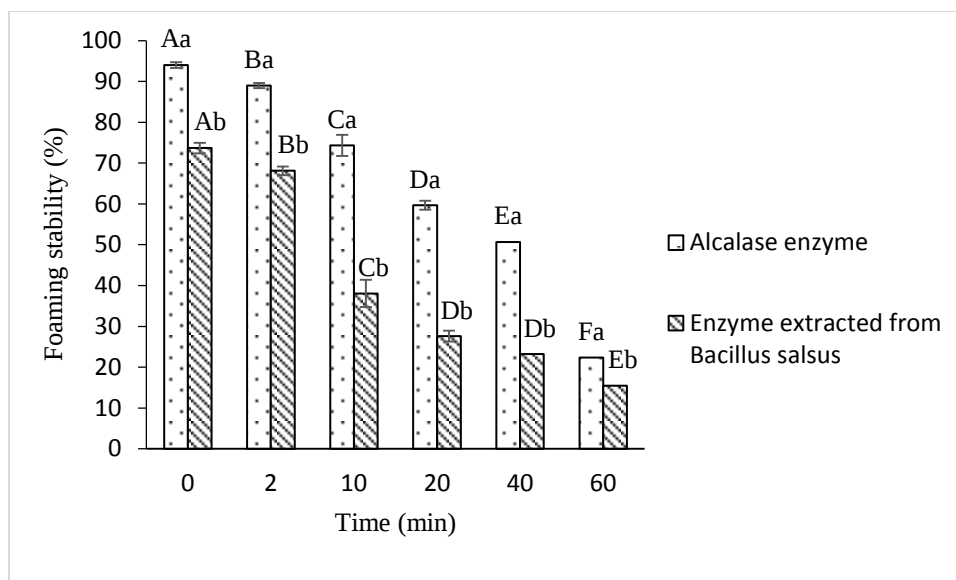
شكل ۷- ميزان كف كنندگى پروتئين هيدروليز شده ضايعات ميگو توليد شده با آنزيم آلكالاز و آنزيم بدست آمده از باكتري باسيلوس سالسوس.

Figure 7- Foaming capacity of hydrolyzed protein from shrimp waste produced using alcalase and the enzyme derived from *Bacillus salsus*.

حروف بزرگ غير مشابه معنى دارى ($P \leq 0.05$) بين تيمارها در غلظت‌هاى مختلف و حروف كوچك غير مشابه معنى دارى را در بين تيمارها در

هر غلظت نشان مى‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between treatments at different concentrations, non-identical lowercase letters denote significant differences between treatments within each concentration.



شکل ۸- میزان پایداری کف پروتئین هیدرولیز شده ضایعات میگو تولید شده با آنزیم آلكالاز و آنزیم بدست آمده از باکتری باسیلوس سالسوس.

Figure 8- Foaming stability of hydrolyzed protein from shrimp waste produced using alcalase and the enzyme derived from *Bacillus salsus*

حروف بزرگ غیر مشابه معنی داری ($P \leq 0.05$) بین تیمارها در غلظت‌های مختلف و حروف کوچک غیر مشابه معنی داری را در بین تیمارها در

هر غلظت نشان می‌دهد.

Non-identical uppercase letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$) between treatments at different concentrations, non-identical lowercase letters denote significant differences between treatments within each concentration.

نتیجه گیری

نتایج نشان داد که نمونه‌های تولیدشده با آلكالاز دارای

درجه هیدرولیز پایین‌تری نسبت به نمونه‌های هیدرولیزشده

با آنزیم مستخرج از باکتری باسیلوس سالسوس می‌باشند و

همچنین مشخص شد نمونه هیدرولیز شده با آنزیم بدست

آمده از باکتری باسیلوس سالسوس خاصیت کف‌کنندگی

بالاتر نسبت به نمونه تیمار شده با آنزیم آلكالاز داشتند که

ضایعات منابع دریایی منبعی ارزشمند از ترکیبات زیست-

فعال محسوب می‌شوند که دارای خصوصیات عملکردی

متنوعی می‌باشند. نتایج به‌دست آمده در مطالعه حاضر نشان

دادند که ضایعات میگو منبع پروتئینی مناسبی جهت تولید

پپتیدهای زیست فعال به کمک هیدرولیز آنزیمی است.

می‌تواند به افزایش حلالیت پروتئین و بالاتر بودن درجه هیدرولیز نمونه نسبت داده شود. علی‌رغم اینکه نمونه هیدرولیز شده با آنزیم آلکالاز پایداری کف قوی را نشان دادند. همچنین نمونه‌های تولیدی با هر دو نوع آنزیم درغلظت‌های پایین، توانایی بیشتری در تشکیل و پایداری امولسیون داشتند.

منابع

1. Alfio, V.G., Manzo, C., & Micillo, R. (2021). From Fish Waste to Value: An Overview of the Sustainable Recovery of Omega-3 for Food Supplements. *Molecules*, 26, 1002.
2. Araujo, J., Sica, P., Costa, C., & Márquez, M.C. (2021). Enzymatic Hydrolysis of Fish Waste as an Alternative to Produce High Value-Added Products. *Waste and Biomass Valorization*, 12, 847–855.
3. Krichen, F., Sila, A., Caron, J.; Kobbi, S., Nedjar, N., Miled, N., Blecker, C., Besbes, S., & Bougatef, A. (2018). Identification and Molecular Docking of Novel ACE Inhibitory Peptides from Protein Hydrolysates of ShrimpWaste. *Engineering in Life Sciences*, 18, 682–691.
4. Kumar, S., Nazeer, R.A., & Jaiganesh, R. (2012). Purification and identification of antioxidant peptide from the skin protein hydrolysate of two marine fishes horse mackerel (*Magalaspis cordyla*) and croaker (*Otolithes ruber*). *Journal of Amino Acids*, 42, 1641–1649.
5. Ozogul, F., Cagaj, M., Šimat, V., Ozogul, Y., Tkaczewska, J., Hassoun, A., Kaddour, A.A., Kuley, E., Rathod, N.B., & Phadke, G.G. (2021). Recent Developments in Valorisation of Bioactive Ingredients in Discard/Seafood Processing By-Products. *Trends in Food Science and Technology*, 116, 559–582.
6. Bai, C., Wei, Q., & Ren, X. (2017). Selective Extraction of Collagen Peptides with High Purity from Cod Skins by Deep Eutectic Solvents. *ACS Sustain. Chemical Engineering*, 5, 7220–7227.
7. Ortizo, R.G.G., Sharma, V., Tsai M.L., Wang J.X., Sun, P.P., Nargotra, P., Kuo, C.H., Chen, C.W., & Dong, C.D. (2023). Extraction of Novel Bioactive Peptides from Fish Protein Hydrolysates by Enzymatic Reactions. *Applied Sciences*, 13, 57680.
8. Bhaskar, N., Benila, T., Radha, C., & Lalitha, R.G. (2008). Optimization of enzymatic hydrolysis of visceral wasteproteins of Catla (*Catla catla*) for preparing protein hydrolysate using a commercial protease. *Bioresource Technology*, 99 (2), 335-343.
9. Diniz, A.M., & Martin, A.M. (1997). Optimization of nitrogen recovery in the enzymatic hydrolysis of dogfish (*Squalus acanthias*) protein: Composition of the hydrolysates. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 48, 191–200.

10. Najafian, L., & Babji, A.S. (2012). A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications. *Peptides*, 33, 178–185.
11. Hosseini, S.D., & Hesaree, M. (2020). Isolation and protease enzyme activity survey in *Bacillus* isolates collected from Mahalat warm water springs. *Journal of Animal Environment*, 11(4), 389-396. (Translated in Persian)
12. Taheri, A., Farvin, K.S., Jacobsen, C., & Baron, C.P. (2014). Antioxidant activities and functional properties of protein and peptide fractions isolated from salted herring brine. *Food Chemistry*, 142, 318-326.
13. Sarmadi, B.H.; & Ismail, A. (2010). Antioxidative Peptides from Food Proteins: A Review. *Peptides*, 31, 1949–1956.
14. Kalwasińska, A., Jankiewicz, U., Felföldi, T., Burkowska-But, A., & Brzezinska, M. S. (2018). Alkaline and Halophilic Protease Production by *Bacillus luteus* H11 and Its Potential Industrial Applications. *Food Technology and Biotechnology*, 56(4), 553–561.
15. Heffernan, S., Giblin, L., & O'Brien, N. (2021). Assessment of the Biological Activity of Fish Muscle Protein Hydrolysates Using In Vitro Model Systems. *Food Chemistry*, 359, 129852.
16. Rajabzadeh, M., Pourashouri, P., Shabanpour, B., & Alishahi, A. (2018). Evaluation of functional properties and antioxidant of protein hydrolysates from the roe of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10(2), 23-35. (Translated in Persian)
17. Hussain, F., Arana-Peña, S., Morellon-Sterling, R., Barbosa, O., Ait Braham, S., Kamal, S., & Fernandez-Lafuente, R. (2018). Further Stabilization of Alcalase Immobilized on Glyoxyl Supports: Amination Plus Modification with Glutaraldehyde. *Molecules*, 23(12), 3188.
18. Wang, Z., Liu, X., Xie, H., Liu, Z., Rakariyatham, K., Yu, C., Shahidi, F., & Zhou, D. (2021). Antioxidant activity and functional properties of Alcalase-hydrolyzed scallop protein hydrolysate and its role in the inhibition of cytotoxicity in vitro. *Food Chemistry*, 344, 128566.
19. Dey, S., & Dora, K. (2014). Antioxidative activity of protein hydrolysate produced by alcalase hydrolysis from shrimp waste (*Penaeus monodon* and *Penaeus indicus*). *Journal of Food Science and Technology*, 51(3), 449–457.

20. Amoozegar, M.A., Didari, M., Bagheri, M., Shahzadeh Fazeli, S.A., Schumann, P., Sproer, C., Sa'nchez-Porro, C., & Ventosa, A. (2013). *Bacillus salsus* sp. nov., a halophilic bacterium from a hypersaline lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 3324–3329.
21. Khalatbari, Sh., Hasani, M., & Khoshvaght-Aliabadi, M. (2024). Investigating the Characteristics of Nanoliposomes Carrying Bioactive Peptides Obtained from Shrimp Waste. *International Journal of Peptide Research and Therapeutics*, 30,10.
22. Ovissipour, M., Rasco, B., Shihoodi, 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. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1718–1726.
23. 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.
24. Thiansilakul, Y., Benjakul, S., & Shahidi, F. (2007). Compositions, functional properties and antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from round scad (*Decapterus maruadsi*). *Food Chemistry*, 103, 1385–1394.
25. Sowmya, R., & Sachindra, N.M. (2012). Evaluation of antioxidant activity of carotenoid extract from shrimp processing byproducts by in vitro assays and in membrane model system. *Food Chemistry*, 134(1), 308-314.
26. Pereira, N.L.A., Fangio, M.F., Rodriguez, Y.E., Bonadero, M.C., Harán, N.S., Fernández-Gimenez, A.V. (2021). Characterization of liquid protein hydrolysates shrimp industry waste: analysis of antioxidant and microbiological activity, and shelf life of final product. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(8), 15526.
27. Herpandi, H., Huda, N., Rosma, A., & Wan Nadiah, W.A. (2013). Optimizing the Enzymatic Hydrolysis of Skipjack Tuna (*Katsuwonus pelamis*) Dark Flesh Using Alcalase Enzyme: A Response Surface Approach. *Fisheries and Aquatic Sciences*, 8(4), 494-505.
28. Djellouli, M., López-Caballero, M.E., Arancibia, M.Y., Karam, N., & Martinez- Alvarez, O. (2020). Antioxidant and Antimicrobial Enhancement by Reaction of Protein Hydrolysates Derived from Shrimp By-Products with Glucosamine. *Waste and Biomass Valorization*, 11, 2491–2505.

29. Gomez-Guillen, M. C., Lopez-Caballer, M. E., Aleman, A., Gimenez, B., & Montero, P. (2010). Antioxidant and antimicrobial peptide fractions from squid and tuna skin gelatin. Sea By-Products as Real Material New ways of Application. In Estelle le Bihan. *Sea By-Products as Real Material: New Ways of Application*. Kerala, India. Transworld Research Network, p. 89-115.
30. Ramezanzade, L., Hosseini, F., & Nikkhah, M. (2017). Biopolymer-coated nanoliposomes as carriers of rainbow trout skin-derived antioxidant peptides. *Food Chemistry*, 234, 220–229.
31. Yu, J., Hu, Y., Xue, M., Dun, Y., Li, S., Peng, N., Liang, Y., & Zhao, S. (2016). Purification and identification of antioxidant peptides from enzymatic hydrolysate of *Spirulina platensis*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), 1216-1223.
32. Padial-Domínguez, M., Espejo-Carpio, F. J., Pérez-Gálvez, R., Guadix, A., & Guadix, E. M. (2020). Optimization of the emulsifying properties of food protein hydrolysates for the production of fish oil-in-water emulsions. *Foods*, 9(5), 636.
33. Zhang, X., Wang, Q., Liu, Z., Zhi, L., Jiao, B., Hu, H., Ma, X., Agyei, D., & Shi, A. (2023). Plant Protein-Based Emulsifiers: Mechanisms, Techniques for Emulsification Enhancement and Applications. *Food Hydrocolloids*, 144, 109008.
34. Kumar, S., & Nayak, S.K. (2019). Purification techniques for biological proteins. *Think India Journal*, 22, 1057–1077.
35. García-Moreno, Pedro, J., Guadix, A., Guadix, E. M., & Jacobsen, C. (2016). Physical and oxidative stability of fish oil-in-water emulsions stabilized with fish protein hydrolysates. *Food Chemistry*, 203, 124–135.
36. Intarasirisawat, R., Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2012). Antioxidative and functional properties of protein hydrolysate from defatted skipjack (*Katsuwonus pelamis*) roe. *Food Chemistry*, 135, 3039–3048.
37. Chalamaiah, M., Hemalatha, R., Jyothirmayi, T., Diwan, P.V., Bhaskarachary, K., Vajreswari, A., Ramesh Kumar, R., & Dinesh Kumar, B. (2015). Chemical composition and immunomodulatory effects of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) egg (roe). *Nutrition*, 31(2), 388-98.

Investigating the efficiency of an enzyme extracted from *Bacillus salus* as an alternative to alcalase in the hydrolysis of shrimp waste protein

Investigating the efficiency of an enzyme extracted from *Bacillus salus* as an alternative to alcalase in the hydrolysis of shrimp waste protein

Shima Khalatbari¹, Maryam Hasani^{*2}, Morteza Khoshvaght-Aliabadi³

1. PhD Student., Dept. of Food Science and Technology, Sha. C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran. E-mail: shima.khalatbari@yahoo.com
2. Corresponding Author, Assistant Prof., Dept. of Food Science and Technology, Sha. C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran. E-mail: mhasani81@yahoo.com, mhasani@iau.ac.ir
3. Prof., Dept. of Chemical Engineering, Sha. C., Islamic Azad University, Shahrood, Iran. E-mail: mkhaliabadi@gmail.com

Abstract

Backgrounds and Objectives: Hydrolyzed proteins obtained from fishery by-products have numerous physiological functions due to their bioactive peptides and can improve human health and prevent chronic diseases due to their antioxidant and antimicrobial properties.

Materials and Methods: In this study, the wastes of green tiger shrimp (*Penaeus semisulcatus*) were prepared, freeze-dried, and hydrolyzed using Alcalase and a protease extracted from *Bacillus salus* under different conditions of temperature, pH, and time. The functional properties of the hydrolyzed proteins, including the degree of hydrolysis, emulsifying activity and stability, as well as foaming capacity, were evaluated.

Results: The results obtained indicated that alcalase was less able to hydrolyze protein than the enzyme obtained from *Bacillus salus*. The results showed that the degree of hydrolysis increased with the passage of hydrolysis time, and the highest degree of protein hydrolysis (43.80%) was obtained from the sample hydrolyzed with the bacterial enzyme at 3 hours and the highest value (39.67%) by the alcalase enzyme at 5 hours. It was also found that the samples hydrolyzed with the bacterial enzyme had more foam formation over time than the samples hydrolyzed by alcalase. The highest foaming rate was observed in samples hydrolyzed with *Bacillus* enzyme and 2% protein concentration. The stability of the foam produced decreased over time in both treatments and the trend of stability decrease was slower in the treatment hydrolyzed with alcalase. It was also found that the samples obtained with both enzymes at a concentration of 0.5% showed the highest emulsion stability.

Conclusion: A recent study shows that the enzyme extracted from *Bacillus salus* can be used as a new, economical and efficient replacement for the alcalase enzyme.

Key words: Shrimp waste, protein hydrolysis, alcalase, *Bacillus salus*, foam stability